KIBA JAMILA MIGUEL COMICHE

Malária aviária: desenvolvimento eritrocítico de parasitas através de infecção experimental, identificação e classificação de novas espécies de hemosporídeos

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Prof[a.] Dr[a.] Karin Kirchgatter

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Comiche, Kiba Jamila Miguel
Malária aviária: desenvolvimento eritrocítico de parasitas através de infecção experimental, identificação e classificação de novas espécies de hemosporídeos / Kiba Jamila Miguel Comiche. – São Paulo, 2019.
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Karin Kirchgatter

Descritores: 1. MALÁRIA. 2. AVES. 3. INFECÇÃO EXPERIMENTAL ANIMAL. 4. PLASMODIUM.

USP/IMTSP/BIB-04/2019.

Com muito amor dedico esta conquista ao meu pai, Miguel Paulo Comiche, pelo carinho, confiança e apoio incondicional que certamente encorajaram-me a superar todas as barreiras que apareceram neste trajeto e a focar no meu objetivo com determinação e gratidão. E ao meu primogênito, Igor Miguel dos Santos, luz da minha vida por dar um sentido especial à minha existência e proporcionar diariamente grandes momentos de alegria e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

‘‘Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!’’ (Papa Francisco)

Ao chegar ao fim deste trabalho quero exprimir a minha eterna gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização. Durante esses dois anos longe de casa e da família só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Cada pessoa que fez parte desta jornada foi necessária e nada foi por acaso. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata.

Agradeço à Deus, pai todo poderoso, pelo dom da vida, por me dar forças, saúde, sabedoria e por iluminar o caminho desta jornada.

À minha orientadora, professora Dra. Karin Kirchgatter, por acreditar em mim e me dar a oportunidade de integrar na sua equipe e, que mesmo sem me conhecer pessoalmente, abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Só tenho a agradecer pela solidariedade, acolhimento, atenção, apoio incondicional, ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientação, puxões de orelha, paciência e dedicação. Sinto-me lisonjeada por ter sido sua orientada. Toda minha gratidão e apreço, pois graças a essa contribuição ímpar foi possível concretizar esse sonho de engrenar na pesquisa.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCTESTP) pela concessão da bolsa de estudos através do Projecto do Ensino Superior, Ciências e Tecnologia (HEST) Chamada N°6/2016. Ao Doutor Mahalana Chipanga, gestor do programa da bolsa MCTESTP pela atenção e paciência para o desembolso da bolsa.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Universidade de São Paulo (USP) pelo suporte e oportunidade de aprendizado proporcionada que certamente contribuíram positivamente para a minha formação. Aos professores do IMT, ICB II, Saúde Pública e Faculdade de Veterinária da USP por todos os ensinamentos transmitidos e pela contribuição no meu processo de aprendizado. Ao pessoal muito atencioso e prestativo do IMT: especialmente a secretária da pós-graduação Eliane Araújo, ao Almir Ferreira e ao Bibliotecário Carlos Quinteiro pela paciência, atenção e apoio durante o curso.

Aos amigos e colegas: Dra. Lilian Guimarães, à bióloga Eliana Monteiro, à bióloga Roseli Simões e ao biólogo Bruno Mathias, pela amizade, paciência, apoio e

contribuições com o trabalho e por dividirem comigo momentos de alegria, de tensão e experiências que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Terei muitas saudades dos nossos momentos de confraternização. “Tem que ter olho de biólogo em tudo” nem Eliana....rsrsrs. Você é uma pessoa ímpar a qual eu e o meu filho teremos sempre em nossa memória obrigada por todo apoio, troca de ideias, de ti veio a minha força para conseguir conciliar a maternidade com a pesquisa, muito obrigada por tudo e pelo contributo no processamento das amostras. Rose, querida amiga, muito aprendi de ti, um exemplo de pessoa resiliente, obrigada pelos nossos momentos de conversa no bandejão, apoio e amizade, sentirei muita saudade das músicas de louvores para fazer a eletroforese, muito obrigada pela ajuda e troca de experiência de biologia molecular. “É dois palitos” essa palavra ecoava na minha cabeça, não sabia o significado dela, mas toda vez que era proferida algo estava prestes a ser solucionado, obrigada Lilian por toda apoio, dedicação, preocupação, ensinamentos e preciosa ajuda nas técnicas moleculares que em muito contribuíram para o meu projeto. Bruno não “manjo” muito de informática, mas conseguimos resolver muitos “paranauês” espero ter entendido certo a gíria...rsrsrs...minha eterna gratidão pela sua prontidão, amizade, conversas descontraídas, apoio no processamento das amostras e dicas de informática.

A todo pessoal do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias): professora Dra. Silvia Di Santi, Dida, bióloga Malu meu muito obrigado pela receptividade, ensinamentos transmitidos. As meninas do ambulatório de viajantes: Christina Toniollo e Maria Silva, muito obrigada pelo apoio, carinho, amizade e pelos ensinamentos transmitidos durante o treinamento sobre diagnóstico laboratorial de malária.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Núcleo de Análises Clínicas e Sector de aves) pelo apoio e confiança na concessão do precioso material para a infecção experimental. Meu profundo obrigado a todo pessoal que se prontificou a auxiliar.

À Dra Carolina Chagas, tivemos pouco tempo de convívio, mas você sempre se mostrou ser uma pessoa sempre prestativa e extremamente profissional, obrigada por ter me apresentado o mundo microscópico dos hemoparasitas das aves.

Ao Dr Alan Fecchio da Universidade Federal da Bahia, o Dr Fábio Schunck do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo e Dr Victor Cueto do Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), CONICET – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel, Chubut, Argentina, pela colaboração, apoio e por disponibilizarem as preciosas amostras de aves que tornaram possível este trabalho.

Meu muito obrigado e espero que possamos continuar com esta colaboração além-fronteiras.

À Prof. Dra. Margareth Capurro e toda sua equipe em especial: Dra Rafaella Ioshino e Ediane Sariva, pela colaboração para o uso do biotério para a realização da infecção experimental e conhecimentos transmitidos.

À Prof. Dra. Alda Backx Madeira do ICB II da USP pela preciosa ajuda na aquisição de pintinhos e uso do biotério e a técnica Eunice Ribeiro pela disponibilidade, paciência e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Adriano Pinter da SUCEN, pela imensurável ajuda na inoculação de sangue para a infecção experimental e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Marinho e a bióloga Erika Machado do ICB II USP, pela disponibilização e ajuda para o uso do microscópio para a documentação das imagens deste trabalho.

Aos participantes e organizadores do XXIII SEMINÁRIO LAVERAN & DEANE SOBRE MALÁRIA em particular ao meu supervisor Dr. Frédéric Ariey pelas contribuições que em muito enriqueceram a minha abordagem sobre a malária.

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Dra. Ana Lucia Nascimento e Prof. Dra. Camila Romano pelos pertinentes apontamentos que engradeceram este trabalho.

Aos meus pais, Miguel Comiche e Helena Chantiro (*in memorian*) pela vida com que me presentearam e pelos exemplos de carácter e dignidade com os quais me educaram.

Ao meu filho Igor Miguel por ser meu alicerce e aos meus queridos irmãos Paulo (*in memorian*), Cláudio, Arminda, Clotilde, Salima e Kiluba pelo apoio, carinho, dedicação e amor que sempre tiveram por mim e que foram essenciais para que eu tivesse forças para lutar e conquistar meus objetivos. Aos meus sobrinhos: Evenício, Sheyda, Ivan, Filomena, Cláudio Jr., Meck Jr., Melchior, Salima, Lena, Rick, Keylan, Marlon e Nekly por serem a minha fonte de inspiração. Aos primos: Salima e Bakarito, meus cunhados Meque, Nelo, Dulce e Liseth, tios Hassane, Zuleika, Adelaide, Belarmina e demais familiares pelos incentivos em todos os momentos desta jornada.

Ao Noé Hofiço e sua família, por todo apoio nesta jornada, companheirismo e por todos os momentos bons e ruins que vivemos nesta jornada, pois são memórias que certamente iremos carregar para o resto da vida.

Ao amigo Jaime Mandlate por toda ajuda e dicas no processo de candidatura a bolsa.

Aos amigos moçambicanos e brasileiros presenteados pela vida: Ana Crimilda, Aniceto Macie, Benilde Moiane, Carolina Sasse Stein, Eulália Muchanga, Elizabete Oliveira,

Filomena Manjate, Felipe Belagamba, Ines Queme, João Filho, Loide Masseque, Osvaldo Inlamea, Rui Amadeu, Maitê Freitas.

À família Perreira da Silva (Robson, Rafael, Helena) e todos integrantes da República Dona Helena muito obrigada pela paciência, carinho, amizade e acolhimento uma segunda família que a vida me presenteou.

À família Novaes em especial a dona Moça por toda atenção, carinho, apoio...com certeza foram o porto seguro para mim e para o Igor Miguel.

Aos meus presentes de Deus, Elisangela Freitas, Fernanda Mourão, Luciana Sousa e Noranthan Costa, não existem palavras para expressar a minha gratidão, por todos momentos que vivemos cheios de carinho, amizade, cumplicidade; vocês são parte da minha família e tornaram amena a minha estadia e a Igor Miguel em São Paulo.

À família Hildebrand em especial a Aparecida Hildebrand (Vó Cida) a minha Gratidão e apreço pelo carinho recebido e pelo acolhimento e por me proporcionarem momentos divertidos e memoráveis.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho o meu KANIMAMBO!!!

RESUMO

Comiche KJM. Malária aviária: desenvolvimento eritrocítico de parasitas através de infecção experimental, identificação e classificação de novas espécies de hemosporídeos (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

A taxonomia dos agentes etiológicos da malária aviária é bastante controversa e a grande maioria dos estudos se baseia apenas na identificação morfológica. Embora estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular tenham gerado sequências no *GenBank*, muitas delas foram diagnosticadas somente ao nível do gênero. A correta identificação destes parasitas é essencial para melhor entendimento da interação hospedeiro-parasita. Assim, a combinação da microscopia com métodos moleculares, e em alguns casos a realização de infeções experimentais, contribuem para a obtenção de informações sobre as características do parasita bem como permitem analisar coinfecções em aves por diferentes espécies de hemosporídeos. O presente trabalho visou identificar as espécies das linhagens de *Plasmodium* detectadas em aves amostradas na Fundação Parque Zoológicas de São Paulo (FPZSP) em um estudo anterior, através de um modelo experimental para o desenvolvimento eritrocítico de parasitas da malária. Paralelamente, buscou identificar hemosporídeos (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) em aves de vida livre da região Neotropical. Para a primeira proposta, 15 pintinhos *naives* foram inoculados com uma mistura de solução de citrato de sódio e sangue coletado de 8 aves da FPZSP. A cada 4 dias durante 35 dias, as aves inoculadas foram testadas para verificar a parasitemia através de esfregaços sanguíneos, onde constatou-se a presença de trofozoítos no 4° dia pós inoculação (dpi) nas aves inoculadas com sangue de *Pavo muticus* (pavão-verde). Porém, ao longo do período do experimento a parasitemia não aumentou. Não foram verificadas formas evolutivas dos parasitas e as poucas formas que existiam desapareceram. Ao fim de 35 dpi foram efetuados testes moleculares, porém as aves inicialmente positivas apresentaram resultados negativos, o que se acredita tratar de uma infecção abortiva. Em relação às aves de vida livre, foram testadas 531 amostras de sangue para a

identificação de hemosporídeos em comunidades de aves da região Neotropical. Dessas, 72 foram positivas para hemosporídeos. As amostras positivas foram sequenciadas tendo-se obtido 42 diferentes linhagens de *cytb*, sendo 12 *Haemoproteus*, 25 *Plasmodium* e 5 *Leucocytozoon*. Algumas das linhagens encontradas no presente trabalho já foram descritas no Brasil e em outros países, mas 18 linhagens são novas descrições. Entretanto, as baixas parasitemias encontradas nas lâminas positivas impossibilitaram a descrição de novas espécies. Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade do estabelecimento de um modelo para identificação de espécies de linhagens, assim como a importância da combinação microscopia/PCR/sequenciamento para a correta identificação de parasitas. Essas abordagens são essenciais para o conhecimento da biodiversidade e história evolutiva dos hemosporídeos, principalmente na região Neotropical.

Descritores: Malária. Aves. Infecção experimental animal. *Plasmodium*.

ABSTRACT

Comiche KJM. Avian malaria: erythrocytic development of parasites through experimental infection, identification and classification of new species of haemosporidian parasites (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

The taxonomy of avian malaria etiological agents is quite controversial, and most studies are based only on morphological identification. Although recent studies using molecular biology techniques have generated sequences in GenBank, many of them have been diagnosed only at the genus level. Correct identification of these parasites is essential for a better understanding of host-parasite interaction. Thus, the combination of microscopy with molecular methods, and in some cases the realization of experimental infections, contribute to obtain information on the parasite characteristics as well as to analyze different species of hemosporidian parasites in coinfections. The present work aimed to identify the species of *Plasmodium* lineages widely detected in birds sampled at the São Paulo Zoological Park Foundation (FPZSP) in a previous study, through an experimental model for the erythrocytic development of malaria parasites. At the same time, it sought to identify hemosporidian parasites (*Plasmodium*, *Haemoproteus* and *Leucocytozoon*) in free-living birds of the Neotropical region. For the first proposal, 15 naive chicks were inoculated with a mixture of sodium citrate solution and blood collected from 8 FPZSP birds. Every 4 days for 35 days, the inoculated birds were tested for parasitemia by thin blood smears, where trophozoites were found on the 4th post-inoculation day (dpi) in birds inoculated with *Pavo muticus* (green peafowl) blood. However, over the period of the experiment, parasitemia did not increase. No evolutionary forms of the parasites were verified and the few forms that existed disappeared. After 35 dpi, molecular tests were performed, but initially positive birds showed negative results, which is believed to be an abortive infection. Regarding free-living birds, 531 blood samples were tested for identification of hemosporidian parasites in Neotropical bird communities. Of these, 72 were positive and 42 different lineages of *cytb* were obtained: 12 *Haemoproteus*, 25 *Plasmodium* and 5 *Leucocytozoon*. Some of the lineages have already been described in Brazil and other countries, but 18 are new descriptions. However, the low parasitemias found in the

positive slides made it impossible to describe new species. The results obtained in the present study reinforce the need to establish a model for the identification species, as well as the importance of the microscopy/PCR/sequencing combination for the correct identification of parasites. These approaches are essential for knowledge of the biodiversity and evolutionary history of hemosporidian parasites, especially in the Neotropical region.

Descriptors: Malaria. Birds. Animal experimental infection. *Plasmodium*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo de vida do parasita do gênero *Plasmodium* que infectam aves, representando o ciclo no hospedeiro invertebrado e o ciclo no hospedeiro vertebrado 25

Figura 2 - Ciclo de vida do parasita do gênero *Leucocytozoon* que infectam aves, representando o ciclo no hospedeiro invertebrado e o ciclo no hospedeiro vertebrado. 27

Figura 3 - Distribuição dos hemosporídeos nas Regiões Zoogeográficas. 29

Figura 4 - Representação da dinâmica da parasitemia dos parasitas da Malária em aves. 34

Figura 5 - Localidades de estudo no Brasil e Argentina, nos Biomas Mata Atlântica, Caatinga e Floresta Andino Patagônica. 45

Figura 6 - Pintinhos previamente identificados com marcador permanente no corpo e inoculação de sangue infectado por injeção intravenosa na veia jugular. 47

Figura 7 - Representação esquemática dos fragmentos amplificados para o gene *Cytb* utilizando diferentes pares de *primers*. 49

Figura 8 - Esfregaços sanguíneos de aves silvestres de Michelin e Patagônia, corados com Giemsa evidenciando gametócitos de *Haemoproteus* sp. 61

Figura 9 - Esfregaços sanguíneos de aves silvestres do PARNA Saint Hilaire-Lange: referente a lâmina positiva para *Plasmodium* sp., meronte imaturo de *Plasmodium Cathemerium* (linhagem TACRUB04) e lâmina negativa para hemosporídeos com presença de microfilária. 61

Figura 10 - Fragmentos amplificados usando a PCR para a identificação de hemosporídeos (*Plasmodium*/*Haemoproteus*/*Leucocytozoon*). 62

Figura 11 - Prevalência dos hemosporídeos aviários nos locais amostrados. 67

Figura 12 - Filogenia Bayesiana baseada no gene mitocondrial de *Plasmodium* spp das linhagens identificadas no presente estudo. 71

Figura 13 - Filogenia Bayesiana baseada no *Cytb* mostrando a posição das linhagens de espécies de *Haemoproteus* encontradas neste estudo e, as linhagens obtidas da base de dados. 73

Figura 14 - Filogenia Bayesiana das linhagens do gene *Cytb* das espécies de *Leucocytozoon*, mostrando a posição da linhagem brasileira PESM160 (98%GRAQUI02)e as linhagens argentinas entre as linhagens representativas de *Leucocytozoon* do Genbank. 75

Gráfico 1 - Parasitemia da ave 10 inoculada com sangue de *Pavo muticus*, avaliada de acordo com os dias pós-inoculação por *Plasmodium* sp. (linhagem DENVID01) em esfregaços sanguíneos. 53

Gráfico 2 - Distribuição das aves amostradas segundo a ordem (percentagem das aves amostradas em função da ordem das aves). 54

Gráfico 3 - Número de aves amostradas por família 56

Gráfico 4 - Distribuição das aves positivas para hemosporídeos em função da ordem. 63

Gráfico 5 - Distribuição das aves positivas para hemosporídeos segundo a família. 63

Gráfico 6 - Distribuição das aves positivas em função do local de estudo. 65

Gráfico 7 - Distribuição das aves positivas em função do *status* migratório. 68

Gráfico 8 - Diversidade de linhagens de hemosporídeos encontradas nos locais de estudo com amostras positivas. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aves doadoras e as aves receptoras inoculadas 52
Tabela 2 - Número de aves amostradas por família em cada área de estudo. 57
Tabela 3 - Descrição das amostras positivas no diagnóstico microscópico e respectivo resultado no diagnóstico molecular. 60
Tabela 4 – Espécies de aves positivas para hemosporídeos. 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
Bp/pb	*Base pair*/pares de base
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Cytb	Citocromo b
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CBRO	Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos
Dpi	dias pós-inoculação
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FPZS	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
FTA	*Flinders Technology Associates cards*
°C	Graus *Celsius*
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente
ICB II	Instituto de Ciências Biomédicas
IUCN/ UICN	*International Union for Conservation of Nature's*/ União Internacional para Conservação da Natureza
µl	Microlitro
Ml	Mililitro
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
%	Percentagem
MalAvi	*Avian Malaria Iniciative*
PCR	*Polimerase Chain Reaction* (Reacção em Cadeia Polimerase)
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1 Etiologia 19
2.2 Epizootiologia 21
2.2.1 Ciclo de vida de hemosporídeos *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* 22
2.2.1.1 Ciclo de vida no hospedeiro invertebrado 22
2.2.1.2 Ciclo de vida no hospedeiro vertebrado 23
2.3 Epidemiologia 28
2.3.1 Distribuição geográfica e prevalência da malária aviária 28
2.3.2 Fatores que afetam a distribuição de hemosporídeos nos hospedeiros 30
2.3.3 Especificidade e susceptibilidade de Hospedeiros 32
2.4 Patogenia 33
2.5 Sinais clínicos 34
2.6 Diagnóstico 35
2.6.1 Identificação morfológica 35
2.6.2 Diagnóstico molecular 36
2.6.2.1 Diversidade de linhagens de hemosporídeos 37
2.6.3 Infecção experimental 38
2.7 Tratamento 40
3 JUSTIFICATIVA 41
4 OBJETIVOS 42
4.1 Objetivo geral 42
4.2 Objetivos específicos 42
5 MATERIAIS E MÉTODOS 43
5.1 Local de estudo e coleta das amostras 43
5.1.1 Área de estudo no Brasil 43
5.1.2 Área de estudo na Argentina 44
5.1.3 Captura e coleta de amostras das aves 45
5.2 Desenho experimental 46
5.2.1 Aves doadoras (aves do plantel) 46
5.2.2 Aves receptoras 46
5.2.3 Infecção por *Plasmodium sp* 46
5.3 Preparação de esfregaços sanguíneos 47

5.4 Extração de DNA genômico 48
5.5 Amplificação do gene mitocondrial *cytb* 48
5.6 Sequenciamento e análises das sequências 49
5.7 Análise dos resultados 50
5.8 Aspectos éticos 51
6 RESULTADOS 52
6.1 Infecção experimental com hemosporídeos 52
6.2 Prevalência e diversidade de hemosporídeos em aves silvestres 54
6.2.1 Descrição das aves silvestres capturadas 54
6.2.2 Detecção de hemoparasitas por microscopia ótica 59
6.2.3 Detecção de hemosporídeos por PCR 62
6.2.4 Perfil das aves positivas 62
6.2.5 Distribuição das aves positivas em função do local de estudo 65
6.2.6 Distribuição das aves positivas em função do *Status* migratório 67
6.2.7 Diversidade de hemosporídeos 68
7 DISCUSSÃO 77
7.1 Infecção experimental com hemosporídeos 77
7.2 Prevalência e diversidade de hemosporídeos em aves silvestres 80
8 CONCLUSÕES 85
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87
APÊNDICE A 90
APÊNDICE B 94
APÊNDICE C 96
ANEXO A 101
ANEXO B 103
ANEXO C 104
ANEXO D 105
ANEXO E 107

1 INTRODUÇÃO

As aves abrigam uma grande diversidade de parasitas sanguíneos, sendo os hemosporídeos pertencentes aos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* os mais estudados em relação à sua ecologia e evolução [1,2]. Estes parasitas são igualmente estudados porque os membros do gênero *Plasmodium* têm graves impactos sobre a saúde humana e de aves especialmente em países tropicais e subtropicais, onde causam a malária humana e aviária[1,3,4].

A malária aviária é uma importante doença infecciosa que acomete diversas espécies de aves, principalmente as aves cativas comprometendo deste modo a conservação[3,4]. Estudos em malária aviária possuem grande importância ecológica e são amplamente utilizados em investigações da interação parasita-hospedeiro, essenciais para conservação de espécies[2,5,6,7]. Os protocolos moleculares recentes para detectar e caracterizar linhagens de malária aviária, tem revelado uma grande diversidade genética dos parasitas maior que aquela sugerida pela taxonomia tradicional[8-10.]

Apesar da sensibilidade dos métodos moleculares comparativamente à microscopia, há limitações no seu uso na identificação de parasitas aviários devido à dificuldade de associar a sequência genética à respectiva espécie[11,12]. Vários têm sido os esforços para vincular as linhagens genéticas às espécies descritas, indicando a necessidade de mais estudos usando exame microscópico, análise molecular[13-17] e infeções experimentais[18,19]. A infeção experimental de aves constitui uma ótima abordagem para solucionar problemas de identificação de parasitas bem como para analisar a coinfecção, pois possibilita o isolamento da linhagem, o aumento da parasitemia e a visualização de todas as fases do ciclo eritrocítico[18,20]. Embora existam muitos estudos sobre hemosporídeos em aves, há poucos estudos sobre o gênero *Leucocytozoon* na região Neotropical[21-23]. A identificação de linhagens brasileiras adicionais será benéfica para a compreensão da história evolutiva deste gênero de parasitas quanto à prevalência, diversidade e distribuição na região Neotropical[23].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia

A malária aviária, também chamada de hemoproteose[1], leucocytozoonose[1.21,24], é uma doença infeciosa causadas por hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*[1,24] sendo transmitidos as aves por vetores dípteros hematófagos[4,5]. Os hemosporídeos (hemoprotozoários/hematozoários) são parasitas sanguíneos (hemoparasitas) que parasitam anfíbios, répteis, aves e mamíferos[4,5,25]. Os hemoparasitas descritos em aves compreendem os gêneros: *Atoxoplasma*, *Babesia*, *Haemoproteus*, *Hepatozoon*, *Leucocytozoon*, *Trypanosoma*, *Plasmodium* além de hemogregarinas e microfilárias [26,27].

Os hemosporídeos formam um grupo cosmopolita de protistas pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Haemosporida, da qual fazem parte as famílias Haemoproteidae, Garniidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae e dentre estas os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia* como segue na classificação taxonômica, segundo Valkiūnas[5]:

Reino: Protista (Haeckel, 1866)
- Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)
  - Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)
    - Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)
      - Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)
        - Familía: Haemoproteidae (Doflein, 1916)
          - Gênero: *Haemoproteus* (Kruse, 1890)
        - Familía: Plasmodiidae (Mesnil, 1903)
          - Gênero: *Plasmodium* (Marchiafava e Celli, 1885)
        - Família: Leucocytozoidae (Fallis e Bennett, 1961)
          - Gênero: *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)
        - Família: Garniidae (Lainson, Landau e Shaw, 1971)
          - Gênero: *Fallisia* (Lainson, Landau e Shaw, 1974)

O gênero *Plasmodium* é o grupo de parasitas sanguíneos mais bem estudado e conhecido pelo fato de incluir espécies tidas como agentes etiológicos da malária humana, uma doença comum em regiões tropicais[4]. As espécies de *Plasmodium* que infectam aves são divididas em cinco subgêneros classificados com base na morfologia dos gametócitos, merontes e preferência por eritrócitos maduros ou imaturos nomeadamente: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Bennettinia* e *Huffia*[4]. O subgênero *Haemamoeba* é o mais estudado sendo as espécies *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium relictum* e *Plasmodium cathemerium* com maior descrição do ciclo biológico[4,7,24]. Os parasitas do gênero *Plasmodium* são transmitidos por mosquitos da família Culicidae, sendo os gêneros *Culex*, *Mansonia*, *Culiseta* e *Aedeomyia* considerados vetores competentes e, *Aedes*, *Anopheles* e *Armigeres* com capacidade vetorial para transmissão do parasita para aves[1,4]. Os gêneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* e *Anopheles* são capazes de transmitir *Plasmodium relictum* no laboratório. Porém apenas três espécies foram comprovadas como vetores naturais de *Plasmodium relictum* na California e no Hawaii em condições laboratoriais, nomeadamente: *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis* e *Culex stigmatasoma* [1,28].

Os parasitas do gênero *Haemoproteus* destacam-se por serem os parasitas sanguíneos mais comuns e amplamente disseminados, que acometem uma grande diversidade de aves selvagens[1,4]. O gênero tem uma grande variedade de espécies e, subdivide-se em dois subgêneros nomeadamente: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*, sendo o subgênero *Haemoproteus* o que apresenta menor número de espécies (8 espécies) acometendo apenas aves da ordem Columbiformes (pombos e rolinhas) e algumas aves marinhas (Pelecaniformes e Charadriiformese). O subgênero *Parahaemoproteus* é o mais numeroso em espécies (137 espécies) e infecta as demais ordens, com exceção da ordem Columbiformes[1,24,26]. Os parasitas do subgênero *Parahaemoproteus* são transmitidos por membros da família Ceratopogonidae (mosquito-pólvora, maruins) gênero *Culicoides* e os do subgênero *Haemoproteus* por moscas da família Hippoboscidae sendo as espécies mais implicadas pertencentes aos gêneros: *Lynchia*, *Microlynchia*, *Ornithomyia*, *Pseudolynchia*, *Stilbometopa*[1,24].

O gênero *Leucocytozoon* subdivide-se em dois subgêneros nomeadamente: *Akiba* e *Leucocytozoon*, transmitidos por dípteros ornitofílicos da família Simulidae (borrachudo) e da família Ceratopogonidae, gênero *Culicoides* [4,24,27]. O subgênero *Akiba* é representado por uma única espécie, *Leucocytozoon caulleryi*, descrita em galinhas domésticas do Sudeste asiático[2,24], onde a ocorrência do parasita está relacionada com a localização das fazendas de frangos, nas

proximidades de fontes de água, habitat natural dos vetores (*Simulium* sp. e *Culicoides arakawae*)[29]. O subgênero *Leucocytozoon* apresenta uma grande diversidade de espécies descritas (cerca de 143) das quais 36 são válidas mediante abordagens morfológicas[21].

Há poucos estudos sobre os parasitas do gênero *Fallisia* em aves, sendo a maioria das espécies com desenvolvimento em répteis. Apenas a espécie *Fallisia neotropicalis* (subgênero *Plasmodioides*) acomete aves[4]. A espécie é considerada um achado raro, só tendo sido relatada na Venezuela, infectando aves da ordem Ciconiiformes e Columbiformes[4,24]. Pouco se sabe sobre o desenvolvimento no vetor, especulando-se que *Aedeomyia squamipennis* (Diptera: Culicidae) seja o vetor implicado na transmissão do parasito[4].

2.2 Epizootiologia

Os hemosporídeos compartilham características morfológicas e de desenvolvimento comuns[5]. Apesar de serem geneticamente relacionados, eles diferem nos vetores, ciclo de vida, bem como na sua epidemiologia[4,5]. Os estágios invasivos dos parasitas (merozoítos e esporozoítos) do filo Apicomplexa apresentam um complexo apical composto por organelas especializadas que são importantes para a adesão e invasão às células hospedeiras, são elas: micronemas, roptrias, grânulos densos, mitocôndrias, núcleo e microtúbulos subpeliculares[4,5,30,31]. Enquanto as características de desenvolvimento estão relacionadas com um ciclo de vida que ocorre alternando a reprodução sexuada (gametogonia) e assexuada (esquizogonia e esporogonia)[5].

A transmissão do parasita ao hospedeiro pode ocorrer por inoculação de esporozoítos presentes nas glândulas salivares do vetor durante o repasto sanguíneo ou também mediante inoculação de sangue contendo merontes/esquizontes eritrocíticos (via de infecção iatrogênica). A via iatrogênica pode ocorrer acidentalmente em procedimentos clínicos (p.e transfusão sanguínea) ou intencionalmente em estudos de infecção experimental, porém só é possível para os parasitas do gênero *Plasmodium*, uma vez que os gêneros *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* não possuem merontes circulantes[4,5,18,24].

O sucesso na transmissão dos hemoparasitas por um vetor depende da capacidade dos esporozoítos invadir e acumular nas glândulas salivares do vetor, da susceptibilidade das aves à

infecção, presença de vetor competente, virulência do parasito e das condições ambientais[2,30,32]. Estes fatores fazem com que mesmo em áreas endêmicas a malária, onde a taxa de transmissão é extremamente elevada apenas alguns mosquitos sejam infectados pelo parasita. Outros mecanismos referentes as defesas do vetor contra o parasito também vêm sendo descritos, eles incluem: as enzimas digestivas, a membrana peritrófica, mucinas, Óxido Nítrico Sintase (NOS) e serpinas que atuam nas diferentes fases de desenvolvimento do parasito no vetor podendo eliminar ou reduzir a sua viabilidade[33].

2.2.1 Ciclo de vida de hemosporídeos *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*

O ciclo de vida dos hemosporídeos é obrigatoriamente heteróxeno e bastante complexo com fases alternadas de reprodução sexuada e assexuada, exigindo um hospedeiro vertebrado e um vetor invertebrado hematófago (moscas ou mosquitos hematófagos) [4,5,25]. As fêmeas dos vetores hematófagos são os hospedeiros definitivos onde ocorre o ciclo sexuado, enquanto as aves são os hospedeiros intermediários onde se dá o desenvolvimento do parasita no sangue e outros tecidos[4,5].

2.2.1.1 Ciclo de vida no hospedeiro invertebrado

Em geral, o ciclo de vida dos hemosporídeos no vetor hematófago se assemelha nos diferentes gêneros[5]. Os vetores se infectam após a ingestão de gametócitos (masculinos e femininos) durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. Uma vez no estômago do vetor os gametócitos, diferenciam-se em macrogametas (feminino) e microgameta (masculinos). Durante a transferência do sangue do hospedeiro vertebrado para o vetor, a concentração de oxigênio e dióxido de carbono bem como a temperatura alteram, estimulando os gametócitos à gametogênese resultando num processo sexuado do tipo oogâmico. A gametogênese causa o arredondamento do gametócitos permitindo a sua liberação das células do hospedeiro vertebrado. Uma vez no intestino, os microgametas sofrem exflagelação e fusionam-se aos macrogametas no intestino médio do inseto onde ocorre a reprodução sexuada formando um zigoto móvel alongado (oocineto). Por sua vez, o oocineto migra até o epitélio e a lâmina basal do intestino (um dia após a ingestão) formando o oocisto, o qual é envolvido por

parede tipo cápsula construída a partir do material do hospedeiro. Durante o processo de desenvolvimento cada oocisto multiplica-se por esporogonia formando os esporozoítos (corpos alongados numerosos e haploides) que após o rompimento do oocisto maduro (10 a 14 dias), caem na hemolinfa e então penetram nas glândulas salivares do vetor aguardando um a continuidade do ciclo a partir de um novo repasto em um hospedeiro vertebrado suscetível (Figura 1 e 2). Os esporozoítos são as formas infectantes para as aves e são liberadas em pequenas quantidades da glândula salivar toda vez que o mosquito pica um hospedeiro vertebrado[4,5,7,24,25,30,33].

O processo alimentar dos insetos hematófagos é caraterizado por diferentes etapas: fase de sondagem, na qual ocorre a penetração das peças bucais na pele do hospedeiro e a localização do sangue e a fase de ingurgitamento, onde o alimento entra no canal alimentar[34]. A refeição sanguínea realizada por muitas espécies de insetos é indispensável para suprir suas demandas nutricionais, somente sendo possível evoluir e reproduzir-se realizando a hematofagia desde a primeira fase de vida até a fase adulta (p.e triatomíneos). Para o caso dos vetores da malária aviária, a hematofagia serve apenas como uma fonte de proteínas e aminoácidos necessária para a maturação dos ovários[35]. Durante a transferência do sangue do hospedeiro para o intestino médio, os insetos apresentam bombas de sucção localizadas na sua cabeça que funcionam criando uma diferença de pressão entre a abertura do canal alimentar na pele do hospedeiro e o lúmen da cavidade criada pela contração da musculatura associada às mesmas[36]. Durante a hematofagia, os insetos podem ter sua temperatura elevada até cerca de 20ºC, devido a rápida ingestão de sangue e, também pelo contato com o hospedeiro de modo a viabilizar a refeição sanguínea[35-38].

2.2.1.2 Ciclo de vida no hospedeiro vertebrado

O desenvolvimento do parasita no hospedeiro vertebrado pode ser dividido em 3 estágios nomeadamente: merogonia exoeritrocítica, merogonia eritrocítica e formação de gametócitos[4]. Embora o ciclo de vida dos hemosporídeos se assemelhe na fase sexuada, as diferenças entre os gêneros são verificadas na fase assexuada em relação a existência e o local onde ocorre cada uma desses estágios[5]. Para melhor entendimento de cada uma dessas fases, será feita uma

descrição do ciclo de vida dos parasitas do gênero *Plasmodium* (Figura 1) e posteriormente das variações constatadas nos gêneros *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (Figura 2).

Em geral o ciclo de vida do parasita na ave se inicia quando os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do vetor são inoculados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos podem invadir ou ser fagocitados por células endoteliais ou do sistema fagocítico mononuclear (SFM), de vários tecidos (em especial baço e pele) originando, por meio de esquizogonia, a primeira geração de merozoítos (criptozoitos), que não são capazes de infectar células sanguíneas. Os criptozoitos se desenvolvem e por meio de esquizogonia dão origem a uma segunda geração de merontes exoeritrocíticos primários (os metacriptozoitos também denominados merontes teciduais ou esquizontes teciduais), que se se desenvolvem em macrófagos de diversos órgãos por reprodução assexuada e rompem-se liberando uma grande quantidade de merozoítos. Os merozoítos resultantes desta etapa poderão seguir destinos distintos, dependendo de fatores endógenos e das condições do hospedeiro. Uma parte pode retornar ao ciclo de merogonia exoeritrocítica secundária induzindo ao desenvolvimento de uma nova geração de numerosos metacriptozoítos e fanerozoítos (também denominados merontes teciduais ou esquizontes teciduais) resultantes da reprodução assexuada de merozoítos das células endoteliais e mononucleares fagocíticas. A outra parte dos merozoítos que invade as células sanguíneas (tipicamente eritrócitos) pode continuar desenvolvendo-se em trofozoítos que por reprodução assexuada (esquizogonia) transformam-se em merontes eritrocíticos (também denominados esquizontes eritrocitários) ou desenvolvem-se por gametogonia nas formas sexuadas do parasita, macrogametócitos (femininos) e microgametócitos (masculinos) que são infectantes para outro artrópode hematófago. Os gametócitos permanecem nos eritrócitos sem se desenvolverem, até serem ingeridos por um hospedeiro invertebrado hematófago dando continuidade ao ciclo (Figura 1)[1,4,5,7,24,25].

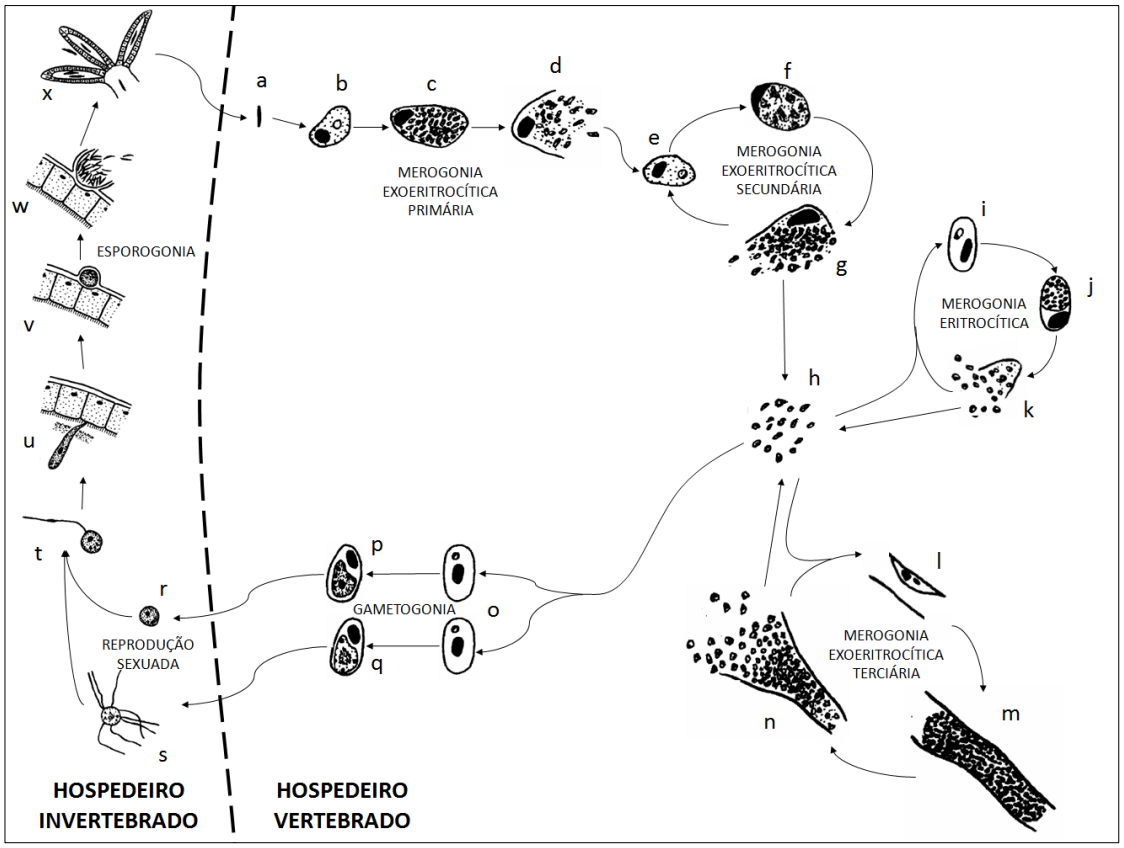


Figura 1 - Ciclo de vida do parasito do gênero *Plasmodium* que infectam aves, representando o ciclo no hospedeiro invertebrado (painel esquerdo) e o ciclo no hospedeiro vertebrado (painel direito)[24].

Legenda: (a) esporozoíto, (b) criptozoíto jovem, (c) criptozoíto maduro, (d) criptozoíto rompe-se liberando merozoítos, (e) metacriptozoíto jovem, (f) metacriptozoíto maduro, (g) metacriptozoíto rompe-se liberando merozoítos, (h) merozoítos, (i) trofozoíto, (j) meronte eritrocítico, (k) meronte eritrocítico rompe-se liberando merozoítos, (l) fanerozoíto jovem, (m) fanerozoíto maduro, (n) fanerozoíto rompe-se liberando merozoítos, (o) trofozoítos, (p) macrogametócito, (q) microgametócito, (r) macrogameta, (s) microgameta exflagelado, (t) zigoto móvel ou oocineto, (u) oocineto invade lâmina basal, (v) oocisto, (w) oocisto maduro liberando esporozoítos, (x) esporozoítos instalam-se nas glândulas salivares.

Os ciclos entre os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* diferem quanto ao local onde ocorre a esquizogonia e as formas infectantes presentes na corrente sanguínea[4,5]. Nos parasitas do gênero *Haemoproteus* a merogonia exoeritrocítica ocorre nas células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos (principalmente nos músculos estriados) onde são formados os megalomerontesc (megaloesquizontes). Enquanto nos parasitas do gênero *Leucocytozoon* a merogonia exoeritrocítica ocorre em células parenquimatosas do fígado (hepatócitos), macrófagos e nas células reticulo endoteliais onde geram grandes quantidades de sincícios e merozoítos que quando fagocitados originam megaloesquizontes. Apenas os parasitas do gênero *Plasmodium* realizam a merogonia eritrocítica, isto é, a esquizogonia dos demais gêneros só ocorre em células não circulantes (hepatócitos, células endoteliais vasculares) e a única fase de desenvolvimento encontrada nos eritrócitos são os gametócitos fato que impossibilita a infecção de hospedeiros vertebrados por inoculação de sangue infectado devido à ausência de merogonia no sangue[4,5,24]. Os merontes eritrocíticos dos parasitas do gênero *Plasmodium* desenvolvem nas células da série eritrocítica enquanto os gametócitos desenvolvem maioritariamente em eritrócitos maduros[4].

À semelhança de *Plasmodium*, os gametócitos do gênero *Haemoproteus* desenvolvem-se em eritrócitos maduros enquanto os do gênero *Leucocytozoon* para além dos eritrócitos, os gametócitos desenvolvem-se em eritoblastos e leucócitos[4]. A presença de merontes (esquizontes) e gametócitos em infecções por *Plasmodium* permite diferenciar dos demais gêneros de hemosporídeos, fato que é importante para a identificação, pesquisa experimental sobre a virulência, patogenicidade e outros aspectos da biologia da malária aviária[5,39]. Outro aspecto que permite diferenciar os parasitas é a presença de grânulos proeminentes dourados ou pigmentos negros resultantes da digestão da hemoglobina do hospedeiro designados pigmento malárico ou hemozoína[1,4,39]. A hemozoína contém a parte ferrosa da hemoglobina que não é digerida pelos parasitas dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, sendo acumulada em vacúolos nos gametócitos e células da série eritrocitária, nutridas pela hemoglobina[4]. Nos parasitas do gênero *Leucocytozoon*, os gametócitos e outros estágios do desenvolvimento parasitário, não apresentam a hemozoína, pois digerem a hemoglobina por completo[4].

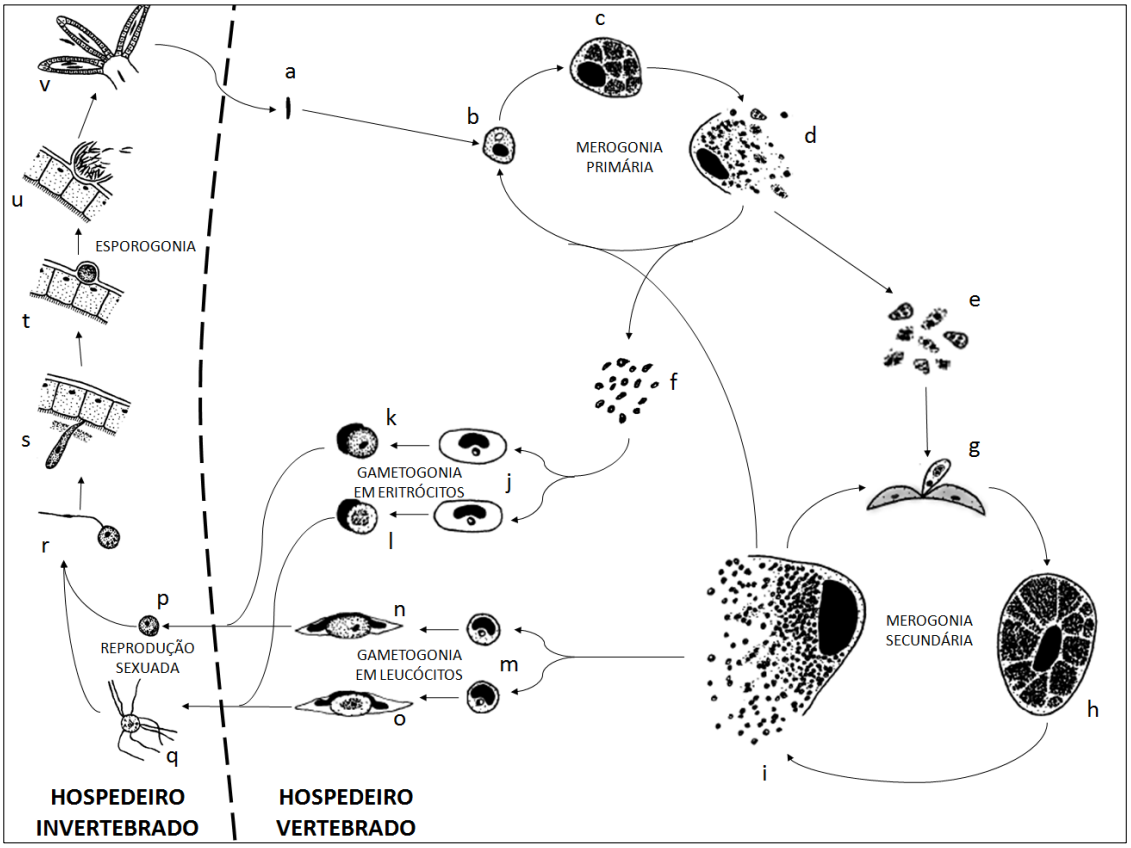


Figura 2 - Ciclo de vida do parasito do gênero *Leucocytozoon* que infectam aves, representando o ciclo no hospedeiro invertebrado (painel esquerdo) e Ciclo no hospedeiro vertebrado (painel direito)[24].

Legenda: (a) esporozoíto, (b) meronte hepático jovem, (c) meronte hepático maduro, (d) meronte hepático rompe-se liberando sincícios e merozoítos, (e) sincícios, (f) merozoítos, (g) sincício invade parede endotelial, (h) megalomeronte, (i) megalomeronte rompe-se liberando merozoítos, (j) merozoítos em eritrócitos, (k) macrogametócito arredondado, (l) microgametócito arredondado, (m) merozoítos em leucócitos, (n) macrogametócito fusiforme, (o)microgametócito fusiforme, (p) macrogameta, (q) microgameta exflagelado, (r) oocineto móvel, (s) oocineto móvel invade lâmina basal, (t) oocisto, (u) oocisto rompe-se liberando esporozoítos, (v) esporozoítos instalam-se nas glândulas salivares.

2.3 Epidemiologia

2.3.1 Distribuição geográfica e prevalência da malária aviária

Os hemosporídeos que infectam aves têm uma distribuição cosmopolita e são encontrados em todas as principais regiões Zoogeográficas, com exceção da Antártica (Figura 3)[1,4,21,24]. Devido à irregularidade da investigação da fauna nas regiões dentro das regiões Zoogeográficas, a distribuição dos hemosporídeos de aves é feita com base nas regiões Zoogeográficas[4]. A maioria das espécies de hemosporídeos está associada às regiões Holártica (123 espécies), Afrotropical (108 espécies) e Indomalaia (106 espécies) (Figura 3), sendo as regiões Australiana (22 espécies) e Neotropical (52), as que apresentam uma menor diversidade de espécies de hemosporídeos[4]. A menor diversidade de hemosporídeos na região Neotropical está relacionada com o padrão migratório das aves desta região, que faz com que apenas espécies de *Leucocytozoon* com distribuição mundial (*Leucocytozoon danilewskyi*, *L. dubreuili*, *L. fringillinarum*, *L. marchouxi* ocorram nessa região[4]. Apesar do número de espécies hemosporídeos na região Neotropical ser relativamente baixo comparativamente a região australiana, o número de espécies de *Plasmodium* é seis vezes maior. Por outro lado, a região Neotropical tem uma grande diversidade ornitológica aliada à dificuldade de acesso às aves comparativamente as demais regiões[4,14,40].

A prevalência das infecções por *Leucocytozoon* tende a aumentar das latitudes tropicais para as altas latitudes da região Holártica (Figura 3), provavelmente devido ao aumento da densidade das populações hospedeiras e à capacidade dos parasitas completarem o seu desenvolvimento nos vetores a temperaturas relativamente baixas. E na região Neotropical tende a baixar devido a ausência de espécies hospedeiras endêmicas, indicando que as infecções por *Leucocytozoon sp.* são secundárias nesta região, embora os parasitas sejam geralmente introduzidos por aves migratórias da região Holártica[4].

Nas áreas endêmicas como no Sudeste asiático, as infecções por *Leucocytozoon* ocorrem ao longo do ano. Existe uma correlação positiva entre as incidências de leucocitozoonose com a estação do ano e a localização das fazendas de criação de aves. Durante as mudanças sazonais, da estação chuvosa à estação seca e vice-versa, a frequência de incidências de leucocitozoonose

tende a aumentar. Isso se deve ao aumento das populações dos vetores (Simulideos e Culicoides) [28,32].

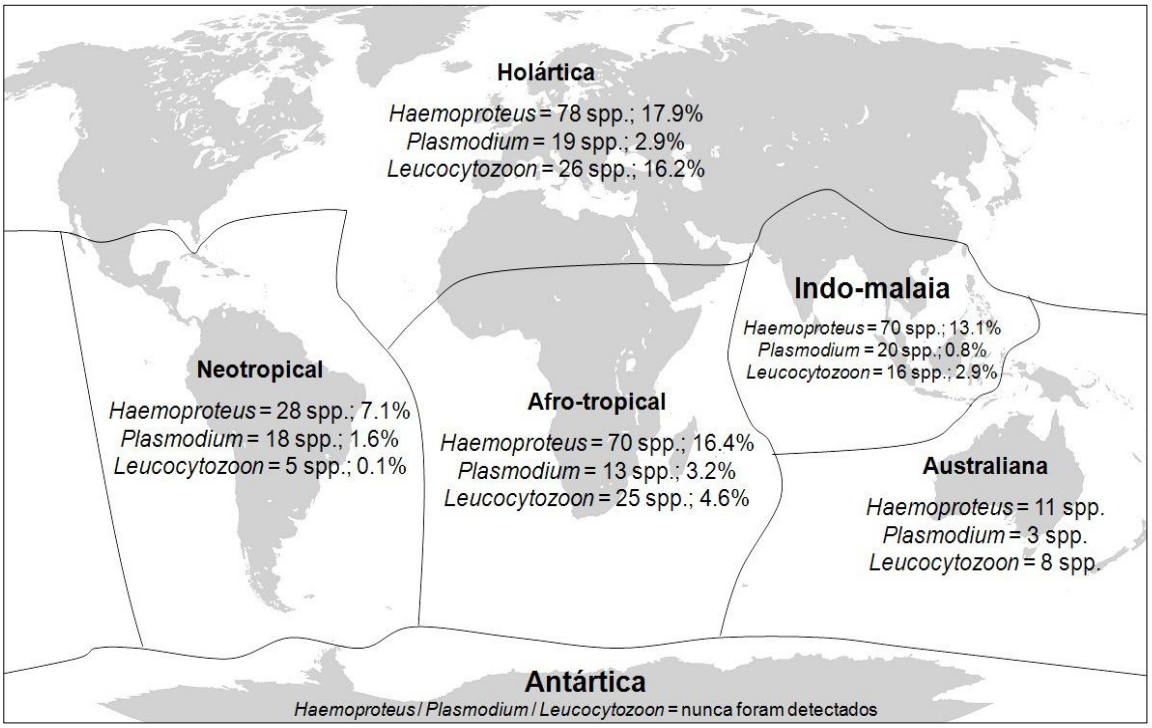


Figura 3 - Distribuição dos hemosporídeos nas Regiões Zoogeográficas[24].

A combinação de fatores como: a riqueza de espécies de *Leucocytozoon*, elevada prevalência de aves infectadas e a migração sazonal regular de aves de numerosas espécies da Região Holártica para o Sul durante o inverno, permite diferenciar a Região Holártica das demais regiões Zoogeográficas e considerar esta como o centro de dispersão de *Leucocytozoon sp.* [4]. Por outro lado, a riqueza de parasitas da malária na Região Afrotropical, Indomalaia e Neotropical, combinada com a transmissão ativa dos parasitas e a migração regular das aves da Região Holártica nas áreas de invernada, permite distinguir essas Regiões como de dispersão de *Plasmodium sp.* [4].

Estudos sobre a incidência e prevalência de hemosporídeos aviários em ambientes urbanos são escassos em todo o mundo [40], sendo realizados maioritariamente em regiões temperadas e com espécies nativas adaptadas ao meio urbano[4]. A presença de hemosporídeos foi avaliada na região tropical e temperada, onde foi encontrada uma prevalência varia de 50 a 80% na região tropical e de 50 a 70% nas regiões temperadas do Norte da América e Europa [4,5,41].

2.3.2 Fatores que afetam a distribuição de hemosporídeos nos hospedeiros

A epidemiologia dos hemosporídeos é bastante complexa, sendo influenciada por fatores relacionados com o hospedeiro invertebrado e vertebrado bem como o habitat[1,2,4,32,41]. No hospedeiro invertebrado, a temperatura é tida como um fator limitante. Considera-se que a temperatura ótima esteja em torno de 25ºC para a maioria das espécies, sendo que a esporogonia pode ser suspensa abaixo de 13ºC e a deterioração dos oocistos ocorra abaixo dos 4ºC. No entanto, há espécies que realizam esporogonia em temperaturas mais baixas (p.e. algumas espécies de *Leucocytozoon* apresentam temperatura ótima de 15ºC) [2,24,42]. Em baixas temperaturas, os hospedeiros invertebrados podem ter dificuldade para sobreviverem e/ou reproduzirem-se[24] fato que faz com que os hemosporídeos tenham um padrão de distribuição complexa de acordo com a sazonalidade e regiões geográficas. Deste modo, em Regiões Tropicais, os hemosporídeos disseminam-se durante todo ano, enquanto nas Regiões Temperadas a distribuição é dependente da sazonalidade, com elevada parasitemia e transmissão durante a primavera e verão, e um período de latência e ausência de parasitemia durante o outono e inverno[2,24]. Nas Regiões Temperadas, o pico de transmissão é verificado nas épocas quentes e úmidas, onde há maior abundância e atividade dos vetores, aliados à migração das aves dos locais frios para os locais de invernada de alimentos[24,43]. Além disso, as aves adultas com infecções crônicas e/ou recaídas constituem fontes de infecção e bem como a presença de aves jovens com baixa imunidade[1,4,5,7]. Porém, pouco se sabe sobre a dinâmica da infecção nas Regiões Tropicais[1], onde os vetores são ativos durante todo ano[4]. A distribuição também é modulada pela topografia e altitude: regiões de altitude elevada podem não apresentar condições apropriadas à existência dos hemosporídeos, regiões de altitude intermediária podem apresentar uma ocorrência estritamente sazonal e, em regiões de baixa altitude os hemosporídeos podem ocorrer de modo permanente devido a variação na disponibilidade dos vetores[2,4,24].

No hospedeiro vertebrado, a resposta imune é o principal limitante[24]. Os hemosporídeos são capazes de ficar latentes por períodos prolongados e causar recaídas em resposta a estímulos hormonais (sobretudo corticóides), alterações de fotoperíodo ou condições de estresse ou desafios imunológicos. Este padrão é particularmente evidente em muitas espécies de *Haemoproteus*, em que as "recaídas de primavera" são um fator determinante na epidemiologia destes parasitas[1,4,5,7,24].

Outro aspecto relacionado com a imunidade é a idade do hospedeiro vertebrado, pois acredita-se que as aves adultas são menos susceptíveis à infecção comparativamente às mais jovens[5]. Entretanto, por terem maior período de contato com os vetores comparativamente às aves jovens, geralmente têm maior probabilidade de serem infectadas e manterem a infecção por longos períodos de baixa infecção[4]. A prevalência da infecção em aves adultas é maior comparativamente às jovens. As aves adultas com infecções crônicas têm um papel importante como fonte importante de parasitas para os vetores e na manutenção das espécies de hemosporídeos na natureza, pois, segundo os ornitologistas, grupos dessa idade constituem a parte mais estável da população de aves[1,4,5].

A ocorrência da infecção no hospedeiro vertebrado pode também ser influenciada por fatores bióticos. Desta forma foram feitos os seguintes pressupostos: 1) longos períodos de nidificação podem incrementar a probabilidade de infecção por hemosporídeos, pois as aves são mais acessíveis e atrativas para os vetores; 2) espécies maiores e mais pesadas fornecem maior superfície para ataque por um grande número de vetores aumentando a probabilidade de inoculação de esporozoítos, além de emitirem enormes quantidades de CO_2, composto utilizado pelos vetores para localizar seus hospedeiros[34,44]; 3) ninhos fechados conferem maior proteção que os ninhos abertos; 4) as fêmeas são menos ativas que os machos durante a nidificação e por isso são mais susceptíveis a infecção; 5) a probabilidade de infecção em aves costeiras é menor devido a reduzida atividade dos vetores aliada as condições ambientais que não são favoráveis para a reprodução dos vetores; 6) a probabilidade de infecção de aves tende a reduzir em regiões com elevada atividade antropogênica (uso de pesticidas, inseticidas, poluição, desflorestamento)[2,4,41].

2.3.3 Especificidade e susceptibilidade de Hospedeiros

Alguns parasitas são mais específicos, outros são bem mais generalistas podendo acometer espécies *naives* durante o processo de mudança de hospedeiros[2]. De um modo geral os parasitas do gênero *Haemoproteus* são mais específicos em relação aos seus hospedeiros[24]. Essa característica tem dificultado o estabelecimento de modelos experimentais tanto em aves assim como vetores uma vez que a inoculação de sangue infectado é quase impossível[4,5]. Algumas espécies de *Haemoproteus* com elevada especificidade incluem: *H. palumbis* e *H. columbae* que não se desenvolvem mesmo em espécies de aves do mesmo gênero[4].

Os parasitas do gênero *Plasmodium* são na sua maioria generalistas, podendo se desenvolver em aves pertencentes a famílias e ordens distintas. Estudos filogenéticos demonstram que estes parasitas alternam hospedeiros durante a evolução, podendo a mesma linhagem infectar múltiplas espécies de hospedeiros[45]. Essa falta de especificidade e diferenças de susceptibilidade dos hospedeiros podem levar o parasita a desenvolver adaptações morfofisiológicas ao hospedeiro ou modificações relacionadas à intensidade de parasitemia[4,45]. Por outro lado, a flexibilidade na alternância de hospedeiros, bem como a susceptibilidade relatada em canários, pintinhos, patos e outras aves domésticas, são valiosas para manejo e prevenção da malária aviária em populações cativas e de vida livre, pois podem determinar potenciais hospedeiros e possibilitar a identificação de espécies[4,24,47]. Algumas aves são altamente suscetíveis à infecção por *Plasmodium sp.*, como pinguins (Sphenisciformes) e "*honeycreepers*" aves nativas do Havaí (Passeriformes: Drepanidinae), podendo levar a quadros clínicos graves e até ao óbito[1,4,24]. A alta suscetibilidade está relacionada com o fato destas aves não terem desenvolvido as respostas imunológicas apropriadas para lidar com estes parasitas, pelo fato de não terem convivido evolutivamente com hemosporídeos[4,24].

A maioria das espécies de *Leucocytozoon* é específica em relação aos seus hospedeiros, ao nível de ordem, família e em alguns casos espécie [21]. *Leucocytozoon caulleryi* é uma espécie estritamente específica. Este parasita se desenvolve frequentemente em galinhas domésticas[29], não infectando patos, gansos, perus e pombos domésticos[4]. Em geral, a infecção experimental de aves pertencentes a mesma ordem, porém de diferentes famílias não gera resultados satisfatórios quando infectadas com as mesmas espécies de *Leucocytozoon*[4]. Não há relatos de hemosporídeos aviários sendo transmitidos a espécies não-aviárias, de modo que se aceita que estes parasitas não apresentam risco zoonótico[24,48].

2.4 Patogenia

A malária aviária é primariamente uma doença do sangue e do sistema retículo endotelial, e o progresso da doença e dos sinais clínicos está intimamente ligado ao aumento do número de parasitas na circulação periférica[1,49]. Pouco se sabe sobre a patogenia das infecções por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* em hospedeiros naturais ou experimentais, devido à menor severidade destes processos[24], por isso será feita uma descrição baseada na patogenia dos parasitas do gênero *Plasmodium.*

A infecção das aves por hemosporídeos inclui as seguintes fases (Figura 4): 1- pré - patente, antes da emergência das primeiras formas parasitárias sanguíneas. Em aves infectadas experimentalmente as aves excretam fezes esverdeadas 4 dias após a inoculação; 2 - aguda, caracterizada pelo surgimento das primeiras formas sanguíneas, a parasitemia cresce rapidamente até atingir um pico, a fase de crise. Nessa fase é verificada uma diarreia mucoide esverdeada brilhante, que persiste por 2 dias nas aves que sobrevivem à infecção; 3 - crise, quando a parasitemia alcança o seu pico em torno do vigésimo primeiro dia pós infecção. A crise persiste por aproximadamente 7 dias e, então a parasitemia começa a reduzir gradualmente até chegar aos níveis crônicos de infecção. Nessa fase há uma boa correlação entre a parasitemia periférica e os sinais clínicos; 4 – crônica, onde poucos parasitas são encontrados no sangue. Momentos de imunossupressão do hospedeiro ou em resposta à sazonalidade durante esta fase podem resultar num aumento da parasitemia (recrudescência); 5- fase latente, quando os parasitas desaparecem do sangue periférico, persistindo nos órgãos[1,4,24].

A patogenicidade da malária aviária difere durante as fases aguda e crônica da doença e o aparecimento de sinais clínicos está associada com a fase aguda da infecção, que pode progredir rapidamente. As infecções crônicas provavelmente persistem por toda a vida nas aves infectadas, e tanto os parasitas circulantes quanto os merontes exoeritrocitários persistentes podem servir como fonte de infecções recrudescentes. Uma recaída de parasitemia ocorre na maioria das espécies de hemosporídeos durante o período reprodutivo do hospedeiro vertebrado, o que facilita a infecção de vetores e a transferência da infecção para os filhotes[4].

Em infecções por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, a ocorrência de recaídas de primavera é bem definida e joga um papel importante na epidemiologia destes parasitas. No caso de *Plasmodium*, episódios de estresse e imunossupressão (tratamentos com corticoides) podem induzir a

recrudescência em animais clinicamente curados e livres de parasitemia por longos períodos[1,4,5,24].

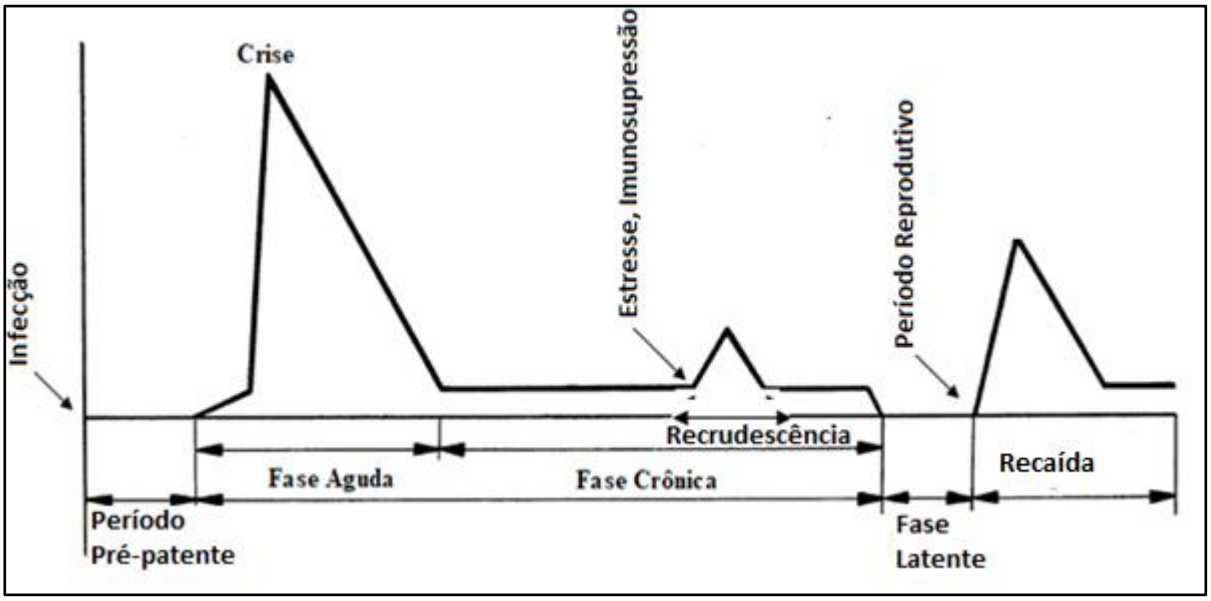


Figura 4 - Representação da dinâmica da parasitemia dos parasitas da malária em aves[4].

2.5 Sinais clínicos

As infecções por hemosporídeos em aves são normalmente subclínicas ou resultam apenas em alterações clínicas discretas. Mas em casos particulares ou em aves altamente suscetíveis, como pinguins e *honeycreepers* podem levar a quadros clínicos graves e até ao óbito. Quando presentes os sinais clínicos incluem: convulsão, letargia, anorexia, penas eriçadas, dispneia, diarreia, regurgitação, esplenomegalia, hipertermia ou hipotermia, cabeça decaída, sonolência, paralisia das patas, tremores e, em casos de alta parasitemia, pode ocorrer palidez das mucosas, prostração e morte. Em aves domésticas infectadas por *L. caulleryi* a morte pode ocorrer 7 a 10 dias após a infecção ou podem recuperar com sequelas que incluem baixo desenvolvimento e redução na produção de ovos[4,5,24].

Estudos experimentais podem levar a laminites, depressão, diarreia com fezes esverdeadas (excesso de biliverdina associado à hemólise), cuja evolução acompanha diretamente a progressão da parasitemia. Em estudos detalhados de galinhas infectadas experimentalmente

com *P. gallinaceum*, os sinais clínicos tornam-se primeiros notáveis de 5 a 7 dias após a inoculação de sangue infectado. Dentre os parasitas da malária aviária, *Plasmodium durae*, *P. juxtanucleare*, e *P. gallinaceum* são os que frequentemente são observados em surtos, especialmente de malária severa em aves domésticas[1,4,5,24,48,49].

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da malária aviária é baseado nas características morfológicas dos parasitas observados através de exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, principalmente durante os estágios eritrocíticos, porém é dificultado pela ausência de sinais clínicos e pela baixa parasitemia. O diagnóstico pode ser reforçado por técnicas de biologia molecular, infecção experimental em pintinhos, canários e patinhos, sorodiagnóstico e a imuno-histoquímica, sendo estes procedimentos aplicados para a pesquisa científica[4,5,24].

2.6.1 Identificação morfológica

O padrão de ouro para o diagnóstico da malária aviária é o esfregaço sanguíneo delgado corado com Giemsa onde é possível demonstrar a presença de formas sanguíneas do parasita dependendo do gênero dos hemosporídeos. O esfregaço ou gota espessa, preconizado para o diagnóstico de malária em mamíferos, não deve ser utilizado para as aves devido à sobreposição dos núcleos dos eritrócitos[1,4,24]. A identificação morfológica de parasitas da malária é baseada na chave taxonômica publicada por Valkiūnas[5], onde a descrição é feita através das características morfométricas das formas parasitárias encontradas no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados como: (i) a distribuição, a forma, o tamanho e a quantidade dos pigmentos de hemozoína; (ii) a influência do parasita nas células infectadas; (iii) e o tamanho e forma do parasita em relação ao núcleo do eritrócito infectado[1,4,26,46].

O diagnóstico de parasitas do gênero *Leucocytozoon* em esfregaço delgado é feito pela demonstração da presença gametócitos cujas características morfológicas são muito particulares[24]. Os gametócitos deste gênero podem ser vistos nos eritrócitos e leucócitos, são alongados, grandes e sem pigmento malárico podendo distorcer completamente a célula

hospedeira, ao ponto de não se reconhecer[26,48]. A proporção e a forma dos gametócitos variam ao longo do curso da infecção: na fase inicial há predominância de formas arredondadas (8-14 dias), as formas fusiformes apresentando as extremidades alongadas surgem mais tarde (12-18 dias). As formas parasitárias de *Leucocytozoon* são relativamente frágeis e podem sofrer ruptura e distorção durante a elaboração do esfregaço delgado, sobretudo os microgametócitos, criando figuras atípicas que podem ser facilmente confundidas com artefatos e/ou debris celulares[4,21,24,26].

A presença de merontes eritrocíticos e gametócitos com pigmentos granulares pretos ou acastanhados proeminentes é um achado característico da infecção por parasitas do gênero *Plasmodium*, porém sua ausência não é suficiente para excluir a presença destes parasitas nem sua presença é suficiente para excluir a possibilidade de uma infecção mista por *Plasmodium* e *Haemoproteus*, uma situação comum que dificulta a identificação dos hemosporídeos apenas pelo diagnóstico morfológico, havendo a necessidade de combinação com as técnicas moleculares como o sequenciamento genético, para determinar a(s) espécie(s) de hemosporídeos(s) [1,4,7,11,24,48].

Os gêneros *Haemoproteus* e *Plasmodium* apresentam o maior desafio na diferenciação, dadas suas semelhanças morfológicas. Uma característica particular de *Haemoproteus* e *Plasmodium* é que suas formas eritrocitárias adultas, gametócitos e merontes eritrocitários, apresentam a hemozoína que é refringente à microscopia de luz polarizada, auxiliando a sua identificação[24]. A identificação individual de espécies *Plasmodium* é tradicionalmente definida pelo tamanho e forma dos gametócitos intraeritrocíticas e merontes, número de merozoítos produzidos por merontes maduros, mudanças na morfologia dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado bem como as características como hospedeiros, espécies de mosquitos suscetíveis, morfologia e localização dos merontes exoeritrocíticos[1,4,5,46,48].

2.6.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem ganhado destaque no diagnóstico das hemosporídeos, sobretudo na pesquisa científica. A técnica pode ser aplicada em amostras de sangue de aves vivas (sangue total, coágulo ou papa de hemácias, preservados por congelamento ou em papel filtro ou etanol absoluto) ou em amostras teciduais de aves

mortas (baço, fígado, pulmão, medula óssea, preservadas por congelamento ou etanol absoluto)[24]. O diagnóstico molecular tem uma vantagem sobre o morfológico uma vez que permite detectar hemosporídeos com parasitemia baixa (indetectáveis pelo esfregaço delgado), particularmente em infecções crônicas [50,51].

O uso de marcadores moleculares como 18S e principalmente o citocromo b (*cytb*) incrementaram a possibilidade de detetar infecções por hemosporídeos em aves[11,27] e possibilitaram o uso de sequências genéticas como critério adicional para identificação e classificação de parasitas bem como informações sobre a diversidade genética, filogeografia, filogenia e especificidade em relação ao hospedeiro vertebrado[8,10]. Vários pares de *primers* projetados para amplificar porções do genoma mitocondrial do parasita, permitem distinguir *Haemoproteus* e *Plasmodium* de *Leucocytozoon* ou todos os três gêneros um do outro após digestão de restrição de produtos de PCR[10,11]. No entanto, o sequenciamento de produtos de PCR é necessário para identificar linhagens individuais de parasitas e determinar relações filogenéticas. As sequências parciais do *cytb* são depositadas num banco de dados específico para hemosporídeos aviários – o MalAvi, permitindo deste modo maior disponibilidade de informação do parasita[11].

O advento das técnicas moleculares permitiu a descoberta de uma grande diversidade de hemosporídeos maior que aquela sugerida pela taxonomia tradicional. O *cytb* tornou-se um gene *DNA barcoding* para a malária aviária tendo revelado numerosas linhagens genéticas. O uso crescente dos métodos moleculares levou a numerosas sequências no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e MalAvi que foram identificadas apenas ao nível do gênero, não tendo sido possível identificar paralelamente a morfoespécie[7-11,24,27,45].

2.6.2.1 Diversidade de linhagens de hemosporídeos

A diversidade de linhagens de hemosporídeos vem aumentando com o advento da biologia molecular. Estudos moleculares identificaram mais de 1300 linhagens de hemosporídeos, levando à criação de uma base de dados coordenada (MalAvi). O banco de dados MalAvi (http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/) constitui um recurso inestimável que cataloga todas as linhagens descritas atualmente bem como as respetivas morfoespécies, distribuição geográfica e seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os padrões biogeográficos da

diversidade parasitária são úteis para determinar como as interações parasita-hospedeiro podem influenciar a especiação[11,27].

A linhagem dos hemosporídeos é definida a partir da região amplificada pelos *primers* HAEMF e HAEMR2 (479 pares de base-bp) para parasitas do gênero *Plasmodium* e *Haemoproteus*[11], e *primers* HAEMFL e HAEMR2L (480 bp) para parasitas do gênero *Leucocytozoon*[10] (Figura 7). Apesar do DNA mitocondrial dos hemosporídeos ser menor dentre os eucariotas (aproximadamente 6000 bp), a região HAEMF e HAEMR2 captura mais haplótipos que os que seriam achados na análise de todo gene citocromo b, sendo suficiente para a identificação de linhagens. No entanto, a maioria das linhagens não é de espécies descritas, sendo definidas com base nas variações genéticas e espécie do hospedeiro. Deste modo, as linhagens de hemoparasitos diferindo por 3 ou mais substituições nucleotídicas ou 0,5% são consideradas linhagens distintas principalmente quando encontradas em diferentes espécies de aves. Se a divergência genética for acima de 0,5%, porém encontrada na mesma espécie, é tida como a mesma linhagem do parasita. É importante enfatizar que algumas espécies de parasitas podem apresentar uma grande diversidade de linhagens infectando um único hospedeiro ou também várias linhagens infectando diferentes hospedeiros [27,44,47,52,53]. A nomenclatura da linhagem usa um acrônimo que corresponde a abreviatura da espécie do hospedeiro (em latim ou inglês) na qual a linhagem foi inicialmente descrita, seguida pelo número (p.e GRW01, *great reed warbler* linhagem 1)[11].

2.6.3 Infecção experimental

A infecção experimental de aves foi preconizada por muito tempo como modelo importante para o estudo da malária humana[46,54]. Com a descoberta dos parasitas da malária em roedores e o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, a abordagem científica do *Plasmodium* em aves começou a decrescer no final do século XX. Contudo, os conhecimentos adquiridos dos estudos pioneiros de hemosporídeos aviários bem como o seu significado na biologia conservativa e evolucionária[11,56] contribuíram para o uso desses parasitas em estudos sobre diversidade de parasitas, interação parasita-hospedeiro, ciclo de vida, interação durante coinfecções, esclarecimento de variações genéticas e análise da expressão do gene durante infecções primárias[4,7,18,19,27,46,49]. A realização de estudos desta natureza é uma oportunidade para a identificação morfológica do parasita e o desenvolvimento

dos marcadores moleculares para melhor identificação da espécie dos hemosporídeos aviários bem como as suas respectivas linhagens[18,39,52].

A infecção experimental pode ser feita mediante inoculação de sangue com a participação do vetor infectado ou pela inoculação de sangue através de uma seringa[4]. A inoculação de sangue em um ou mais hospedeiros susceptíveis *naives*, é tida com um método com muita sensibilidade na identificação de *Plasmodium* em infecções crônicas. Nessas infecções a detecção de parasitas em esfregaços sanguíneos passa despercebida na maioria das vezes. Entretanto, as aves inoculadas ampliam a infecção para uma parasitemia maior, facilitando o diagnóstico através de esfregaço delgado e garantindo uma melhor caracterização morfológica das formas eritrocíticas. Essa técnica não pode ser usada no diagnóstico de infecções por *Leucocytozoon* e *Haemoproteus*, porque apenas os gametócitos são encontrados nas células circulantes, mas pode ser usada para separar infecções mistas por *Plasmodium* e *Haemoproteus*[4,5,18,19].

A inoculação de sangue pode ser feita pela via intravenosa, subcutânea ou intramuscular, utilizando-se sangue fresco coletado com anticoagulantes ou crio-preservado (conservado em glicerina ou dimetilsulfóxido e congelado em nitrogênio líquido). A criopreservação de sangue infectado de aves, geralmente tem sido efetiva quando a parasitemia está acima de 1%, requerendo métodos para isolar e manter os baixos níveis de parasitemia de Plasmodium das aves selvagens para posterior uso em ensaios de competência vetorial em mosquitos ou inoculação como o caso de citrato de sódio (CPDA)[4,19,24,57].

Atualmente são consideradas dois meios de obtenção dos parasitas da malária aviária a partir de aves na natureza. O primeiro método consiste em colocar aves sentinelas em gaiolas que protegem elas dos potenciais predadores, mas que permitam a entrada dos mosquitos, no local onde a transmissão do parasita de interesse foi documentada. O segundo método pelo qual o parasita poderá ser obtido da natureza é mediante o uso de aves selvagens diretamente da natureza do local onde a espécie *Plasmodium* alvo foi reportada. A infecção bem como a parasitemia deverá ser controlada semanalmente durante um mês por microscopia e/ou PCR. Caso as aves testem positivas à infecção, o sangue das aves poderá ser coletado e refrigerado (curto período) ou preservado em nitrogênio líquido (longo período) ou também poderão ser levadas ao laboratório para serem doadoras de sangue infectado para aves *naives* ou suscetíveis ou ser usadas para prover sangue infectado diretamente ao vetor de interesse. A falta de

protocolos para a preservação de sangue infectado refrigerado por curto período tem sido uma das dificuldades. Outro impasse decorrente de uso de aves selvagens é a probabilidade de encontrar o indivíduo infectado com espécie de *Plasmodium* alvo, especialmente quando se trata de espécie que ocorrem com baixa prevalência e parasitemia na população de aves ou em locais com múltipla transmissão de *Plasmodium spp.* e outros hemosporídeos relacionados, havendo o risco de a ave ser exposta a múltiplas coinfecções[17-20,46,57,58].

2.7 Tratamento

Ainda não existem fármacos antimaláricos disponíveis comercialmente ou aprovados para o tratamento de bandos de aves[48]. Preconizando-se o tratamento em casos de relevância clínica (espécies suscetíveis, aves debilitadas, alta parasitemia, sinais clínicos evidentes)[24]. A persistência da parasitemia ou recaídas pode ocorrer durante e após o tratamento, havendo necessidade de criar medidas de controle ajustadas[48].

O tratamento envolve a combinação de fármacos, sendo um contra as formas parasitárias teciduais (primaquina) e outro contra as formas parasitárias sanguíneas (cloroquina, derivados do quinina, trimetroprim-sulfa)[24]. Os fármacos anticoccidianos (sulfamonometoxina, sulfacloropirazina e halofuginona) são pouco eficazes no tratamento da *P. durae* em perus domésticos, mas podem ser eficazes contra *P. gallinaceum.* A sulfamonometoxina suprime a parasitemia, mas não fornece proteção total contra a mortalidade quando administrada após o aparecimento de parasitas circulantes. A sulfacloropirazina reduz a mortalidade, mas não tem efeito sobre a parasitemia, sugerindo que ela tem alguma eficácia contra os esquizontes exoeritrocíticos. A halofuginona retarda a parasitemia, mas a suprime apenas em menor grau[48,59].

3 JUSTIFICATIVA

Em estudo anterior realizado por nosso grupo em Aves na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), foram colhidas 1254 amostras, de 677 indivíduos, de 123 espécies, 29 famílias e 17 ordens[13]. Das 17 ordens amostradas, 11 foram encontradas positivas para hemosporídeos, com 85 indivíduos positivos por PCR para *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus*[15]. Algumas aves foram positivas por PCR, mas não tiveram a espécie de *Plasmodium* identificada. Dentre os 85 indivíduos encontrados positivos, 14 linhagens de *Plasmodium* foram detectadas. Dessas, apenas duas tinham espécie descrita: DENPET03 (*P. nucleophilum*) e GRW06 (*P. elongatum*). Das 12 linhagens de *Plasmodium sp*. detectadas, seis foram novas descrições[15], sendo que em nenhuma foi possível identificar a espécie até o momento. As linhagens (NYCNYC01 e PESA01) amplamente detectadas no zoo (43% das infecções) são da mesma espécie de *Plasmodium*, subgênero *Haemamoeba*. Embora a sequência *cytb* de NYCNYC01 apresente 96% de identidade com *P. gallinaceum*, trata-se provavelmente de uma nova morfoespécie, visto que não apresenta as características morfológicas desta espécie (Gediminas Valkiūnas, comunicação pessoal). A identificação morfológica e determinação da espécie de *Plasmodium* dessa linhagem ficaram comprometidas devido às baixas parasitemias e presença de infecções mistas com *Haemoproteus*. A linhagem DENVID01, com sequência *cytb* com 97% de identidade com *P. nucleophilum*, também mostrou indícios morfológicos de nova espécie do subgênero *Novyella*, justificando também a realização de infecções experimentais (Gediminas Valkiūnas, comunicação pessoal).

Nos estudos sobre a prevalência de hemosporídeos aviários realizados no Brasil, poucos fazem menção à prospecção da presença de *Leucocytozoon*. Recentemente foi feita a primeira descrição de sequência genética de *Leucocytozoon* no Brasil, em *Lepidothrix coronata* na região central da Amazônia. Esse estudo foi conduzido em populações de aves da Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal usando um protocolo que combina *real time* PCR, *nested* PCR e microscopia. Foram detectadas cinco amostras positivas para *Leucocytozoon* através do diagnóstico molecular, porém nenhuma lâmina foi examinada nessas amostras. As sequências das amostras positivas revelaram que as cinco amostras foram infectadas pela linhagem LEPCOR08 (atualmente denominada SETAUD30), não tendo sido possível chegar à espécie de *Leucocytozoon*[23]. Deste modo torna-se necessário o delineamento de estudos que possam contribuir para a identificação de *Leucocytozoon* bem como a diversidade de hemosporídeos em aves brasileiras.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

a) Contribuir na identificação e classificação de espécies de *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* por microscopia e DNA *Barcoding*.

4.2 Objetivos específicos

a) Testar um modelo experimental para o desenvolvimento eritrocítico de parasitas da malária aviária;
b) Identificar as espécies de *Plasmodium* em aves da FPZSP com infecção crônica;
c) Avaliar o efeito da inoculação de sangue heterólogo nas aves receptoras;
d) Determinar a distribuição geográfica e a prevalência das linhagens de hemosporídeos detectados.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de estudo e coleta das amostras

No presente estudo foram usadas amostras de sangue de aves cativas (do plantel) da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) para a infecção experimental e de aves de vida livre (oriundas da colaboração com o Dr. Alan Fecchio do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, Dr Fábio Schunck do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo e Dr Victor Cueto do Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), CONICET – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel, Chubut, Argentina) para determinar a distribuição geográfica de hemosporídeos. As amostras das aves de vida livre foram coletadas entre 2016 e 2018, em diferentes áreas geográficas do Brasil e Argentina. O mapa na Figura 5 indica os locais onde foram coletadas as amostras.

O procedimento experimental foi realizado em pintinhos no Biotério de Aves do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) II, da Universidade de São Paulo.

5.1.1 Área de estudo no Brasil

Foram amostradas aves silvestres de áreas de conservação situadas em estados costeiros caracterizados pela presença de Mata Atlântica ou Caatinga:

a) CEB - Centro de Estudos da Biodiversidade Michelin/ Reserva Ecológica Michelin: é um fragmento de Mata Atlântica, localizado à 177 km ao sul da capital, Salvador, Bahia, entre os municípios de Ituberá e Igrapiúna. A reserva incorpora as florestas das duas margens do Rio Cachoeira Grande (13°46'56.45"S; 39°10'0.71"W) e segue o rio no sentido oeste/sudoeste por 3,2 km acima da cachoeira, e termina no limite ocidental (13°47'50.95"S; 39°11'18.31"W).

b) Fazenda Tunico – Milagres: localiza-se no município de Milagres, Bahia, BA (12°54'47.4"S; 39°49'39.7"W). O território é composto pelo bioma Caatinga.

c) Reserva Biológica de Guaribas (REBIO Guaribas): é uma reserva de Mata Atlântica com uma área de 4.051,62 hectares, situada nos municípios de Mamanguape e Rio Tinto (6°43'17"S; 35° 10' 49"W) no Estado da Paraíba, PB.

d) Núcleo Curucutu: é um dos dez núcleos que compõe o Parque Estadual da Serra do Mar (PESM). Está localizado entre as regiões metropolitanas de São Paulo e da Baixada Santista, SP (23°59'37.3"S 46°43'58.1"W). Está inserido na Mata Atlântica e apresenta ambientes variados como os Campos Nebulares e Matas Nebulares.

e) PNSHL- Parque Nacional Saint Hilaire-Lange (PARNA): é um *hotspot* de Mata Atlântica localizado no litoral do estado do Paraná, abrangendo os municípios de Matinhos, Guaratuba, Morretes e Paranaguá (25°40'21"S; 48°38'44"W).

f) PUCRS Pró-Mata: é uma área de cerca de 3.100 hectares de Mata Atlântica, localizada na região nordeste do Rio Grande do Sul, RS, no Planalto das Araucárias e borda da Serra Geral e abrange parte dos municípios de São Francisco de Paula, Maquiné e Itati (29°28'49.4"S; 50°10'27.2"W).

5.1.2 Área de estudo na Argentina

As amostras foram coletadas no Rancho Cañadón Florido (42° 55' S, 71° 21' W), Esquel, na província de Chubut, Argentina (Figura 5). Uma área de ecótone entre Floresta Andino Patagônica e Estepe Patagônica caracterizada pela predominância de aves migratórias de longas distâncias. A inclusão das amostras desta região está relacionada com o fato das guaravacas-de-crista-branca *Elaenias albiceps chilensis* (Aves: Tyrannidae) desta região migrarem durante o inverno para o Brasil. As aves migrantes têm um papel importante na disseminação de doenças e na prevalência de hemoparasitas, característica relevante para inclusão desta espécie no presente estudo.

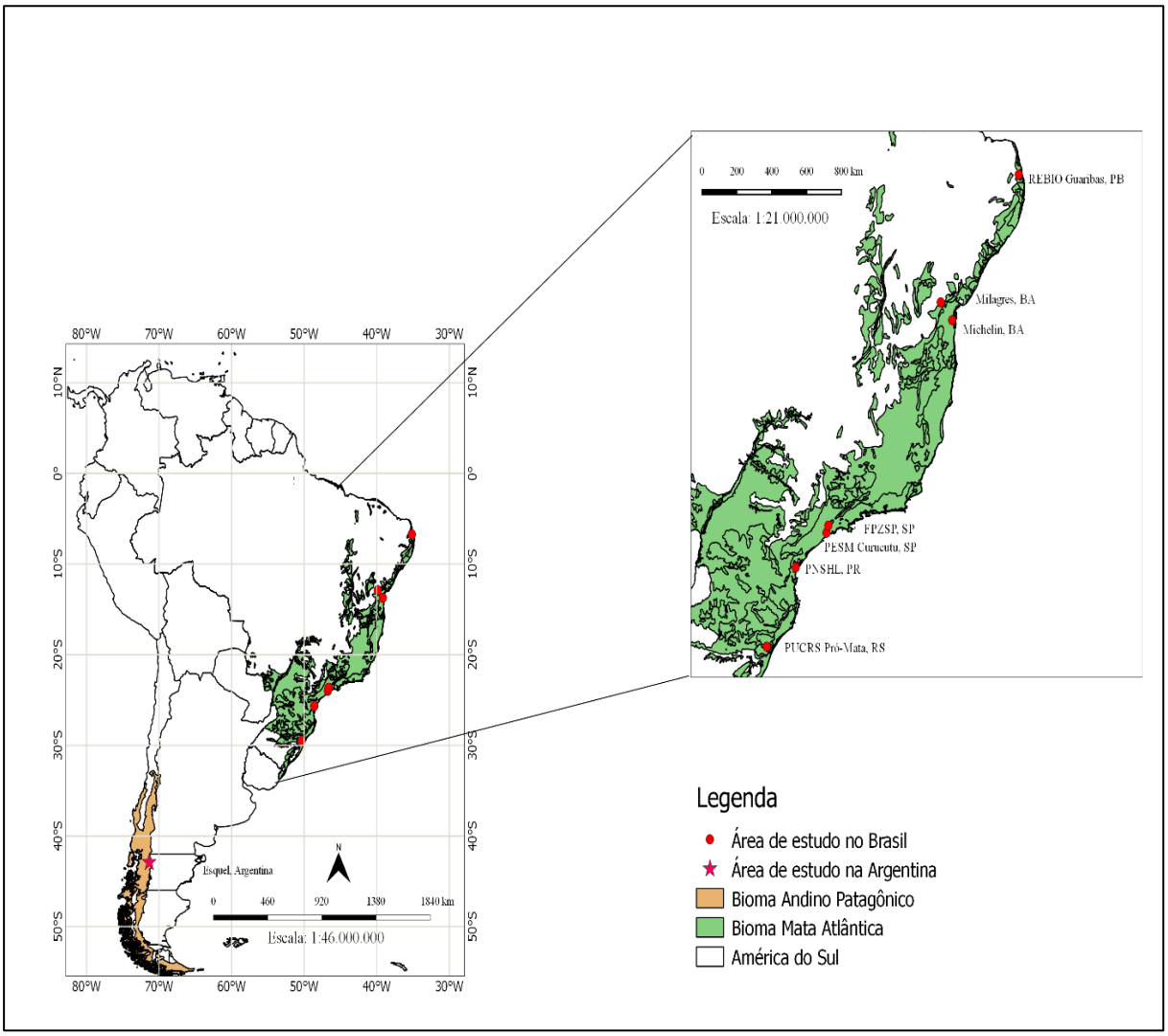


Figura 5 – Localidades de estudo no Brasil e Argentina, nos biomas Mata Atlântica, Caatinga e Floresta Andino Patagônica.

5.1.3 Captura e coleta de amostras das aves

As aves foram capturadas com redes de neblina de 12 m de comprimento por 2,5 de altura e malha de 35 mm. As redes permaneciam abertas desde o nascer do sol até ao final da manhã e eram vistoriadas em intervalos de 30 minutos para retirada das aves. As amostras de sangue das aves foram obtidas por punção da veia metatarsiana medial ou da veia braquial utilizando uma agulha estéril descartável (BD 30x3). Com o sangue obtido foram confeccionados dois esfregaços sanguíneos e a outra parte foi preservada em cartões FTA para posterior extração de DNA no laboratório da SUCEN.

5.2 Desenho experimental

5.2.1 Aves doadoras (aves do plantel)

Para a infecção experimental, foi efetuado um levantamento das aves cuja espécie de *Plasmodium* não foi identificada no estudo anterior realizado pelo grupo[14,15], tendo-se dado preferência as aves da ordem Galliformes, com vista a reduzir a ocorrência de reação de incompatibilidade sanguínea em decorrência da inoculação de sangue heterólogo. Nesse âmbito as aves doadoras foram: 4 *Pavo cristatus* (pavão-indiano), 1 *Pavo muticus* (pavão-verde) e 3 *Crax blumenbachii* (mutum-do-sudeste ou mutum-de-bico-vermelho). As aves foram doadoras de 1 mL de sangue coletado na veia metatarsal média ou braquial conforme a espécie.

5.2.2 Aves receptoras

Para a realização da infecção experimental com *Plasmodium sp*., 15 pintinhos (*Gallus gallus domesticus*) adquiridos comercialmente com 1 dia de vida, foram usados como aves receptoras. Os pintinhos foram mantidos no Biotério do ICB II em gaiolas com ração (sem anticoccidios e/ou antibióticos na sua composição) e água *ad libitum*, sob luz natural e fotoperíodo escuro, com temperatura e humidade relativa do ar de 26°C e 60% respectivamente, durante o período necessário para a realização do experimento.

5.2.3 Infecção por *Plasmodium sp.*

Para a realização da infecção experimental as aves receptoras foram manipuladas com cerca de 7 dias de vida de modo a permitir a adaptação das mesmas. Após a coleta de sangue na ave doadora, foi preparada uma mistura contendo o sangue infectado, 3,7% solução de citrato de sódio e salina a 0,9% (na proporção de quatro partes de sangue para uma parte de citrato de sódio e cinco partes de salina). Essa mistura foi preparada na FPZSP, acondicionada numa caixa

térmica contendo gelo reciclável e transportada até ao biotério onde foi efetuada a inoculação. Os pintinhos, previamente identificados com marcador permanente nas asas, pata e cabeça, foram inoculados com 0,3 ml da mistura acima referida por injeção intravenosa na veia jugular (Figura 6). As aves receptoras foram monitoradas quanto à parasitemia, a cada 4 dias após a inoculação, mediante confecção de esfregaços de sangue delgados, por até um máximo de 35 dias pós-inoculação (dpi). Os esfregaços de sangue foram preparados por punção na veia metatarsal e examinados microscopicamente, conforme descrito a seguir.

Figura 6 - Pintinhos previamente identificados com marcador permanente no corpo (à esquerda) e inoculação de sangue infectado por injeção intravenosa na veia jugular (à direita) (Fotos: Karin Kirchgatter).

5.3 Preparação de esfregaços sanguíneos

Os esfregaços sanguíneos foram preparados logo após a coleta em lâminas de vidro limpas e sem adição de anticoagulantes. Após a preparação, os esfregaços foram secos à temperatura ambiente ao abrigo de poeira e insetos e fixados em metanol 100% por imersão durante 1 minuto no mesmo dia da coleta e corados com solução de GIEMSA (eosina-azul de metileno) diluída em água tamponada (pH 6,8 –7,2) na proporção de 1:10 por uma hora, em até 30 dias após a fixação. A análise dos esfregaços sanguíneos foi feita em microscopia de luz (microscópio Olympus® BX 51, Tóquio, Japão) mediante a observação de 100 campos com aumento de 400x com objetiva de imersão (1000x). Os parasitas e as diferentes formas

hematológicas foram identificadas usando a chave morfológica de Valkiūnas[4,60] e atlas hematológico de aves[26].

5.4 Extração de DNA genômico

O DNA genômico do sangue das aves em cartão FTA foi extraído usando o kit Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification System (Promega). A quantificação do DNA de todas as amostras submetidas à extração foi feita em espectrofotômetro UV (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) a uma absorvância de 260 nm de comprimento de onda. As amostras cuja concentração do DNA foi superior a 50 ng/µl, foram diluídas para uma concentração de 25 ng/µl antes de prosseguir com a PCR[14,15].

5.5 Amplificação do gene mitocondrial *cytb*

O diagnóstico molecular de hemosporídeos foi realizado mediante uma *nested PCR* para amplificar um fragmento de aproximadamente 500 bp do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*)[10,14]. Na primeira reação de amplificação, foram utilizados os iniciadores (*primers*) HaemNFI e HaemNR3 que amplificam o fragmento de 671 bp do gene mitocondrial e as seguintes concentrações de reagentes: 50 ng de gDNA, 1,25 mM de $MgCl_2$, 0,6 mM de cada primer e 0,5U de *Platinum Taq polimerase* (Invitrogen). As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 3 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e, uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Do produto da primeira reação foi usado 2 µL/amostra como molde de DNA da segunda reação (*nested*), utilizando os iniciadores HaemNF e HaemNR2 específicos para *Plasmodium/Haemoproteus* e os iniciadores HaemFL e HaemR2L específicos para *Leucocytozoon*. Ambos os pares de iniciadores (para *Plasmodium*/*Haemoproteus* ou *Leucocytozoon*) amplificam o fragmento interno do gene *cytb* contendo 480 bp. As respectivas PCRs foram realizadas separadamente em volumes de 25 µl com as mesmas proporções de reagentes das reações iniciais de PCR tendo-se modificado apenas o número de ciclos na amplificação de 30 para 33. Em todas as reações de PCR foi utilizado pelo menos um controle

positivo obtido de amostras positivas em outros estudos do grupo e um controle negativo (uma amostra livre de DNA). As regiões amplificadas pelos três pares de iniciadores utilizados nesse protocolo estão ilustradas na Figura 7.

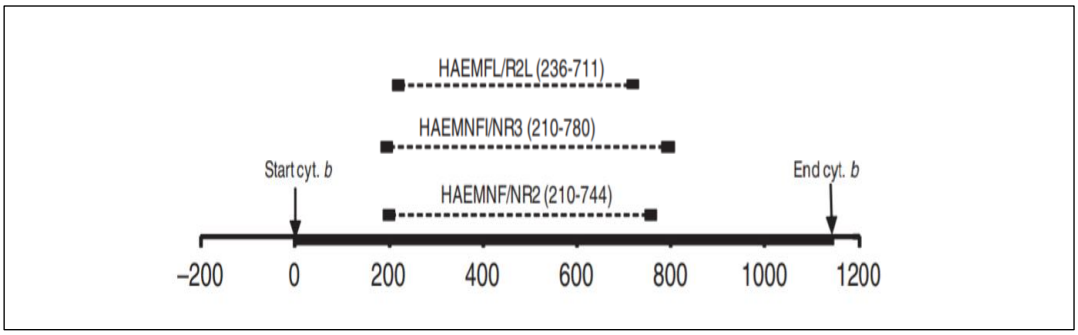


Figura 7 - Representação esquemática dos fragmentos amplificados para o gene *cytb* utilizando diferentes pares de *primers*[11].

Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos à eletroforese em agarose 1% (Invitrogen) dissolvida em TBE 1x (Tris, Borato, EDTA). A corrida eletroforética foi efetuada juntamente com marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder™ Invitrogen) por 40 minutos a 110 V. As bandas foram marcadas com GelRed™ (Biotium) e observadas em transluminador UV. Amostras com bandas de aproximadamente 500 bp foram consideradas positivas para hemosporídeos.

5.6 Sequenciamento e análises das sequências

Os produtos de PCR foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) conforme manual do fabricante em sequenciador automático 3500 Genetic Analizer (Applied Biosystems), Sequenciador Multiusuário IMT-USP/LIM-07. As reações foram submetidas a 30 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50 °C, 4 minutos a 60 °C com um ciclo inicial de 1 minuto a 96 °C usando 0,5 µL de cada *primer* da PCR, 0,75 µL de BigDye, 3,25 µL de tampão *Save Money* (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, contendo $MgCl_2$ 5 mM), 1 µL do produto de PCR e 4,5 µL de água ultrapura.

As sequências das duas fitas foram corrigidas e alinhadas em SeqMan (DNASTAR Lasergene versão 7.0.0) para criar a sequência consenso. Para identificar as linhagens dos parasitas, as sequências foram alinhadas com sequências do GenBank e MalAvi usando-se BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi e http://mbioserv2.mbioekol.lu.se/Malavi/blast.html[11,61]. As linhagens ausentes no banco de dados MalAvi foram consideradas novas linhagens e as respectivas sequências foram depositadas em ambos os bancos de dados (MalAvi e GenBank).

A relação filogenética entre as linhagens identificadas foi inferida mediante uso de sequências de *cytb* do banco de dados MalAvi[11], utilizando todas as sequências de morfoespécie disponíveis, após alinhamento em ClustalX 1.8 [62]. A análise bayesiana foi conduzida com o software MrBayes versão 3.2.0 [63]. Duas cadeias de Markov foram corridas de 3 a 5 milhões de gerações. As 25% primeiras árvores foram descartadas como “burn-in”. As árvores restantes foram usadas para calcular as probabilidades posteriores. As árvores obtidas em todas as análises foram visualizadas e editadas pelo programa FigTree - Tree Figure Drawing Tool v. 1.3.1[64].

5.7 Análise dos resultados

Os resultados dos testes para diagnóstico dos hemosporídeos bem como as informações relacionadas com o local de coleta, ordem, família, espécie, estado de conservação na natureza, linhagens detectadas e padrão migratório das aves foram introduzidos numa base de dados em Microsoft Office Excel para posterior análise descritiva. A prevalência dos hemosporídeos foi calculada com base nos resultados positivos e o número total de animais amostrados. A distribuição geográfica das linhagens bem como a sua capacidade de dispersão foi avaliada mediante verificação das linhagens bem como a sua ocorrência (ordem, espécie e local) no banco de dados MalAvi.

5.8 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Ministério do Meio Ambiente) (Autorização no. 57641-3), à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (aprovação em 09/05/2017, protocolo 352A) e à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (aprovação em 10/04/2017, protocolo 29/2017). Todos os esforços foram feitos para minimizar o tempo de manuseio e potencial sofrimento dos animais, utilizando o menor número de aves possível.

6 RESULTADOS

6.1 Infecção experimental com hemosporídeos

A eleição das aves doadoras foi baseada no histórico de malária no estudo anterior[14,15] e as coletas de sangue dependiam da rotina de manejo das aves da FPZSP. Assim, a coleta de sangue das aves doadoras foi efetuada de modo a realizar a inoculação do sangue no mesmo dia em que foi efetuada a coleta e, o resultado do diagnóstico foi obtido posteriormente à inoculação.

Foram inoculados 15 pintinhos com sangue de *Pavo cristatus, Pavo muticus* e *Crax blumenbachii* positivas para *Plasmodium sp*. no estudo efetuado por Chagas *et al*.[14,15], sendo 2 pintinhos para amostra de sangue da ave doadora, com exceção de uma ave doadora que teve o sangue inoculado em apenas um pintinho (Tabela 1).

Tabela 1 – Aves doadoras e as aves receptoras inoculadas

Ave Doadora		**Ave receptora**
Espécie	**ID**	**ID receptora**
Crax blumenbachii	CAD28081	1- Asa direita vermelha 2- Asa direita verde
Pavo cristatus	CAD27038	3- Asa direita preta 4- Asa direita laranja
Pavo cristatus	CAD27992	5- Cabeça e pata direita verde 6- Cabeça e pata direita preta
Crax blumenbachii	CAD24884	7- Cabeça e pata esquerda vermelha 8- Asa esquerda verde
Pavo muticus	CAD28899	9- Asa esquerda vermelha 10- Asa esquerda preta
Pavo cristatus	CAD27045	11- Asa esquerda Laranja 12- Cabeça e asa esquerda preta
Crax blumenbachii	CAD28082	13- Cabeça e pata esquerda vermelha 14- Asa esquerda e direita verde
Pavo cristatus	CAD31613	15- Asa esquerda e direita vermelha

No 4°dpi, os pintinhos (9 e 10) inoculados com sangue de *Pavo muticus* (positivo por PCR para *Plasmodium sp*. linhagem DENVID01), apresentaram formas intraeritrocíticas compatíveis com *Plasmodium sp*. no exame microscópico, com uma parasitemia de 0,09%. Nos monitoramentos subsequentes a infecção caracterizou-se por apresentar uma parasitemia menor que a verificada no 4°dpi (Gráfico 1, pintinho 10). Ao longo do período do experimento a infecção não foi adiante, ou seja, a parasitemia não aumentou, não foram verificadas formas evolutivas dos parasitas e as poucas formas que existiam desapareceram.

O sangue dos pintinhos inicialmente positivos para *Plasmodium sp.* no exame microscópico, apresentou resultados negativos quando testado por PCR para hemosporídeos no fim do experimento. Não foram verificadas alterações comportamentais ou clínicas nas aves inoculadas. Não foi verificado nenhum óbito em decorrência da incompatibilidade sanguínea ou pela inoculação de sangue heterólogo. As restantes aves doadoras e as respetivas aves receptoras foram negativas por PCR e no exame microscópico para *Plasmodium sp.* e outros hemosporídeos relacionados.

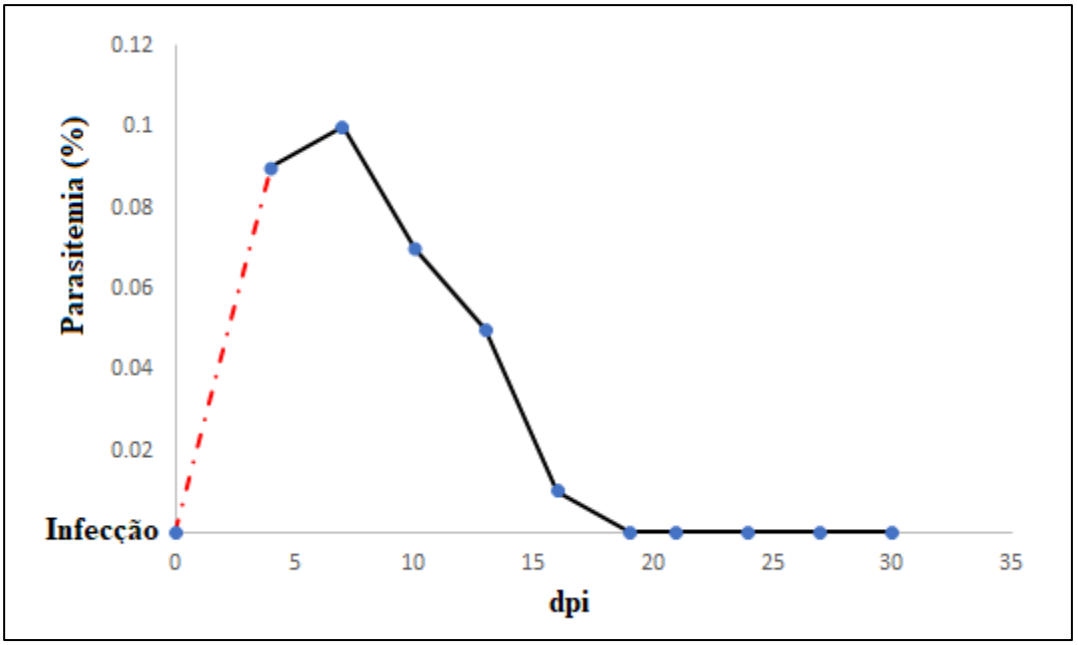


Gráfico 1 - Parasitemia da ave 10 inoculada com sangue de *Pavo muticus*, avaliada de acordo com os dias pós-inoculação por *Plasmodium sp*. (linhagem DENVID01) em esfregaços sanguíneos.

6.2 Prevalência e diversidade de hemosporídeos em aves silvestres

6.2.1 Descrição das aves silvestres capturadas

No presente estudo, a classificação taxonômica e o estado de conservação na natureza seguiram a classificação do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) e a lista vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (UICN em inglês IUCN-International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species, disponível em https://www.iucnredlist.org/).

Foram amostradas 531 aves pertencentes a sete ordens (Accipitriformes, Apodiformes, Columbiformes, Passeriformes, Piciformes, Psittaciformes e Trogoniformes), 26 famílias e 146 espécies. A ordem Passeriformes apresentou maior número de indivíduos amostrados, representando 91,15 % das aves amostradas. As demais ordens apresentaram uma quantidade baixa de indivíduos, sendo a ordem Trogoniformes a que apresentou menor números de aves amostradas (0,19%) como ilustrado no gráfico 2.

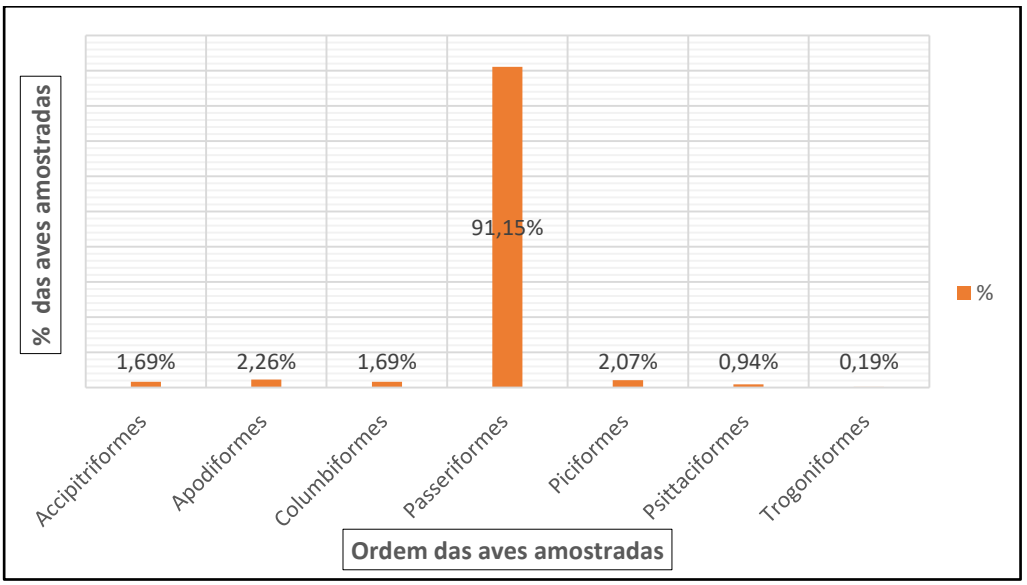


Gráfico 2 - Distribuição das aves amostradas segundo a ordem (percentagem das aves amostradas em função da ordem das aves).

As famílias e o número de aves amostradas foram: Tyrannidae (169), Thraupidae (91), Furnariidae (41), Parulidae (36), Turdidae (34). As famílias Passerellidae (26), Thamnophilidae (23), Pipridae (22), Trochilidae (12) e Vireonidae (11), Accipitridae (9) Columbidae (9), Fringillidae (8), Tityridae (8), Picidae (7), Psittacidae (5), Conopophagidae (4), Ramphastidae (4) e Cardinalidae (3). Formicariidae (1), Hirundinidae (1), Icteridae (1), Motacillidae (1), Polioptilidae (1) e Troglodytidae (1), tiveram o menor número de aves amostradas (Gráfico 3).

As espécies com maior número de aves amostradas foram: *Elaenia albiceps chilensis* (49), *Zonotrichia capensis* (tico-tico) (21) e *Haplospiza unicolor* (cigarra-bambu) (20). Cerca de 50 espécies apresentam apenas um indivíduo amostrado. A família com maior diversidade de espécies amostradas foi Tyrannidae, apresentando 33 espécies distintas.

Quanto ao padrão migratório, 42,4% das aves amostradas são aves migratórias, das quais 0,75% são migratórias altitudinais (https://www.iucnredlist.org/). Em relação ao estado de conservação na natureza segundo a IUCN, 87,27 % (474) das espécies de aves amostradas são Pouco Preocupante ou LC (do inglês, *Least Concern*), 1,5% Quase Ameaçada ou NT (do inglês, *Near Threatened*) e 0,4% somam as espécies Vulnerável ou VU (do inglês, *Vulnerable*) e Em Perigo ou EN (do inglês, *Endangered*).

Platyrinchus leucoryphus (patinho-de-asa-castanha) e *Rhopornis ardesiacus* (gravatazeiro ou papa-formiga-de-gravatá) são a espécie vulnerável e a espécie em risco alto de extinção, respectivamente, segundo a IUCN.

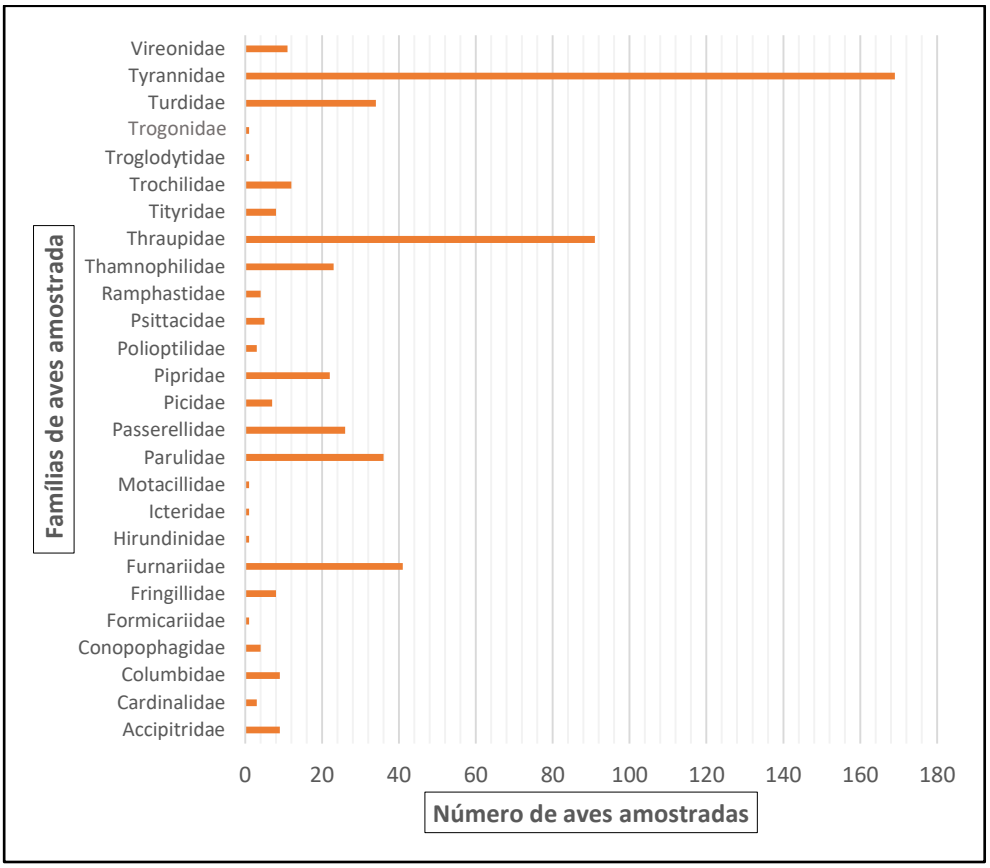


Gráfico 3 – Número de aves amostradas por família

Em cada local de estudo foram amostradas: 188 no PUCRS Pró-Mata (RS), 121 no Núcleo Curucutu (SP), 79 no Parque Nacional Saint Hilaire-Lange (PR), 41 na Reserva Ecológica Michelin (BA), 40 na Fazenda Tunico-Milagres (BA), 40 Reserva Biológica de Guaribas (PB) e 22 no Rancho Cañadón Florido (Esquel) na Argentina (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de aves amostradas por família em cada área de estudo.

Local	Ordem /Família	Número de espécies
Michelin, BA	**Apodiformes**	
	Trochilidae	4
	Passeriformes	
	Conopophagidae	1
	Fringillidae	3
	Furnariidae	3
	Icteridae	1
	Pipridae	8
	Thamnophilidae	4
	Thraupidae	6
	Tityridae	2
	Turdidae	4
	Tyrannidae	3
	Trogoniformes	
	Trogonidae	1
Sub-total		41
Milagres, BA	**Apodiformes**	
	Trochilidae	3
	Passeriformes	
	Furnariidae	4
	Parulidae	1
	Passerellidae	1
	Polioptilidae	3
	Thamnophilidae	10
	Thraupidae	7
	Tityridae	1
	Troglodytidae	1
	Tyrannidae	8
	Vireonidae	1
Sub-total		40
REBIO Guaribas	**Columbiformes**	
	Columbidae	6
	Passeriformes	
	Conopophagidae	1
	Furnariidae	3
	Parulidae	2
	Passerellidae	4
	Pipridae	1
	Thamnophilidae	1
	Thraupidae	14
	Turdidae	1
	Tyrannidae	7
Sub-total		40

Continua

Continuação Tabela 2

Local	Ordem /Família	Número de espécies
PARNA Saint Hilaire-Lange	**Columbiformes**	
	Columbidae	2
	Piciformes	
	Ramphastidae	3
	Passeriformes	
	Cardinalidae	3
	Furnariidae	11
	Parulidae	7
	Pipridae	12
	Thamnophilidae	1
	Thraupidae	7
	Tityridae	4
	Turdidae	12
	Tyrannidae	17
Sub-total		79
PUCRS Pró-Mata	**Accipitriformes**	
	Accipitridae	9
	Apodiformes	
	Trochilidae	5
	Columbiformes	1
	Columbidae	1
	Passeriformes	
	Conopophagidae	1
	Formicariidae	1
	Fringillidae	1
	Furnariidae	10
	Hirundinidae	1
	Parulidae	16
	Passerellidae	18
	Pipridae	1
	Thamnophilidae	2
	Thraupidae	41
	Turdidae	13
	Tyrannidae	56
	Vireonidae	7
	Piciformes	
	Picidae	4
	Ramphastidae	1
Sub-total		188

Continua

Continuação Tabela 2

Local	Ordem /Família	Número de espécies
Esquel	**Passeriformes**	
	Fringillidae	4
	Furnariidae	4
	Passerellidae	2
	Thraupidae	1
	Turdidae	4
	Tyrannidae	7
Sub-total		22
Núcleo Curucutu	**Passeriformes**	
	Conopophagidae	1
	Furnariidae	6
	Motacillidae	1
	Parulidae	10
	Thamnophilidae	5
	Thraupidae	15
	Tityridae	1
	Tyrannidae	71
	Vireonidae	3
	Piciformes	
	Picidae	3
	Psittaciformes	
	Psittacidae	5
Sub-total		121
Total		**531**

6.2.2 Detecção de hemoparasitas por microscopia ótica

Foram examinados um total de 64 esfregaços sanguíneos (sendo 18 pertencentes às aves da Reserva Ecológica Michelin, 22 de aves de Esquel e 24 de aves do Parque Nacional Saint Hilaire-Lange), dos quais 6 apresentaram parasitas do gênero *Plasmodium* e 6 do gênero *Haemoproteus* (Tabela 3). O nível de parasitas detectado nos exames microscópicos foi <0.01% (1-6 parasitas/100 campos microscópicos) em 9 esfregaços e >0.01% em 3 esfregaços examinados (Tabela 3), com predominância de poucas formas evolutivas dos parasitas, tendo sido identificados gametócitos e merontes para *Plasmodium* e gametócitos de *Haemoproteus* (Figura 8 e 9). As espécies que apresentaram maior número de parasitas por campo foram: *Turdus leucomelas* (Sabiá-barranco), *Tangara sayaca* (Sanhaçu-cinzento) e *Glaucis hirsutus*

(Balança-rabo-de-bico-torto) (Tabela 3). Foram também detectadas microfilárias em 5 esfregaços sanguíneos que foram negativos para hemosporídeos (Figura 9).

Tabela 3 – Descrição das amostras positivas no diagnóstico microscópico e respectivo resultado no diagnóstico molecular.

Local	Hospedeiro	Parasito	Parasitemia	PCR	Linhagem
PARNA Saint Hilaire-Lange	**Passeriformes**				
	Turdidae				
	Turdus albicollis (PNSHL06)	*Plasmodium sp.*	(<0.01%)	*P. unalis*	99% HYLMUS01
	Turdus albicollis (PNSHL07)	*Plasmodium sp.*	(<0.01%)	*P. nucleophilum*	DENPET03
	Turdus albicollis (PNSHL10)	*Plasmodium sp.*	(<0.01%)	*P. lutzi*	TURALB01
	Cardinalidae				
	Habia rubica (PNSHL29)	*Plasmodium sp.*	(<0.01%)	*P. cathemerium*	TACRUB04
	Habia rubica (PNSHL35)	*Plasmodium sp.*	(<0.01%)	*P. cathemerium*	TACRUB04
	Piciformes				
	Ramphastidae				
	Ramphastos dicolorus (PNSHL46)	*Plasmodium sp.*	(<0.01%)	*P. unalis*	99% HYLMUS01
Michelin	**Passeriformes**				
	Turdidae				
	Turdus leucomelas (ZOO 03)	*Haemoproteus sp.*	(0.02%)	*Haemoproteus sp.*	EUMIN01
	Thraupidae				
	Tangara sayaca (ZOO 010)	*Haemoproteus sp.*	(0.2%)	*Haemoproteus sp.*	THRSAY01
	Apodiformes				
	Trochilidae				
	Glaucis hirsutus (ZOO 017)	*Haemoproteus sp.*	(1%)	*Haemoproteus sp.*	EUPMAC03
Esquel	**Passeriformes**				
	Furnariidae				
	Asthenes pyrrholeuca (PAT 472)	*Haemoproteus sp.*	(<0.01%)	*Haemoproteus sp.*	96% CATAUR01/ 96% MYCAME08
	Thraupidae				
	Phrygilus patagonicus (PAT 479)	*Haemoproteus sp.*	(<0.01%)	*Haemoproteus sp.*	99% TROAED14
	Tyrannidae				
	Elaenia albiceps chilensis (PAT 479)	*Haemoproteus sp.*	(<0.01%)	*Haemoproteus sp.*	TURUF02

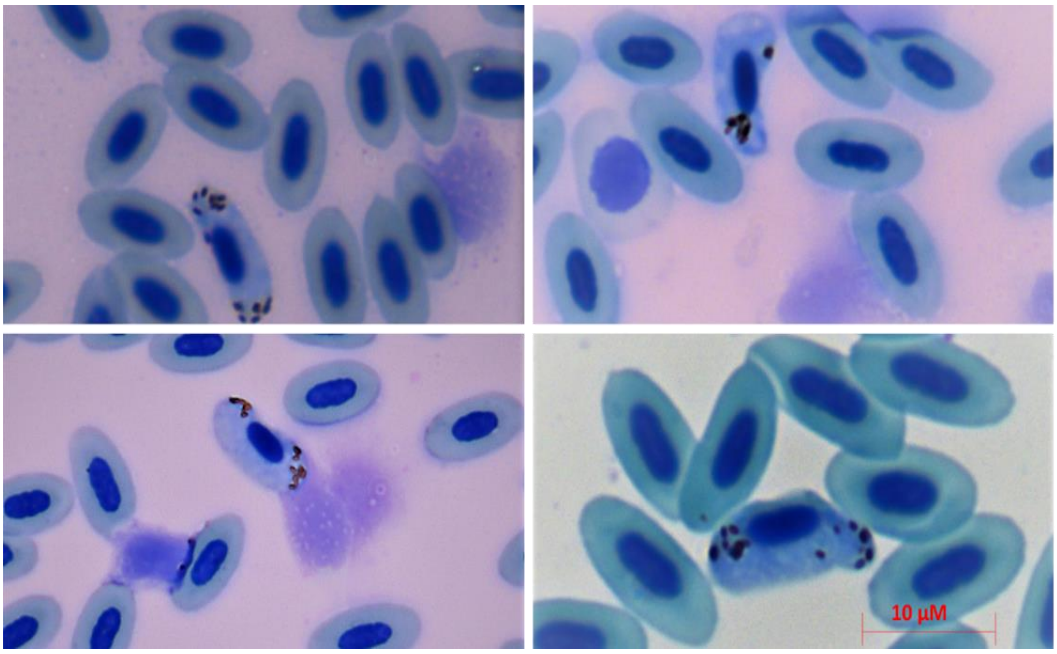


Figura 8 - Esfregaços sanguíneos de aves silvestres de Michelin e Patagônia, corados com Giemsa evidenciando gametócitos de *Haemoproteus* sp. (Fotos: Kiba Comiche).

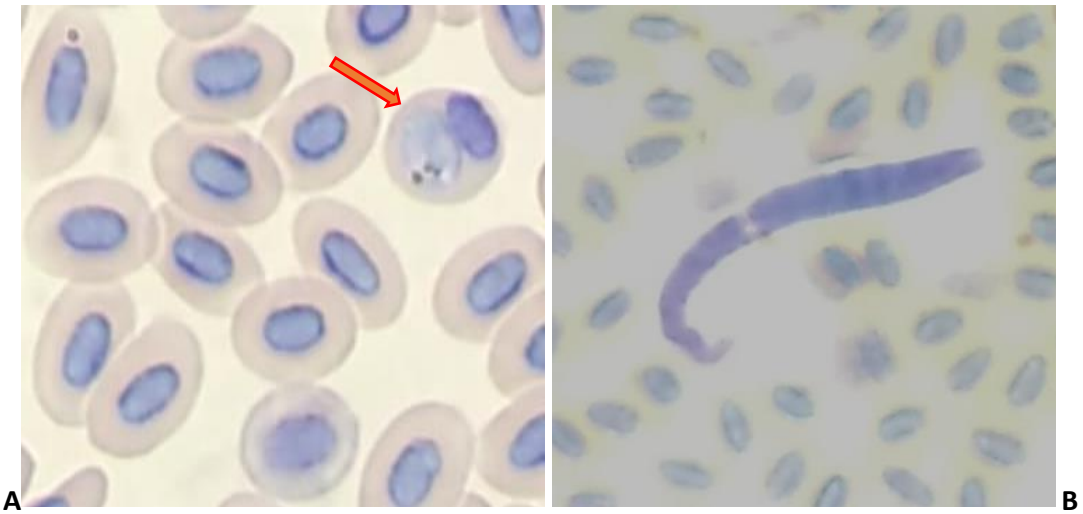


Figura 9 - Esfregaços sanguíneos de aves silvestres do PARNA Saint Hilaire-Lange: (A) referente a lâmina positiva para *Plasmodium sp.*, a seta vermelha indica um meronte imaturo de *Plasmodium cathemerium* (linhagem TACRUB04); (B) lâmina negativa para hemosporídeos com presença de microfilária (Fotos: Kiba Comiche).

6.2.3 Detecção de hemosporídeos por PCR

Foram analisadas 531 amostras de aves por *nested PCR* quanto à presença de hemosporídeos *(Plasmodium/Haemoproteus/Leucocytozoon*). Destas, 72 (13,56 %) foram positivas, sendo: 9,23 % (49) *Plasmodium*, 3,2 % (17) *Haemoproteus* (das quais 1 do subgênero *Haemoproteus* e as demais ao subgênero *Parahaemoproteus*) e 1,13% (6) *Leucocytozoon*. A Figura 10, indica quatro amostras positivas para *Plasmodium* e/ou *Haemoproteus* (12D, 12C, 11D e 11C) e uma para *Leucocytozoon* (10H), onde fragmentos de aproximadamente 500 bp, assim como nos controles positivos para *Leucocytozoon* e *Plasmodium* (C+) podem ser evidenciados. Na mesma figura é notável a ausência de banda no controle negativo (CN), como esperado.

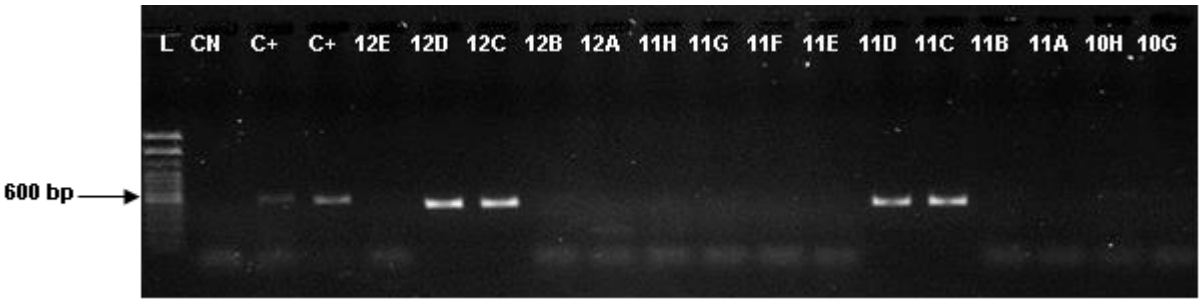


Figura 10 - Fragmentos amplificados usando a PCR para a identificação de hemosporídeos (*Plasmodium/Haemoproteus/Leucocytozoon*) (Fotos: Kiba Comiche).

6.2.4 Perfil das aves positivas

As 72 amostras positivas para hemosporídeos *(Plasmodium/Haemoproteus/Leucocytozoon*) evidenciaram a infecção em 4 ordens (Apodiformes, Columbiformes, Passeriformes e Piciformes), 18 famílias e 38 espécies de aves, como demonstrado nos Gráficos 4 e 5. A ordem com maior número de amostras positivas foi a Passeriformes (Gráfico 4) e as famílias Turdidae e Tyrannidae foram as que apresentaram maior número de aves positivas (Gráfico 5).

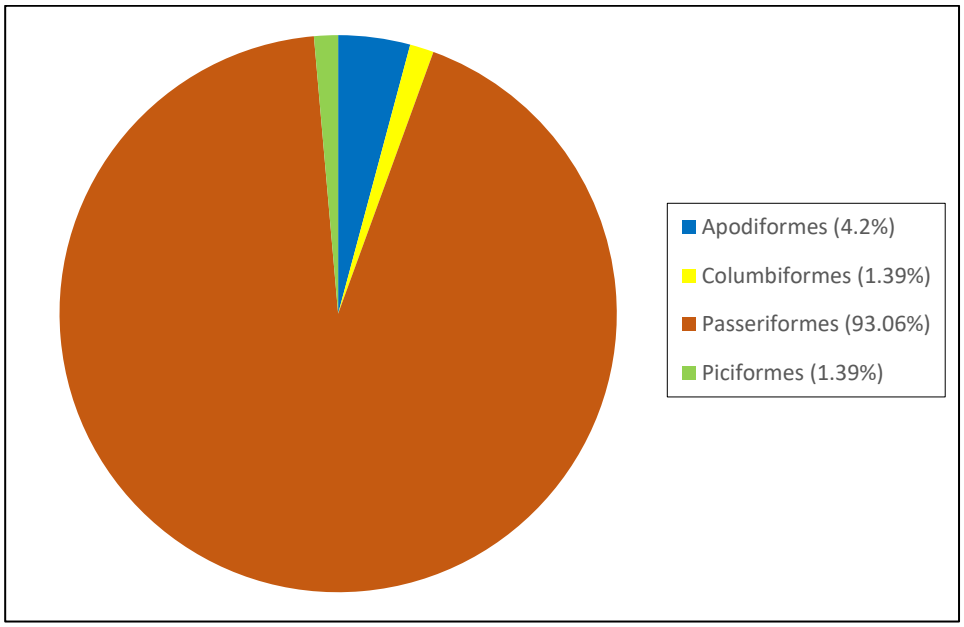


Gráfico 4 – Distribuição das aves positivas para hemosporídeos em função da ordem.

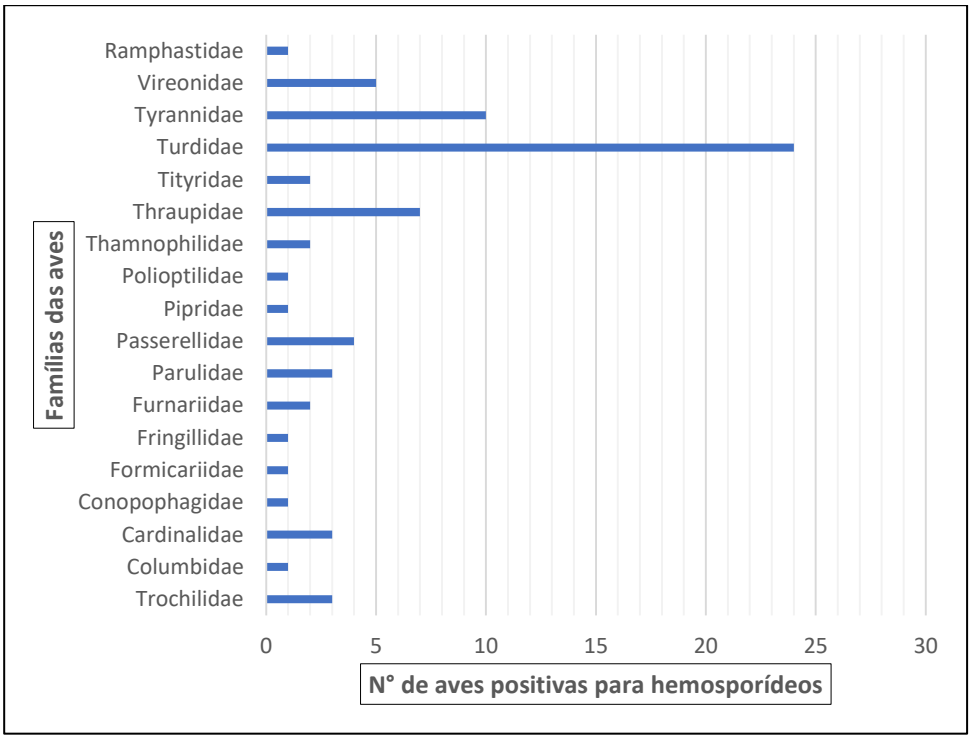


Gráfico 5 – Distribuição das aves positivas para hemosporídeos segundo a família.

As 38 espécies de aves positivas para hemosporídeos são indicadas na Tabela 4. Destas, as espécies com maior número de indivíduos positivos foram *Turdus albicollis* (6), *Elaenia albiceps chilensis* (6), *Turdus flavipes* (5), *Turdus leucomelas* (4), *Turdus rufiventris* (4) e *Vireo olivaceus* (4), refletindo o maior esforço amostral para essas espécies de aves.

Tabela 4 – Espécies de aves positivas para hemosporídeos.

Nome científico	Nome comum	N	n	%
Arremon taciturnus	Tico-tico-de-bico-preto	5	1	20
Asthenes pyrrholeuca	Lenheiro-de-rabo-comprido	2	1	50
Basileuterus culicivorus	Pula-pula	12	3	25.0
Chamaeza campanisona	Tovaca-campainha	1	1	100.0
Chiroxiphia caudata	Tangará	13	1	7.7
Conopophaga lineata	Chupa-dente	2	1	50.0
Dysithamnus mentalis	Choquinha-lisa	2	1	50.0
Elaenia albiceps chilensis	Guaracava-de-crista-branca	49	6	12.2
Elaenia mesoleuca	Tuque	16	2	12.5
Eupetomena macroura	Beija-flor-resoura	2	1	50.0
Glaucis hirsutus	Balança-rabo-de-bico-torto	2	1	50.0
Habia rubica	Tiê-de-bando	3	3	100.0
Leptotila verreauxi	Juriti-pupu	2	1	50.0
Lochmias nematura	João-porca	2	1	50.0
Myiarchus ferox	Maria-cavaleira	2	1	50.0
Myiarchus swainsoni	Irré	10	1	10.0
Pachyramphus viridis	Caneleiro-verde	1	1	100.0
Phaethornis pretrei	Beija-flor-rabo-branco-acanelado	1	1	100.0
Phrygilus patagonicus	Passarinho da Serra da Patagônia	1	1	100.0
Polioptila plumbea	Balança-rabo-de-chapéu-preto	3	1	33.3
Ramphastos dicolorus	Tucano-de-bico-verde	3	1	33.3
Schiffornis virescens	Flautim	3	1	33.3
Spinus barbatus	Pintassilgo-de-gravata	4	1	25.0
Tachyphonus coronatus	Tiê-preto	8	3	37.5
Tangara cyanoptera	Sanhaçu-de-encontro-azul	2	1	50.0
Tangara sayaca	Sanhaçu-cinzento	3	1	33.3
Thamnomanes caesius	Ipecuá	2	1	50.0
Trichothraupis melanops	Tiê-de-topete	5	1	20.0
Turdus albicollis	Sabiá-coleira	13	6	46.2
Turdus amaurochalinus	Sabiá-poca	2	1	50.0
Turdus falcklandii	Sabiá-austral	4	3	75.0
Turdus flavipes	Sabiá-una	5	5	100.0
Turdus leucomelas	Sabiá-barranco	5	4	80.0
Turdus rufiventris	Sabiá-laranjeira	4	4	100.0
Turdus subalaris	Sabiá-ferreiro	1	1	100.0
Vireo chivi	Juruviara	2	1	50.0
Vireo olivaceus	Juruviara-boreal	6	4	66.7
Zonotrichia capensis	Tico-tico	21	3	14.3
Total			**72**	

N = número de aves amostrada/espécie de ave positiva
n = número de aves positivas/espécie de ave positiva
% = Prevalência de hemosporídeos/espécie de ave

É importante ressaltar que *Vireo olivaceus* se refere ao atual *Vireo chivi* (segundo a classificação do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, CBRO). Entretanto, essa classificação não é muito utilizada internacionalmente. Alguns autores também utilizam *Vireo olivaceus chivi.* Nesse trabalho utilizamos ainda *Vireo olivaceus*, pois essas amostras já foram publicadas com essa classificação (Apêndice B), inclusive nos bancos de dados GenBank (Acessos #MK695215, #MK695232, #MK695341, #MK695412, #MK695413 e #MK695485) e MalAvi.

6.2.5 Distribuição das aves positivas em função do local de estudo

A prevalência dos hemosporídeos em amostras brasileiras foi de 12,77% (65/509) e das amostras argentinas foi de 31,8% (7/22). Em relação aos locais de estudo, as amostras positivas foram diagnosticadas em aves capturadas em: Curucutu (11), Esquel (7), Michelin (11), Milagres (3), PARNA Saint Hilaire-Lange (18) e Pro Mata (22), como ilustrado no Gráfico 6. Em Guaribas não foram encontradas aves positivas.

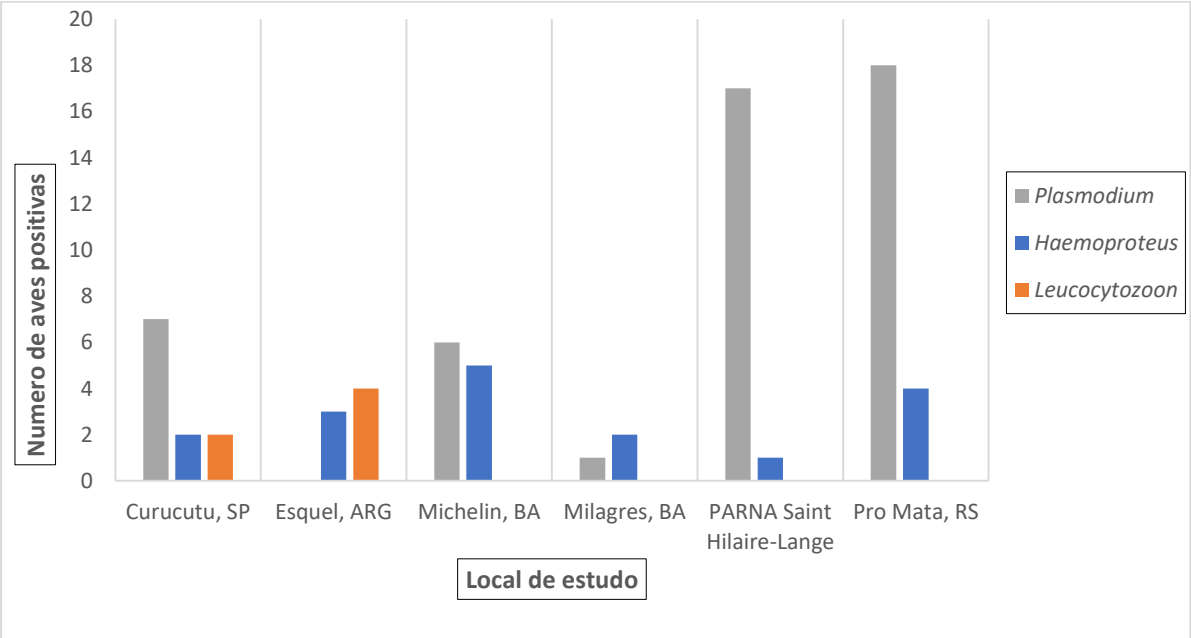


Gráfico 6 - Distribuição das aves positivas em função do local de estudo.

A maior prevalência de *Plasmodium* foi encontrada em aves amostradas em PARNA Saint Hilaire-Lange (21,52%), Michelin (14,63%), Pro Mata (9,52%) e em Esquel não foram diagnosticadas aves positivas para *Plasmodium* (Gráfico 6 e Figura 11). Os parasitas do gênero *Haemoproteus* foram detectados em aves amostradas em Esquel (13.64 %), Michelin (12,20 %), Milagres (5 %), Pro Mata (2,13 %), Curucutu (1,65 %) e PARNA Saint Hilaire-Lange (1,27 %). Em relação ao gênero *Leucocytozoon*, só foi diagnosticado em aves amostradas em Esquel (18,18 %) e Curucutu (1,65 %) (Figura 11).

O gênero *Leucocytozoon* foi amplamente diagnosticado em aves migratórias (*Elaenia albiceps chilensis*, *Spinus barbatus* e *Turdus falcklandii*). A espécie *Elaenia albiceps chilensis* foi a única espécie parasitada pelos três hemosporídeos nomeadamente *Plasmodium*, *Haemoproteu*s e *Leucocytozoon* em igual número de indivíduos (dois por gênero de hemosporídeo). Os indivíduos da família Turdidae em sua maioria foram positivos para *Plasmodium*, sendo *Turdus albicollis* a espécie com mais indivíduos positivos. *Turdus falcklandii* (espécie restrita à região temperada do sul da América do Sul) apresentou maior número de positivos para *Leucocytozoon.*

Os parasitas do gênero *Haemoproteus* foram diagnosticados em *Vireo olivaceus* (3), *Zonotrichia capensis* (2), *Elaenia albiceps chilensis* (2) e *Asthenes pyrrholeuca* (1), espécies tidas como migratórias. Os indivíduos infectados por parasitas do gênero *Leucocytozoon* só foram encontrados em um local amostrado no Brasil, com números mais baixos quando comparados com a Argentina (Grafico 6 e Figura 11).

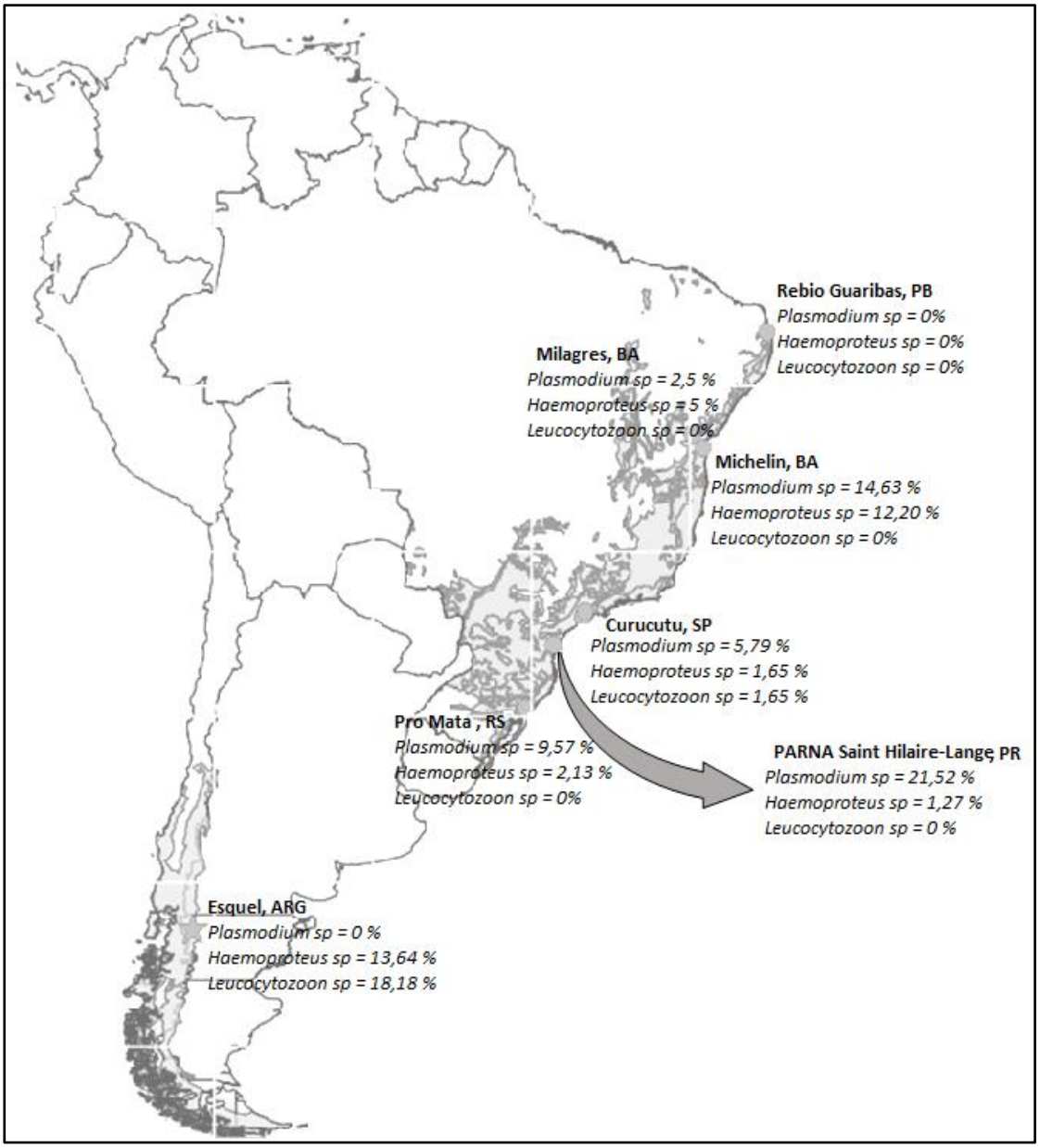


Figura 11 – Prevalência dos hemosporídeos aviários nos locais amostrados.

6.2.6 Distribuição das aves positivas em função do *Status* migratório

Das 72 amostras de aves positivas para hemosporídeos, 31 eram migratórias (Gráfico 7), em sua maioria aves pertencentes às famílias Turdidae (9), Tyrannidae (9) e Vireonidae (5), dos gêneros *Elaenia*, *Turdus* e *Vireo*. Dentre os locais amostradas, Pro Mata, apresentou o maior número de indivíduos migratórios positivos (14) para *Plasmodium* e *Haemoproteus*, sendo as espécies *Turdus flavipes* e *Vireo olivaceus* as mais frequentemente encontradas. Todas as 7

aves positivas em Esquel eram migratórias e na sua maioria indivíduos da espécie *Turdus falcklandii* positivos para *Leucocytozoon*. A *Zonotrichia capensis* é uma espécie migratória de ampla distribuição sendo encontrada em muitos países da região Neotropical. As aves amostradas no Brasil, apesar de algumas serem migratórias, na sua maioria são aves residentes e não efetuam migrações muito distantes. Ao contrário, as aves amostradas na Patagônia, entre elas *Elaenia albiceps chilensis*, também foi encontrada em Curucutu e parasitada por *Leucocytozoon*. As aves não migratórias na sua maioria pertenciam a ordem Passeriformes, família Turdidae e a espécie com maior número de indivíduos positivos foi *Turdus albicollis*. As aves migratórias apresentaram maior diversidade de hemosporídeos estando parasitados por *Plasmodium* (15), *Haemoproteus* (10) e *Leucocytozoon* (6), enquanto as aves não migratórias estavam parasitadas por *Plasmodium* (35) e *Haemoproteus* (6) como indicado no Gráfico 7.

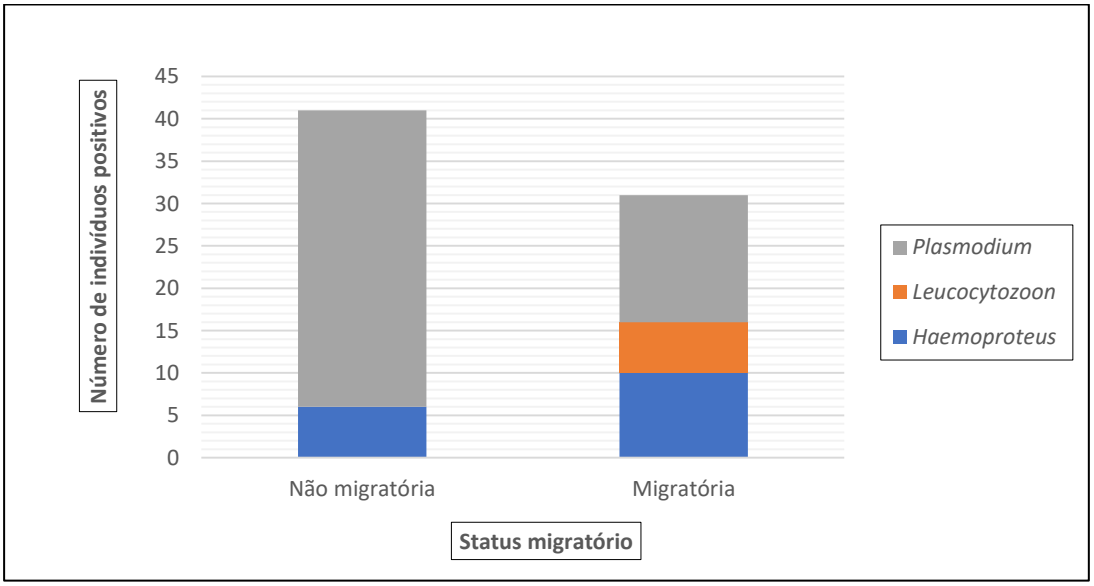


Gráfico 7 - Distribuição das aves positivas em função do *status* migratório.

6.2.7 Diversidade de hemosporídeos

Para avaliar a diversidade de linhagens de hemosporídeos, as 72 amostras positivas para os hemosporídeos foram sequenciadas, tendo-se identificado 42 linhagens *cytb* de hemosporídeos, das quais 12 *Haemoproteus* (96% CATAUR01/MYCAME08, 99% TROAED14, 99%

LEPRUF02, 99% PACPEC02 (THRSAY01), 99% PAPOL03, 99% TROAED18 (EUPMAC03), EUMIN01, MYISWA01, VIGIL09, VIOLI05, VIOLI06 e ZOCAP01), 24 linhagens de *Plasmodium* (99% LEPCOR05 (ARRTAC06), 99% AMMAUR01/CINRUF01, 99% DENVID01, 99% HYLMUS01, 99% NYCNYC01, ANGAL01, ARRTAC01, CHACAM03, CYCYA01, DENPET03, LEAMA01, MASTR01, PADOM09, PADOM11, PHPAT01, PYLEU01, RAMCAR01, TACRUB04, TRMEL02, TULEU06, TUMIG03, TURALB01, TURALB05, TURFAL06, TURUF03) e 4 linhagens de *Leucocytozoon* (98% GRAQUI02, 99% TROAED02, 99% TURNAU01 e 99% TURPEL02). Foi detectada uma infecção mista por duas linhagens de *Leucocytozoon*, devido à dificuldade de sequenciamento, essa amostra não foi incluída na análise de diversidade filogenética, sendo apenas utilizada na análise de hemosporídeos positivos por PCR.

Algumas das linhagens encontradas no presente trabalho foram previamente descritas em outros estudos e, na sua maioria na América do Sul. Dezoito das linhagens são novas descrições (em negrito no Apendice A). As linhagens com maior prevalência foram: PADOM09, TUMIG03, TURALB01 sendo 11,11% para cada. A distribuição das linhagens de hemosporídeos nos locais de estudo, mostrou que Pro Mata e Curucutu apresentaram maior diversidade de hemosporídeos (Gráfico 8), refletindo o maior esforço amostral. Entretanto, considerando-se o número de linhagens distintas em relação ao número de amostras analisadas, é possível verificar concordância com a hipótese do gradiente latitudinal (maior diversidade próximo a linha do equador) para *Plasmodium/Haemoproteus*. Por outro lado, em relação a *Leucocytozoon*, há indícios de um gradiente inverso (Figura 11 e Gráfico 8).

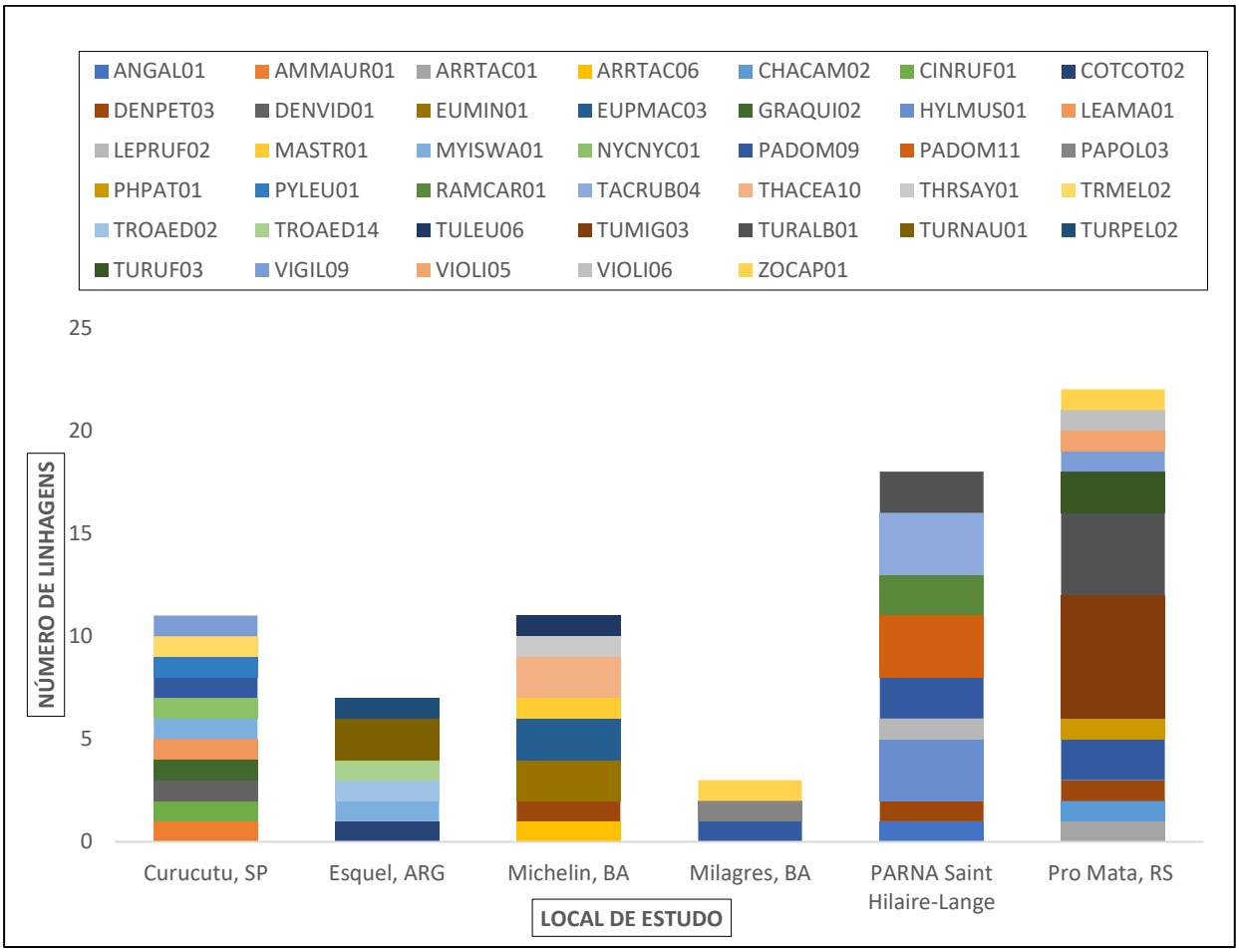
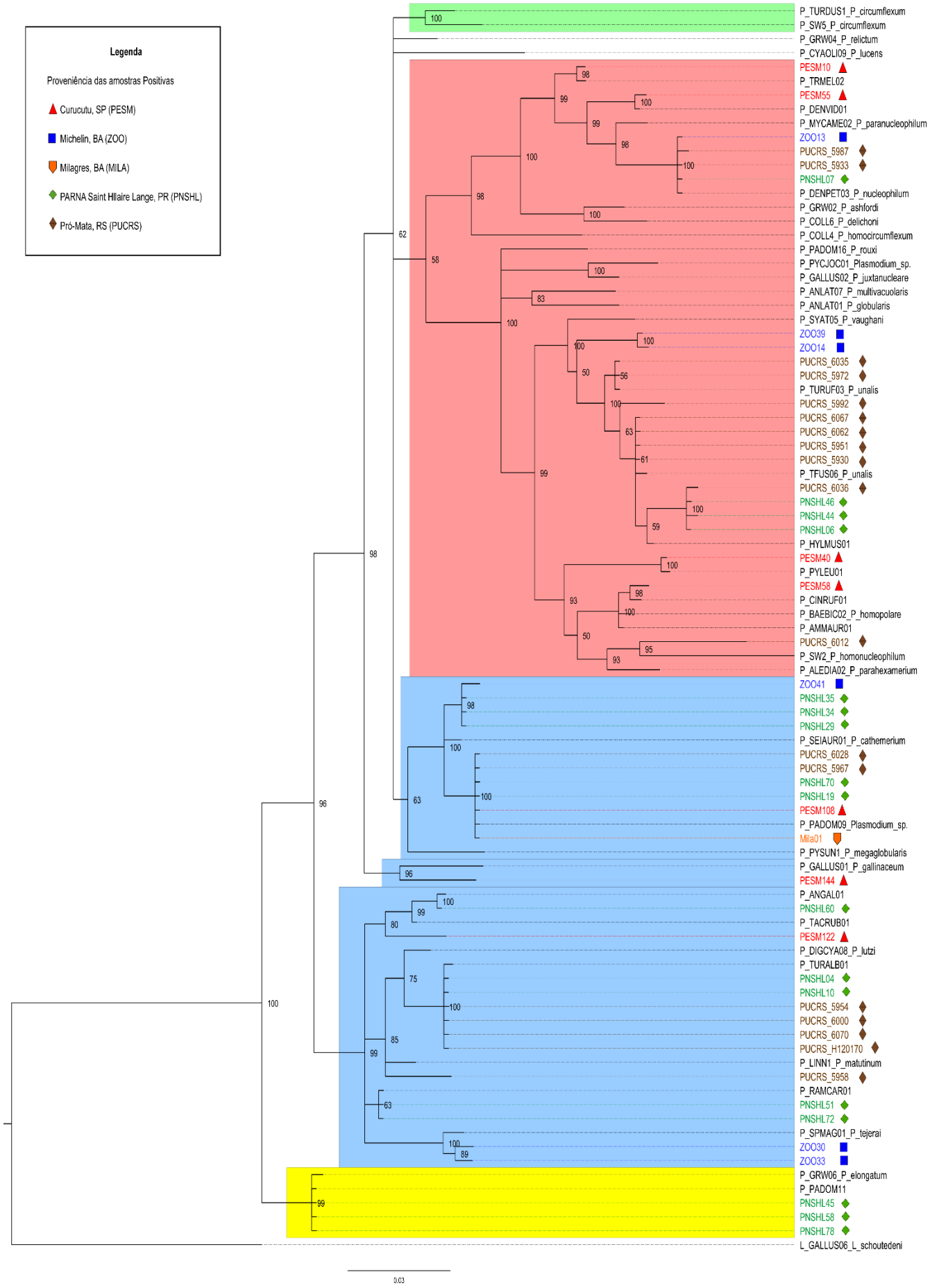


Gráfico 8 - Diversidade de Linhagens de hemosporídeos encontradas nos locais de estudo com amostras positivas.

A maior diversidade de parasitas do gênero *Plasmodium* foi verificada em aves amostradas em Curucutu (8), PARNA Saint Hilaire-Lange (8) e Pro Mata (8), enquanto Michelin apresentou apenas uma linhagem de *Plasmodium* (Gráfico 8). PADOM09, TUMIG03 e TURALB01 foram as linhagens encontradas com maior frequência entre as aves amostradas. A linhagem PADOM09 foi encontrada parasitando 6 aves pertencentes a seis espécies diferentes (*Trichothraupis melanops*, *Basileuterus culicivorus*, *Zonotrichia capensis*, *Elaenia mesoleuca*, *Polioptila plúmbea* e *Elaenia albiceps chilensis*). Enquanto as linhagens TUMIG03 e TURALB01 foram encontradas em 6 indivíduos (em cada linhagem) de espécies distintas pertencentes à família Turdidae. A linhagem TACRUB04 foi encontrada parasitando 3 indivíduos da espécie *Habia rubica*, pertencente à família Cardinalidae. DENPET03 foi a linhagem que apresentou características generalistas, acometendo 3 indivíduos pertencentes a 3 espécies (*Ramphastos dicolorus*, *Myiarchus swainsoni* e *Turdus leucomelas*) e famílias (Ramphastidae, Tyrannidae e Turdidae) e duas ordens distintas (Piciformes e Passeriformes).

Para a análise filogenética, as 24 linhagens do *cytb* de *Plasmodium spp* identificadas no presente estudo, foram adicionadas numa base de dados contendo outras 40 linhagens obtidas do GenBank (Figura 12).

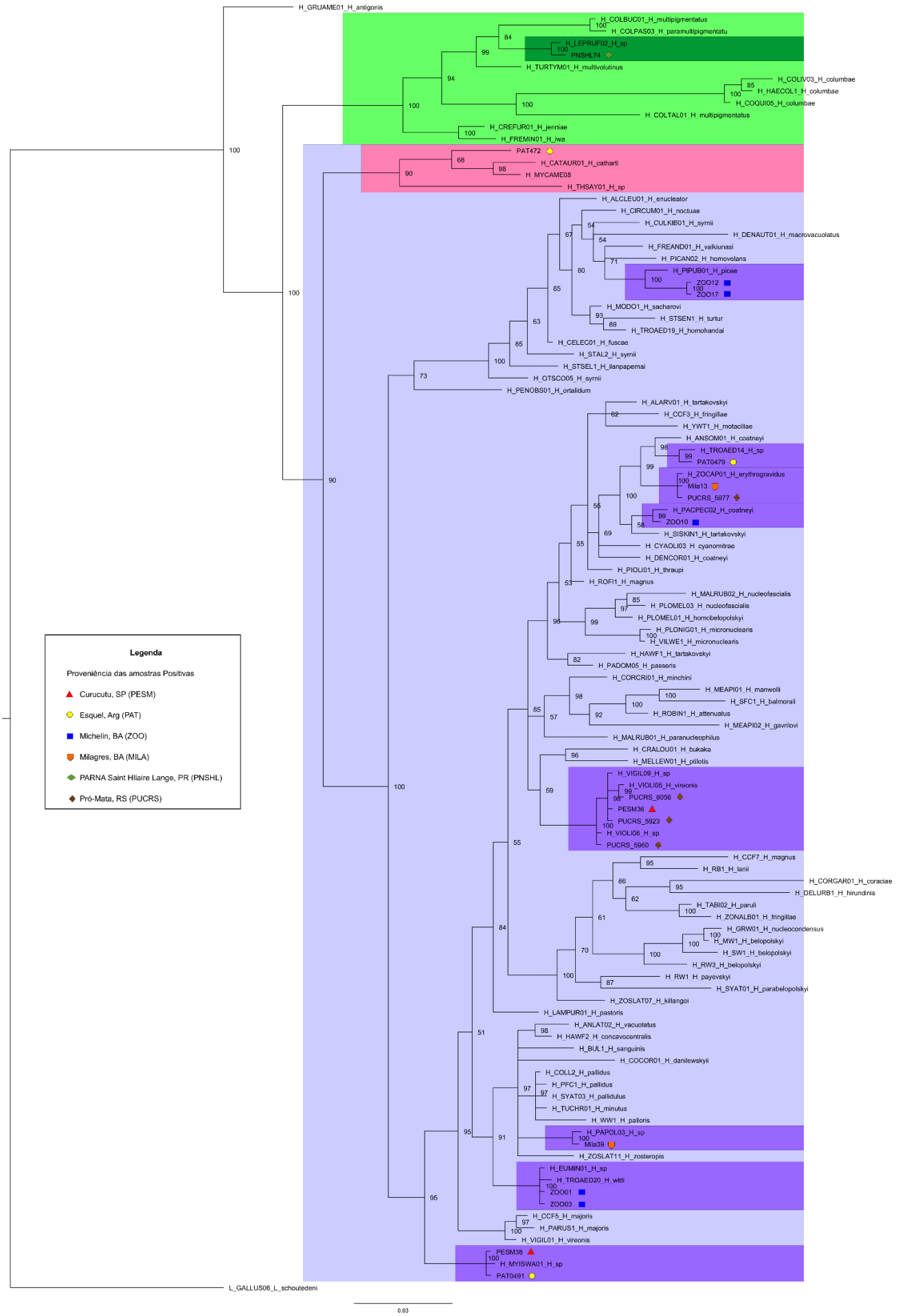
Figura 12 (próxima página) - Filogenia bayesiana baseada no gene mitocondrial *cytb* de *Plasmodium* spp das linhagens identificadas no presente estudo (indicadas pelos símbolos correspondentes, como descrito na legenda da figura). As linhagens e espécies do subgênero *Giovannolaia* estão indicadas no topo da árvore na caixa verde, de *Novyella* estão indicadas na caixa rosa e as dos subgêneros *Haemamoeba* e *Huffia* nas caixas azul e amarela respectivamente. Os nomes das linhagens são apresentados antes dos nomes das espécies de parasitas. *Leucocytozoon schoutedeni* foi usado como grupo externo. Os valores de suporte dos nodos (em percentagem) indicam probabilidades posteriores.


Legenda
Proveniência das amostras Positivas
Curucutu, SP (PESM)
Michelin, BA (ZOO)
Milagres, BA (MILA)
PARNA Saint Hilaire Lange, PR (PNSHL)
Pró-Mata, RS (PUCRS)
P_TURDUS1_P_circumflexum
P_SW5_P_circumflexum
P_GRW04_P_relictum
P_CYAOLI09_P_lucens
PESM10
P_TRMEL02
PESM55
P_DENVID01
P_MYCAME02_P_paranucleophilum
ZOO13
PUCRS_5987
PUCRS_5933
PNSHL07
P_DENPET03_P_nucleophilum
P_GRW02_P_ashfordi
P_COLL6_P_delichoni
P_COLL4_P_homocircumflexum
P_PADOM16_P_rouxi
P_PYCJOC01_Plasmodium_sp.
P_GALLUS02_P_juxtanucleare
P_ANLAT07_P_multivacuolaris
P_ANLAT01_P_globularis
P_SYAT05_P_vaughani
ZOO39
ZOO14
PUCRS_6035
PUCRS_5972
P_TURUF03_P_unalis
PUCRS_5992
PUCRS_6067
PUCRS_6062
PUCRS_5951
PUCRS_5930
P_TFUS06_P_unalis
PUCRS_6036
PNSHL46
PNSHL44
PNSHL06
P_HYLMUS01
PESM40
P_PYLEU01
PESM58
P_CINRUF01
P_BAEBIC02_P_homopolare
P_AMMAUR01
PUCRS_6012
P_SW2_P_homonucleophilum
P_ALEDIA02_P_parahexamerium
ZOO41
PNSHL35
PNSHL34
PNSHL29
P_SEIAUR01_P_cathemerium
PUCRS_6028
PUCRS_5967
PNSHL70
PNSHL19
PESM108
P_PADOM09_Plasmodium_sp.
Mila01
P_PYSUN1_P_megaglobularis
P_GALLUS01_P_gallinaceum
PESM144
P_ANGAL01
PNSHL60
P_TACRUB01
PESM122
P_DIGCYA08_P_lutzi
P_TURALB01
PNSHL04
PNSHL10
PUCRS_5954
PUCRS_6000
PUCRS_6070
PUCRS_H120170
P_LINN1_P_matutinum
PUCRS_5958
P_RAMCAR01
PNSHL51
PNSHL72
P_SPMAG01_P_tejerai
ZOO30
ZOO33
P_GRW06_P_elongatum
P_PADOM11
PNSHL45
PNSHL58
PNSHL78
L_GALLUS06_L_schoutedeni
0.03

Das linhagens de *Haemoproteus* encontradas no presente estudo, 3 foram identificadas ao nível da espécie nomeadamente: VIOLI05, VIOLI06 e VIGIL09 pertencentes a *Haemoproteus vireonis* e ZOCAP01 pertencente a *Haemoproteus erythrogravidus*. A linhagem LEPRUF02 foi o único exemplar do subgênero *Haemoproteus* sendo as demais linhagens pertencentes ao subgênero *Parahaemoproteus* (Figura 13). A maior diversidade de linhagens dos parasitas do gênero *Haemoproteus* foi encontrada em Pro Mata (4), seguido de Michelin (3), Esquel (3). PARNA Saint Hilaire-Lange apresentou o menor número de linhagens (1) (Gráfico 8). As linhagens encontradas em mais de um habitat foram registradas em Curucutu, Esquel, Milagres e Pro Mata. Onde a linhagem MYISWA01 encontrada em Esquel também foi encontrada em Curucutu, na mesma espécie de ave (*Elaenia albiceps chilensis*). VIGIL09 foi encontrada em duas aves com hábitos migratórios pertencentes à família Vireonidae em Pro Mata (*Vireo olivaceus*) e Curucutu (*Vireo chivi*). E a linhagem ZOCAP01, foi encontrada em duas aves migratórias da espécie *Zonotrichia capensis* em Milagres e Pro Mata.

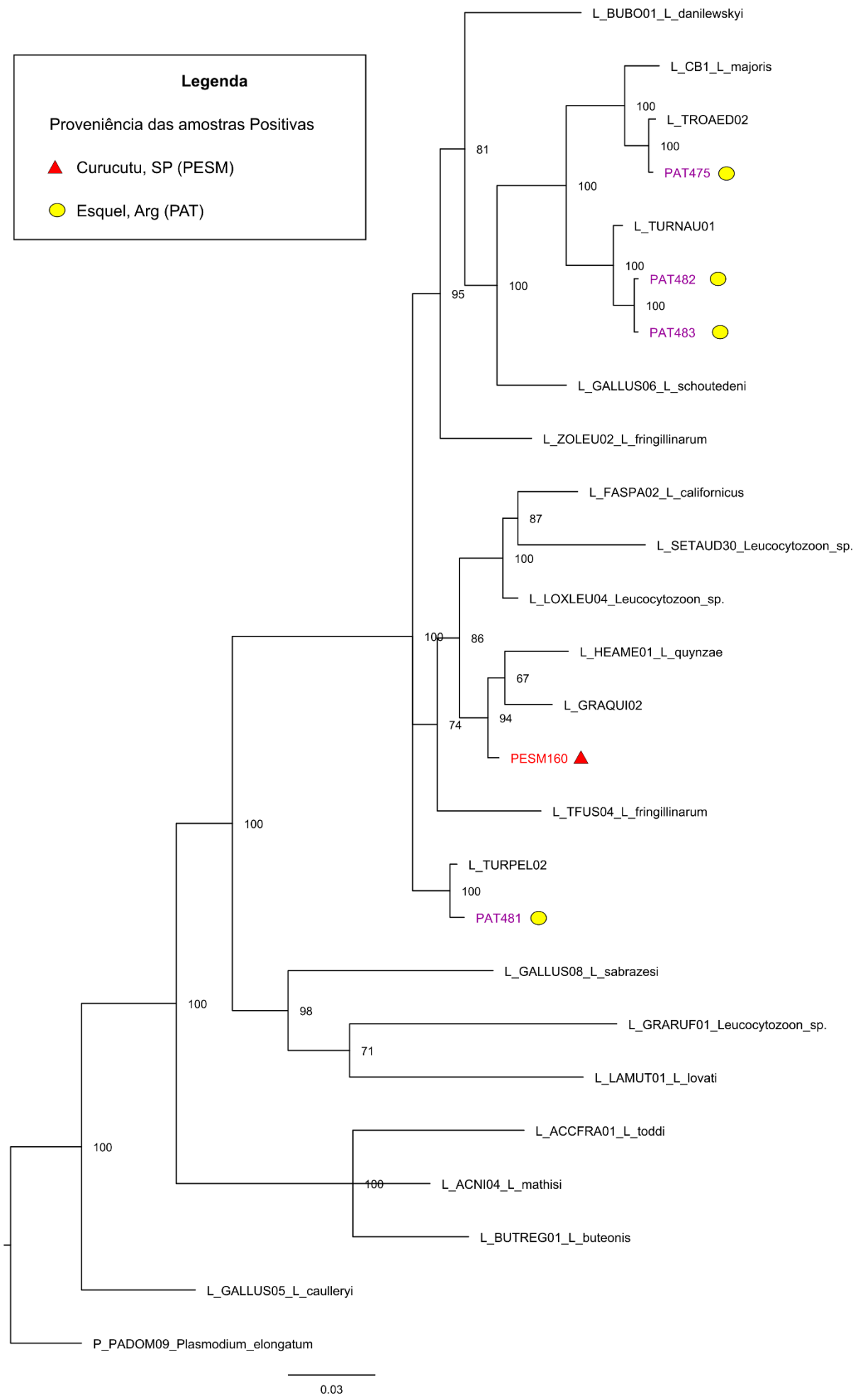
A árvore filogenética das linhagens de *cytb* de *Haemoproteus spp* identificadas no presente estudo, foram adicionadas numa base de dados contendo outras 86 linhagens obtidas do GenBank, sendo 8 do subgênero *Haemoproteus* e as restantes do subgênero *Parahaemoproteus* (Figura 13).

Figura 13 (próxima página) - Filogenia bayesiana baseada em *cytb* mostrando a posição das linhagens de espécies de *Haemoproteus* encontradas neste estudo (em caixas verde escuro, rosa e lilás escuro) e as linhagens obtidas na base de dados. Cada local de estudo está indicado por símbolos. Os nomes das linhagens são apresentados antes dos nomes das espécies de parasitas. O topo da árvore (caixa verde claro) representa o subgênero *Haemoproteus* e o subgênero *Parahaemoproteus* é representado pela caixa lilás claro. *Leucocytozoon schoutedeni* foi usado como grupo externo. Os valores de suporte dos nodos (em percentagem) indicam probabilidades posteriores.


H_GRUAME01_H_antigonis
H_COLBUC01_H_multipigmentatus
H_COLPAS03_H_paramultipigmentatu
H_LEPRUF02_H_sp
PNSHL74
H_TURTYM01_H_multivolutinus
H_COLIVO3_H_columbae
H_HAECOL1_H_columbae
H_COQUI05_H_columbae
H_COLTAL01_H_multipigmentatus
H_CREFUR01_H_jenniae
H_FREMIN01_H_iwa
PAT472
H_CATAUR01_H_catharti
H_MYCAME08
H_THSAY01_H_sp
H_ALCLEU01_H_enucleator
H_CIRCUM01_H_noctuae
H_CULKIB01_H_syrnii
H_DENAUT01_H_macrovacuolatus
H_FREAND01_H_valkiunasi
H_PICAN02_H_homovelans
H_PIPUB01_H_picae
ZOO12
ZOO17
H_MODO1_H_sacharovi
H_STSEN1_H_turtur
H_TROAED19_H_hornohandai
H_CELEC01_H_fuscae
H_STAL2_H_syrnii
H_STSEL1_H_ilanpapernai
H_OTSCO05_H_syrnii
H_PENOBS01_H_ortalidum
H_ALARV01_H_tartakovskyi
H_CCF3_H_fringillae
H_YWT1_H_motacillae
H_ANSOM01_H_coatneyi
H_TROAED14_H_sp
PAT0479
H_ZOCAP01_H_erythrogravidus
Mila13
PUCRS_5977
H_PACPEC02_H_coatneyi
ZOO10
H_SISKIN1_H_tartakovskyi
H_CYAOLI03_H_cyanomitrae
H_DENCOR01_H_coatneyi
H_PIOLI01_H_thraupi
H_ROFI1_H_magnus
H_MALRUB02_H_nucleofascialis
H_PLOMEL03_H_nucleofascialis
H_PLOMEL01_H_homobelopolskyi
H_PLONIG01_H_micronuclearis
H_VILWE1_H_micronuclearis
H_HAWF1_H_tartakovskyi
H_PADOM05_H_passeris
H_CORCRI01_H_minchini
H_MEAPI01_H_manwolli
H_SFC1_H_balmorali
H_ROBIN1_H_attenuatus
H_MEAPI02_H_gavrilovi
H_MALRUB01_H_paranucleophilus
H_CRALOU01_H_bukaka
H_MELLEW01_H_ptilotis
H_VIGIL09_H_sp
H_VIOLI05_H_vireonis
PUCRS_6056
PESM36
PUCRS_5923
H_VIOLI06_H_sp
PUCRS_5960
H_CCF7_H_magnus
H_RB1_H_lanii
H_CORGAR01_H_coraciae
H_DELURB1_H_hirundinis
H_TABI02_H_paruli
H_ZONALB01_H_fringillae
H_GRW01_H_nucleocondensus
H_MW1_H_belopolskyi
H_SW1_H_belopolskyi
H_RW3_H_belopolskyi
H_RW1_H_payevskyi
H_SYAT01_H_parabelopolskyi
H_ZOSLAT07_H_killangoi
H_LAMPUR01_H_pastoris
H_ANLAT02_H_vacuolatus
H_HAWF2_H_concavocentralis
H_BUL1_H_sanguinis
H_COCOR01_H_danilewskyii
H_COLL2_H_pallidus
H_PFC1_H_pallidus
H_SYAT03_H_pallidulus
H_TUCHR01_H_minutus
H_WW1_H_palloris
H_PAPOL03_H_sp
Mila39
H_ZOSLAT11_H_zosteropis
H_EUMIN01_H_sp
H_TROAED20_H_witti
ZOO01
ZOO03
H_CCF5_H_majoris
H_PARUS1_H_majoris
H_VIGIL01_H_vireonis
PESM38
H_MYISWA01_H_sp
PAT0491
L_GALLUS06_L_schoutedeni
Legenda
Proveniência das amostras Positivas
Curucutu, SP (PESM)
Esquel, Arg (PAT)
Michelin, BA (ZOO)
Milagres, BA (MILA)
PARNA Saint Hilaire Lange, PR (PNSHL)
Pró-Mata, RS (PUCRS)
0.03

As linhagens referentes ao gênero *Leucocytozoon*, foram encontradas em Curucutu e Esquel (Gráfico 8). Das linhagens encontradas no presente estudo nenhuma foi identificada ao nível de espécie, tendo-se limitado ao gênero. A maior diversidade de linhagens do gênero *Leucocytozoon* foi verificada em Esquel e, na sua maioria em aves passeriformes com hábitos migratórios. A linhagem TURNAU01 foi a mais prevalente sendo encontrada maioritariamente em *Turdus falcklandii*. Ao todo foram encontradas 4 linhagens *Leucocytozoon* e foram usadas junto com as 20 linhagens de espécies de *Leucocytozoon* de referência para a análise filogenética (Figura 14).

Figura 14 (próxima página) - Filogenia bayesiana das linhagens de *cytb* de *Leucocytozoon*, mostrando a posição da linhagem brasileira PESM160 (98%GRAQUI02) (indicado por ▲) e as linhagens argentinas (indicado por ○) entre as linhagens representativas de *Leucocytozoon* do GenBank. *Plasmodium elongatum* foi usado como grupo externo. Os nomes das linhagens são apresentados antes dos nomes das espécies de parasitas e os valores de suporte dos nodos (em percentagem) indicam probabilidades posteriores.


Legenda
Proveniência das amostras Positivas
Curucutu, SP (PESM)
Esquel, Arg (PAT)
L_BUBO01_L_danilewskyi
L_CB1_L_majoris
L_TROAED02
PAT475
L_TURNAU01
PAT482
PAT483
L_GALLUS06_L_schoutedeni
L_ZOLEU02_L_fringillinarum
L_FASPA02_L_californicus
L_SETAUD30_Leucocytozoon_sp.
L_LOXLEU04_Leucocytozoon_sp.
L_HEAME01_L_quynzae
L_GRAQUI02
PESM160
L_TFUS04_L_fringillinarum
L_TURPEL02
PAT481
L_GALLUS08_L_sabrazesi
L_GRARUF01_Leucocytozoon_sp.
L_LAMUT01_L_lovati
L_ACCFRA01_L_toddi
L_ACNI04_L_mathisi
L_BUTREG01_L_buteonis
L_GALLUS05_L_caulleryi
P_PADOM09_Plasmodium_elongatum
0.03

7 DISCUSSÃO

7.1 Infecção experimental com hemosporídeos

No presente estudo combinamos o diagnóstico morfológico, molecular e a infecção experimental usando aves de diferentes gêneros como doadoras de parasitas com vista a identificar as espécies de *Plasmodium* de algumas linhagens encontradas em aves de vida livre e cativas da FPZSP. Segundo vários autores[1,4,7,11,54], a correta identificação destes parasitas é essencial para melhor entendimento da interação hospedeiro-parasita, obtenção de informações sobre as características do parasita assim como para analisar a co-infecção em aves por diferentes espécies de hemosporídeos.

Embora as aves receptoras não tenham desenvolvido parasitemia, o experimento foi importante para demonstrar que não ocorre nenhuma reação de incompatibilidade sanguínea em decorrência da inoculação de sangue de heterologo em pintinhos (*Gallus gallus domesticus*). Segundo Shimmel *et al*.[65], a inoculação de sangue em um receptor de uma espécie diferente (transfusão de sangue heterólogo) pode constituir um risco para a saúde ou mesmo morte, devido a incompatibilidades do tipo sanguíneo. Como sucedeu com Carlson *et al*.[19], onde após a inoculação de sangue de um pardal branco (*Zonotrichia leucophrys pugetensis*) em um canário, este veio a óbito imediatamente e quando foi feito o esfregaço de sangue foi detectada uma considerável agregação de trombócitos.

Na maioria dos experimentos usando aves selvagens com infecção crônica como doadoras é possível obter diferentes níveis de parasitemia, pois de acordo com vários estudos[6,19], a capacidade de infectar as aves e a dinâmica da parasitemia, não depende da dose de merontes no inóculo. Segundo Dimitrov *et al*.[18], a susceptibilidade de alguns hospedeiros às diversas linhagens de *Plasmodium spp*. pode variar significativamente. Alguns hospedeiros não respondem à infecção experimental com algumas linhagens, como aconteceu com os patinhos que não foram suscetíveis à infecção obtida de um isolado de pardal (GRW11), mas desenvolveram parasitemia quando essas aves foram expostas à coinfecção (GRW11 e PADOM02) obtida de canário doméstico.

As aves inoculadas com sangue de *Pavo muticus*, positivo para *Plasmodium sp*. linhagem DENVID01 (acesso GenBank #KU057966) por PCR, apresentaram formas intraeritrocíticas compatíveis com *Plasmodium sp*. no 4° dpi. Porém, ao longo do período do experimento, a parasitemia não aumentou, não foram verificadas formas evolutivas dos parasitas e as poucas formas que existiam desapareceram. No estudo efetuado por Levin *et al*.[50], as aves doadoras foram positivas para *Plasmodium elongatum* no exame microscópico e a PCR mostrou um resultado negativo para esse parasita. No mesmo estudo as aves receptoras foram susceptíveis a infecção por *Plasmodium ashfordi* (GRW02) mas desenvolveram uma parasitemia extremamente baixa (0.0001%) sem a presença de gametócitos e não foi reportada nenhuma mortalidade, porém foram positivas na PCR. Casos similares por vezes são verificados em infecções abortivas por hemosporídeos onde a PCR é positiva mesmo na ausência de gametócitos[4,50]. Quando o parasita não completa o seu desenvolvimento até chegar a fase de gametócito no sangue periférico, a sua transmissão natural através de um vetor é impossível[4,18] sendo finalizada a transmissão do parasita[50]. Segundo Levin *et al*.[50], o diagnóstico molecular baseado em PCR, pode identificar este tipo de infecção como positiva, podendo deste modo subsidiar análises evolucionárias.

No presente estudo só foi possível visualizar formas imaturas de *Plasmodium sp.* e a parasitemia apresentou-se muito baixa e nenhuma das aves desenvolveu qualquer sinal clínico. A baixa parasitemia e a ausência de sinais clínicos também foi verificada em animais experimentalmente e naturalmente infectados com *Plasmodium juxtanucleare* em vários estudos[67,68]. Estes resultados juntos corroboram a hipótese de que a baixa parasitemia não é uma consequência exclusiva da inoculação experimental do parasita, mas sim da limitação do desenvolvimento do parasita, que pode estar associado à baixa virulência ou a uma resposta imune eficiente do hospedeiro[69]. Na ave doadora do presente estudo (*Pavo muticus*) foram visualizadas formas similares a trofozoítos, mas dada a baixa parasitemia verificada na lâmina, aliada a ausência de mais formas evolutivas do parasita, não foi possível confirmar esse resultado, embora a amostra seja positiva na PCR. No estudo anteriormente realizado na FPZSP a mesma ave foi positiva no exame molecular e microscópico, porém a parasitemia era muito baixa[14,15]. Estes resultados sugerem que provavelmente se trate de uma infecção crônica, caracterizada pela ausência de gametócitos e com poucas formas imaturas do parasita. As infecções crônicas provavelmente persistem por toda a vida nas aves infectadas e, tanto os parasitas circulantes quanto os merontes exoeritrocitários persistentes podem servir como fonte de infecções recrudescentes[4]. Momentos de imunossupressão do hospedeiro ou em resposta à

sazonalidade podem resultar num aumento da parasitemia[1,4,24]. Segundo Krettli[70], a presença de gametócitos na circulação sanguínea das aves, mesmo em níveis baixos é importante para saber a sua distribuição e a transmissão dos parasitas.

A parasitemia pode ser influenciada por diversos fatores como: a imunidade da ave, o estágio da infecção e o período em que ela é estabelecida, a espécie do parasita e do hospedeiro, o sexo e a idade do hospedeiro e características intrínsecas do hospedeiro como a presença de hormônios sexuais[4]. Uma das propostas para contornar a questão da baixa parasitemia nas infecções experimentais é a imunossupressão[71]. Em alguns estudos sobre a biologia de *P. juxtanucleare* foram executados métodos de imunossupressão em galinhas, como a esplenectomia, irradiação por cobalto e raio X, administração de acetato de delta-hidrocortisona a 2,5% via intramuscular, administração de acetato de metilprednisolona via intramuscular e inoculação do vírus da anemia infecciosa das galinhas[68-72]. A elevação da parasitemia foi verificada na maioria das aves a partir do 10° após imunossupressão com redução de parasitas ao fim de 30 dpi[68-73]. Elizei[68] e Krettli[70] constataram a presença de um elevado número de trofozoítos seguido de esquizontes e um baixo número de gametócitos. Vashist[71] verificou diversas formas eritrocitárias após a imunossupressão, porém, em torno do 12°dpi essas formas não foram mais verificadas. Resultados similares também foram encontrados no presente estudo, onde no 4° dpi foram verificados trofozoítos e no 10°dpi não foram verificadas outras formas evolutivas dos parasitas (esquizontes e gametócitos) e as poucas formas que existiam desapareceram. Sob ponto de vista taxonômico, a infecção experimental de aves é crucial para a identificação das espécies dos parasitas da malária aviária, pois permite a observação detalhada das características morfológicas dos vários estágios sanguíneos dos parasitas do gênero *Plasmodium*[4,18,51].

As aves cativas vivem sob constante estresse. A realização de experimentos expondo as aves diretamente ao vetor visa efetuar a transmissão natural do parasita e evita maior estresse nos animais[58]. Alternativamente recorre-se a métodos para a preservação dos parasitas mesmo em casos de baixa parasitemia, como sucedeu no presente estudo. Nossos resultados reforçam a necessidade da realização de infecções experimentais para a identificação das espécies de *Plasmodium sp.* através de métodos que permitam o aumento da parasitemia e desenvolvimento de mais formas evolutivas do parasita no sangue das aves inoculadas além do uso de um vetor competente para manutenção da infecção.

7.2 Prevalência e diversidade de hemosporídeos em aves silvestres

A ocorrência de hemosporídeos em aves silvestres tem vindo a despertar cada vez mais interesse de muitos pesquisadores em diferentes regiões do mundo, com vista a entender a parasitologia ecológica, a conservação e manejo de espécies de vertebrados[2,5-7,30]. Nossos resultados revelaram a ocorrência de hemosporídeos em aves silvestres de algumas áreas da Argentina e do Brasil usando métodos morfológicos e moleculares.

Os métodos de detecção dos hemosporídeos envolvem a combinação de observações microscópicas, a detecção molecular e o sequenciamento de genes alvos específicos. Entretanto, esse diagnóstico pode ser comprometido, principalmente porque em muitos casos os hospedeiros vertebrados silvestres apresentam a infecção em fase crônica e com baixos níveis de parasitemia[4,7,14,27]. Neste estudo a ocorrência de hemosporídeos foi confirmada por microscopia e PCR. Não foi possível realizar esfregaços sanguíneos de todos os indivíduos amostrados, tendo-se realizado em 64 aves, das quais 12 foram positivas para *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Todos os esfregaços positivos apresentaram uma baixa parasitemia e poucas formas eritrocitárias dos parasitas, fato que impossibilitou a identificação da espécie de algumas linhagens. A identificação da espécie desses parasitas muita das vezes só é possível após a investigação da dinâmica da parasitemia e a observação de todos os estágios sanguíneos do parasita (trofozoítos, merontes e gametócitos)[4,17,60]. Baixas parasitemias em esfregaços de sangue periférico sugerem infecções crônicas, enquanto elevadas parasitemias indicam infecções recentes[16,17,74].

A prevalência dos hemosporídeos em amostras brasileiras do presente estudo foi de 12,77% (65/509) e 31,8% (7/22) para as amostras argentinas. Nossos resultados evidenciaram também uma elevada prevalência de infecção por *Plasmodium* em aves brasileiras enquanto as aves argentinas revelaram elevada prevalência de infecção por *Leucocytozoon*. Também constatamos uma moderada prevalência de infecção por *Haemoproteus* comparativamente a infecção por *Leucocytozoon* em aves amostradas em Esquel. A presença de infecções moderadas a altas por *Leucocytozoon* e *Haemoproteus* pode ser explicada por uma possível recaída da parasitemia que coincide com a época de reprodução do hospedeiro vertebrado ou frequentes reinfecções[4].

No presente estudo, as aves brasileiras foram amostradas em áreas de conservação situadas em estados costeiros caracterizados principalmente pela predominância de Mata Atlântica. A prevalência de *Plasmodium* em aves silvestres da Mata Atlântica e Cerrado foi reportada em vários estudos[15,23,27,40,74-78]. Nossos resultados corroboram esses estudos, demonstrando uma elevada prevalência de *Plasmodium spp*. em aves de vida livre da ordem Passeriformes.

Embora existam muitos estudos sobre hemosporídeos aviários, existem poucos sobre o gênero *Leucocytozoon* na região Neotropical[21]. O estudo realizado por Lotta *et al*.[78], evidenciou que a distribuição de *Leucocytozoon* na região Neotropical é influenciada pela elevação, com altas prevalências entre 2400 a 3200 metros. Em nenhum dos estudos realizados anteriormente no Brasil usando métodos moleculares ou morfológicos[15,21,75-78] foram analisadas amostras de aves quanto à presença de *Leucocytozoon*. Porém, recentemente foi feita a primeira descrição de sequência genética de *Leucocytozoon* no Brasil, em uirapuru-de-chapéu-azul (*Lepidothrix coronata*) da região central da Amazônia[23]. Esse estudo foi conduzido em populações de aves da Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal usando um protocolo que combina *real time* PCR, *nested* PCR e microscopia, onde foram detectadas cinco amostras positivas para *Leucocytozoon*, não tendo se detectado o parasita em esfregaços. As sequências das amostras positivas revelaram que as cinco amostras foram infectadas pela linhagem LEPCOR08 (atualmente denominada SETAUD30; acesso GenBank: MG714922-MG714926) não tendo sido possível chegar à espécie de *Leucocytozoon*[23]. No presente estudo foram encontradas seis amostras positivas para *Leucocytozoon* sendo duas em Curucutu e quatro em Esquel. Em Curucutu as aves positivas foram duas *Elaenia albiceps chilensis* e em Esquel foram uma *Spinus barbatus* e três *Turdus falcklandii*. *Elaenia albiceps chilensis* está presente na Argentina e tem um padrão migratório ao longo da costa Atlântica e na Amazônia para invernada[79]. No presente estudo, *Elaenia albiceps chilensis* foi amostrada tanto em Curucutu como em Esquel, Argentina.

As aves acometidas pela malária devem ser consideradas como possíveis fontes de novas infecções, devido às mudanças ambientais e climáticas e à introdução acidental ou deliberada de aves e insetos vetores em regiões que não co-evoluíram com o parasita[2,3]. As aves migratórias desempenham um papel importante na epidemiologia da malária aviária, pois anualmente essas aves deslocam-se entre diferentes regiões zoogeográficas, fato que favorece a dispersão dos parasitas da malária inter ou intra continentalmente[43,45]. Alguns estudos têm demostrado que algumas espécies de hemosporídeos aviários são transmitidas durante a

nidificação e outras durante o período de invernada nas regiões tropicais e subtropicais[44]. Segundo Pulgarín-R *et al.*[80], a prevalência e a diversidade de linhagens de hemosporídeos, varia significativamente ao longo do tempo, sendo elevada durante a época reprodutiva e nas migrações de outono e inverno, declinando durante o inverno. Estes achados sugerem que a transmissão dos hemosporídeos em alguns casos pode estar associada a localização geográfica ou a interação parasita-vetor[45,53].

O presente estudo revelou uma grande diversidade de linhagens de hemosporídeos. Algumas das linhagens encontradas no presente trabalho foram previamente descritas em outros estudos e, na sua maioria na América do Sul[13-15,22,23,76-78,81-84]. Muitas das linhagens encontradas não foram descritas até ao momento (Apêndice A). Esses resultados corroboram com o método proposto por Bensch *et al.*[11] para identificação de linhagens e com o MalAvi (mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/), assegurando que se trata de novas linhagens.

A linhagem de *Leucocytozoon* encontrada em Curucutu apresentou 98% de similaridade com a linhagem GRAQUI02 descrita na Colômbia em passeriformes[78]. Essa linhagem foi descrita em *Grallaria quitensis*, uma espécie de ave da família Formicariidae que pode ser encontrada na Colômbia, Equador e Peru. Embora descrita em estudos anteriores, essa linhagem não está relacionada com qualquer uma das morfoespécies conhecidas. Na análise filogenética podemos constatar que a morfoespécie mais próxima é *Leucocytozoon quynzae*, descrita na América do Sul em beija flor[22]. As linhagens de *Leucocytozoon* encontradas em Esquel (TROAED02, TURPEL02 e TURNAU01), agruparam com as linhagens descritas no Peru, Ásia e África em Passeriformes de vida livre e cativos[85-88]. Das linhagens encontradas no presente estudo nenhuma foi identificada ao nível da espécie, tendo-se limitado ao gênero. A morfoespécie mais próxima da linhagem TROAED02 é *Leucocytozoon majoris*, descrita em aves de várias ordens[5,8]. As linhagens TURPEL02 e TURNAU01 não apresentaram nenhuma morfoespécie.

As linhagens HYLMUS01, DENPET03, TURALB01, TACRUB04, EUMIN01, THRSAY01, EUPMAC03, TROAED14 e MYISWA01 encontradas no presente estudo, apresentaram esfregaços positivos, porém com baixa parasitemia e poucas formas eritrocitárias dos parasitas, fato que impossibilitou a identificação da espécie. Esse impasse também foi constatado no estudo realizado por Chagas *et al.*[13-15] onde foram detectadas 14 linhagens de *Plasmodium*, sendo que apenas duas tinham espécie descrita: DENPET03 (*P. nucleophilum*) e GRW06 (*P. elongatum*). Apesar da maior sensibilidade dos métodos moleculares para detectar parasitas do

que a microscopia, existem limitações no seu uso no estudo de parasitas aviários pela dificuldade de ligar sequências genéticas a espécies cuja compreensão da taxonomia e biodiversidade permanecem limitadas[11,12]. Vários têm sido os esforços para vincular essas linhagens genéticas às espécies descritas, indicando a necessidade de mais estudos usando exame microscópico e análise molecular[16,17].

Das linhagens de *Plasmodium* encontradas no presente estudo, em 11 foram identificadas as espécies: PADOM09 e TACRUB04 pertencentes a *Plasmodium cathemerium*, CINRUF01 e AMMAUR01 pertencentes a *Plasmodium homopolare*, PADOM11 pertencente a *Plasmodium juxtanucleare*, TURALB01 e RAMCAR01 pertencentes a *Plasmodium lutzi*, DENPET03 pertencente a *Plasmodium nucleophilum*, HYLMUS01, TUMIG03 e TURUF03 pertencentes a *Plasmodium unalis*. As restantes linhagens só foram identificadas ao nível do gênero e apresentaram 100% de similaridade com as linhagens já depositadas no GenBank e MalAvi, com exceção das linhagens próximas (99% ou 98% de identidade) a NYCNYC01, DENVID01, CHACAM02.

Com base na árvore filogenética pode-se dizer que a maioria das linhagens encontradas no PARNA Saint Hilaire-Lange pertence ao subgênero *Huffia* e as demais linhagens encontradas no presente estudo pertencem aos subgêneros *Novyella* e *Haemamoeba*. As linhagens de *Haemoproteus* encontradas foram amplamente descritas na Região Neotropical e Europa em Passeriformes[14,15,23,81,84], mostrando a grande diversidade de hemosporídeos existentes nos locais onde foram coletadas as amostras.

A maioria das linhagens de *Haemoproteus* encontradas neste estudo agrupou no subgênero *Parahaemoproteus* com exceção de LEPRUF02 encontrada em *Leptotila verreauxi* (Columbiformes) que agrupou com o subgênero *Haemoproteus*. Essa linhagem também foi encontrada no Brasil em *Leptotila rufaxilla*, uma ave residente pertencente a ordem Columbiformes[23,82,85]. A linhagem MYISWA01 descrita por Fecchio *et al.*[23] em Trochiliformes e Passeriformes, foi encontrada em *Elaenia albiceps chilensis* em Curucutu e Esquel, o que retrata a sua característica generalista e a sua dispersão em diferentes países. A linhagem HYLMUS01, encontrada em *Turdus albicollis* até ao momento só foi reportada nos Estados Unidos da América em Passeriformes da família Turdidae (*Hylocichla mustelina*)[88].

A linhagem encontrada em *Asthenes pyrrholeuca* (PAT472), em Esquel, apresentou 96% de similaridade com a linhagem MYCAME08 (*Haemoproteus sp*.) e CATAUR01 (*Haemoproteus catharti*). A morfoespécie mais próxima é *Haemoproteus catharti*, amplamente descrita em urubu-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) "abutres do novo mundo" (Cathartiformes: Cathartidae) na Ámerica do Norte[89] e em Garça-vaqueira (*Bubulcus ibis ibis*) na África Central[90]. No estudo realizado por Yabsley *et al*.[89], *H. catharti* agrupou num clado distinto de outras linhagens de *Haemoproteus spp*., o que segundo os autores[89] sugere uma proximidade com *Haemocystidium* e *Plasmodium spp*. Em outro estudo efetuado por Villar *et al*.[90], o clado formado por *H. catharti* e a linhagem MYCAMH1 (*Haemoproteus spp*.) também não agrupou com as demais espécies de *Haemoproteus* tendo se posicionado próximo de espécies de *Plasmodium*. Na análise filogenética do presente estudo, a linhagem de *Asthenes pyrrholeuca* (PAT472) posicionou-se num clado muito bem suportado também distinto do clado dos subgêneros *Haemoproteus* e *Paraheamoproteus*. Os resultados desses estudos juntos corroboram a necessidade de aprofundar mais os estudos de diversidade genética combinando os métodos morfológicos, características do ciclo de vida e métodos moleculares de modo a entender a relação entre os hemosporídeos de aves e outras espécies relacionadas, para melhor compreensão da interação parasito-hospedeiro e das relações evolutivas.

8 CONCLUSÕES

- O modelo experimental testado no presente estudo não permitiu a identificação das linhagens de *Plasmodium* obtidas de aves com infecção crônica.

- As aves inoculadas não apresentaram nenhuma reação de incompatibilidade sanguínea devido ao sangue heterólogo.

- As aves apresentaram uma infecção abortiva, reforçando a necessidade de imunossupressão com vista a incrementar a parasitemia.

- Os protocolos implementados no presente estudo permitiram a identificação de linhagens de *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* circulantes na Mata Atlântica (Brasil) e na Floresta Andino-Patagônica (Argentina), tendo revelado uma grande diversidade de linhagens de hemosporídeos.

- Maior prevalência/diversidade de linhagens de *Leucocytozoon* foi encontrada em aves amostradas na Argentina, comparativamente às encontradas em aves brasileiras, contrariando a hipótese de gradiente latitudinal, segundo a qual a prevalência e diversidade tendem a aumentar em direção à linha do equador. Em relação a *Plasmodium/Haemoproteus*, nossos resultados corroboram a hipótese de gradiente latitudinal.

- Nossos estudos revelaram maior prevalência de *Leucocytozoon* em aves migratórias da Argentina comparativamente às aves amostradas no Brasil, reforçando a necessidade de realização de estudos para entender a dinâmica de transmissão da malária aviária em aves migratórias e os fatores que podem contribuir para a disseminação dos vetores e parasitos.

- A inclusão de amostras de aves da Argentina pode contribuir bastante para o delineamento de estudos que visam entender o efeito da migração das aves na dispersão dos hemoparasitas, pois algumas aves infectadas por *Leucocytozoon* nessa região têm um padrão migratório ao longo da costa Atlântica e Amazônia.

- Foram encontradas 42 linhagens, das quais 18 são novas descrições. Entretanto as baixas parasitemias encontradas nas 12 lâminas positivas impossibilitaram a descrição de novas espécies. Assim, muitas linhagens foram diagnosticadas somente até o gênero reforçando a necessidade da realização de infecções experimentais e a combinação de diagnóstico usando métodos morfológicos e moleculares para a correta identificação destes parasitas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atkinson CT. Avian Malaria. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. Parasitic Diseases of Wild Birds. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 35-53.

2. Sehgal RN. Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2015;4(3):421-30.

3. Van Riper III C, Van Riper SG, Goff ML, Laird M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecol Monogr. 1986;56(4):327-44.

4. Valkiūnas G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. New York: CRC Press; 2005.

5. Atkinson CT, Van Riper III C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M. Bird-parasite interactions: ecology, evolution, and behaviour. Oxford: Oxford University Press; 1991. p. 19-48.

6. Pigeault R, Vezilier J, Cornet S, Zele F, Nicot A, Perret P, *et al*.. Avian malaria: a new lease of life for an old experimental model to study the evolutionary ecology of *Plasmodium*. Phil Trans R Soc B 2015; 370(1675): 20140300.

7. Rivero A, Gandon S. Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. Trends Parasitol. 2018;34(8):712-26.

8. Perkins SL, Schall JJ. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. J Parasitol. 2002;88(5):972-8.

9. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, *et al*. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. Proc R Soc Lond B 2000; 267:1583–9.

10. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. J Parasitol. 2004;90(4):797-802.

11. 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. Mol Ecol Resour. 2009;9(5):1353-8.

12. Pérez-Tris J, Hasselquist D, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenström J, Bensch S. What are malaria parasites? Trends Parasitol. 2005;21(5):209-11.

13. Chagas CRF, Valkiūnas G, Nery CVC, Henrique PC, Gonzalez IHL, Monteiro EF, *et al*. *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* from egyptian goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2013;2:286-91.

14. Chagas CR, Guimarães LO, Monteiro EF, Valkiūnas G, Katayama MV, Santos SV, *et al*. Haemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. Parasitol Res. 2016;115(4):1443-52.

15. Chagas CRF, Valkiūnas G, Guimarães LO, Monteiro EF, Guida FJV, Simões RF, *et al*. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. Malar J. 2017; 16:8.

16. Valkiūnas G, Atkinson CT, Bensch S, Sehgal RNM, Ricklefs RE. Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number? Trends Parasitol. 2008;24(6):247-8.

17. Valkiūnas G, Iezhova TA, Križanauskiené A, Palinauskas V, Sehgal RN, Bensch S. A comparative analysis of microscopy and pcr-based detection methods for blood parasites. J Parasitol. 2008;94(6):1395-401.

18. Dimitrov D, Palinauskas V, Iezhova TA, Bernotienė R, Ilgūnas M, Bukauskaitė D, *et al*. *Plasmodium spp*.: an experimental study on vertebrate host susceptibility to avian malaria. Exp Parasitol. 2015; 148:1–16.

19. Carlson JS, Giannitti F, Valkiūnas G, Tell LA, Snipes J, Wright S, *et al*. A method to preserve low parasitaemia Plasmodium-infected avian blood for host and vector infectivity assays. Malar J. 2016; 15:154.

20. Palinauskas V, Valkiūnas G, Bolshakov CV, Bensch S. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. Exp Parasitol. 2008; 120:372–80.

21. Forrester DJ, Greiner EC. Leucocytozoonosis. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. Parasitic diseases of wild birds. Ames: Wiley- Blackwell;2008, p. 54-107.

22. Matta NE, Lotta IA, Valkiūnas G, González AD, Pacheco MA, Escalante AA, *et al*. Description of *Leucocytozoon quynzae sp*. nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae) from hummingbirds, with remarks on distribution and possible vectors of leucocytozoids in South America. Parasitol Res. 2014; 113(2): 457-68.

23. Fecchio A, Silveira P, Weckstein JD, Dispoto JH, Anciães M, Bosholn M, *et al*. First record of *Leucocytozoon* (Haemosporida: Leucocytozoidae) in Amazonia: Evidence for rarity in Neotropical lowlands or lack of sampling for this parasite genus? J Parasitol. 2018;104(2):168-72.

24. Vanstreels RE, Parsons NJ. Malária aviária e outras hemosporidioses aviárias. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2014. p. 1427-43.

25. Levin II, Valkiūnas G, Santiago-Alarcon D, Cruz LL, Iezhova TA, O'Brien SL, *et al*. Hippoboscid-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. Int J Parasitol. 2011;41(10):1019-27.

26. Clark P, Boardman WS, Raidal S. Atlas of clinical avian hematology. Ames: Wiley-Blackwell Publishing; 2009.

27. Braga EM, Silveira P, Belo NO, Valkiūnas G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium spp*. in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106 Suppl 1:3-11.

28. LaPointe DA, Goff ML, Atkinson CT. Comparative susceptibility of introduced forest-dwelling mosquitoes in Hawaii to avian malaria, *Plasmodium relictum*. J Parasitol. 2005; 91(4); 843-9.

29. Suprihati E, Yuniarti WM. The phylogenetics of *Leucocytozoon caulleri* infecting broiler chickens in endemic areas in Indonesia. Vet World. 2017; 10(11):13244-1328.

30. Rodriguez MH, Hernández-Hernández Fde L. Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34(7):615-24.

31. Cowman AF, Berry D, Baum J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. J Cell Biol. 2012;198(6):961–97.

32. Paaijmans KP, Blanford S, Bell AS, Blanford JI, Read AF, Thomas MB. Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(34):15135-9.

33. Abraham EG, Jacobs-Lorena M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. Insect Biochem Mol Biol. 2004;34(7):667-71.

34. Lehane MJ. The Biology of Blood-Sucking in Insects. 2nd edition. New York: Cambridge University Press; 2005.

35. Carrera M. Insetos de interesse médico e veterinário. Curitiba: UFPR;1991.

36. Chapman RF. Mechanics of food handling by chewing insects. In: Chapman RF, de Boer G, Editors. Regulatory mechanisms in insect feeding. London: Chapman and Hall; 1995. p.3-31.

37. Dillon ME, Wang G, Garrity PA, Huey R. Thermal preference in Drosophila. J Therm Biol. 2009; 34:109–19.

38. Lahondère C, Lazzari CR. Thermal stress and thermoregulation during feeding in *Anopheles* mosquitoes. In: Manguin S. New insights into malaria vectors. InTech. 2013.

39. Campbell TW. Exotic animal hematology and cytology. 4th edition. John Wiley & Sons.; 2015. p. 115-29.

40. Leite YFC, Pinheiro RP, Braga EM. Prevalência de Hemosporideos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. Ornithologia. 2013; 6(1):1-13.

41. Reinoso-Pérez MT, Canales-Delgadillo JC, Chapa-Vargas L, Riego-Ruiz L. Haemosporidian parasite prevalence, parasitemia, and diversity in three resident bird species at a shrubland dominated landscape of the Mexican highland plateau. Parasit Vectors. 2016;9(1):307.

42. LaPointe DA, Goff ML, Atkinson CT. Thermal constraints to the sporogonic development and altitudinal distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawaii. J Parasitol.

2010; 96:318–24.

43. Araújo FAA. Febre do Nilo Ocidental. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária, Editores. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2014. p. 1250-61.

44. Fecchio A. Prevalência, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (*Haemoproteus* e *Plasmodium*) em aves do Cerrado do Brasil; Central. [Tese]. Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília; 2011.

45. Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. Mol. Ecol. 2002;11: 1545-54.

46. Garnham PCC. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: Blackwell; 1966.

47. Ricklefs RE, Fallon, SM, Bermingham E. Evolutionary Relationships, Cospeciation, and Host Switching in Avian Malaria Parasites. Syst Biol. 2004;53(1):111-9.

48. The Merck Veterinary Manual. MERCKS&CO.2010. p. 2384-9.

49. Williams RB. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. Avian Pathol. 2005;34(1):29-47.

50. Levin II, Zwiers P, Deem S, Geest EA, Higashiguchi JM, Iezhova TA, *et al*. Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and evidence for arrival via migratory birds. Cons Biol. 2013;27:1366-77.

51. Carlson JS, Nelms, Barker CM, Reisen WK, Sehgal RNM, Cornel AJ. Avian malaria co-infections confound infectivity and vector competence assays of *Plasmodium homopolare*. Parasitology Research. 2018; 117:2385–94.

52. Valkiūnas G, Bensch S, Iezhova TA, Krizanauskiené A, Hellgren O, Bolshakov CV. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. J Parasitol. 2006;92(2):418-22.

53. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A new pcr assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium* and *Haemoproteus* from avian blood. J Parasitol. 2004;90(4):797-802.

54. Marzal A, De Lope F, Navarro C, Møller AP. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. Oecologia. 2005;142(4):541-5.

55. Clark NJ, Clegg SM, Lima MR. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. Int J Parasitol. 2014;44(5):329-38.

56. Sá MR. Os estudos em malaria aviária e o Brasil no contexto científico internacional (1907-1945). Hist Cienc Saúde Manguinhos. 2011;18(2):499-518.

57. Cranfield MR, Graczyk TK, Beall FB, Ialeggio DM, Shaw ML, Skjoldager ML. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and

induction of parasite recrudescence. J Wildl Dis. 1994;30(3):372-6.

58. Palinauskas V, Žiegyté R, Ilgunas M, Iezhova TA, Bernotiene R, Bolshakov C, *et al*. Description of the first cryptic avian malaria parasite, *Plasmodium homocircumflexum* n. sp., with experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes. Int J Parasitol. 2014;45:51–62.

59. Huchzermeyer FW, Van der Vyver FH. Isolation of *Plasmodium circumflexum* from wild guineafowl (*Numida meleagris*) and the experimental infection in domestic poultry. Avian Pathol. 1991; 20:213–23.

60. Valkiūnas G, Iezhova TA. Keys to the avian malaria parasites. Malar J. 2018; 17:212.

61. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al*. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25:3389–402.

62. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997;25(24):4876-82.

63. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 2001;17(8):754-5

64. Rambaut A. FigTree v.1v4v3v [cited 2016 Ago 10] Disponível em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/.

65. Shimmel LA, White J, Snell K. The what, why, when and how of avian blood transfusions: a discussion of protocols and literature review. J Wildlife Rehab. 1996; 19:7–14.

66. Ilgūnas M, Bukauskaitė D, Palinauskas V, Iezhova TA, Dinhop N, Nedorost N, *et al*. Mortality and pathology in birds due to *Plasmodium* (*Giovannolaia*) *homocircumflexum* infection, with emphasis on the exoerythrocytic development of avian malaria parasites. Malar J. 2016; 15:256.

67. Elisei CO. Criopreservação e caracterização morfológica, morfométricas e ultra-estrutural *Plasmodium* (*Novyella*) *juxtanucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae). [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2001.

68. Souza PCA. Malária aviária: parasitismo por *Plasmodium juxtanucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos Clínicos e patológicos de sua infecção experimental. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro; 1998.

69. Santos-Prezoto HH, D'Agosto M, Daemon M. Prevalência e variações dos estádios eritrocíticos de *Plasmodium juxtanucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. Parasitol Lat AM. 2004; 59:14-20.

70. Krettli AU. *Plasmodium juxtanucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. Rev Inst Med Trop São Paulo.1972;14(4):235-45.

71. Vashist U. Aspectos biológicos da inoculação experimental e atividade malaricida da 4-(6-Mercaptopurina)-7-Cloroquinolina em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados *Plasmodium* (*Novyella*) *juxtanucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae). [Dissertação]. Minas Gerais: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora; 2007.

72. Silveira P, Belo NO, Lacorte GA, Kolesnikovas CK, Vanstreels RE, Steindel M, *et al*. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South American penguins. Parasitol Int. 2013;62(2):165-71.

73. Elisei CO. Morfologia, morfometria, biologia molecular, filogenia de *Plasmodium juxtanucleare* e uma nova proposta filogenética dos Gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Hepatocystis*. [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005.

74. Beadell JS, Gering E, Austin J, Dumbacher JP, Peirce MA, Pratt TK, *et al*. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Austral-Papuan region. Mol Ecol. 2004;13:3829–44.

75. Fecchio A, Lima MR, Silveira P, Braga EM, Marini MA. High prevalence of blood parasites in social birds from neotropical savanna in Brazil. EMU. 2011;111:132-8.

76. Ferreira Junior FC, Rodrigues RA, Ellis VA, Leite LO, Borges MAZ, Braga EM. Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributionsin southeastern Brazil. PLoS ONE. 2017; 12(6): e0178791.

77. Sebaio F, Braga EM, Branquinho F, Manica LT, Marini MA. Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds: effects of fragment size and habitat dependency. Bird Conserv Int. 2010; 20:432-9.

78. Lotta IA, Gonzalez AD, Pacheco MA, Escalante AA. Valkiunas G, Moncada LI, *et al*. *Leucocytozoon pterotenuis* sp. nov. (Haemosporida, Leucocytozoidae): description of the morphologically unique species from the Grallariidae birds, with remarks on the distribution of *Leucocytozoon* parasites in the neotropics. Parasitol. Res. 2015;114:1031-44.

79. Cueto VR, Bravo SP, Gorosito CA, Presti P, Amico GC. The Ecology of Patagonia's migratory birds. AFO Afield. 2016;20:1-2.

80. Pulgarín-R PC, Gómez C, Bayly NJ, Bensch S, FitzGerald AM, Starkloff N, *et al*. Migratory birds as vehicles for parasite dispersal? Infection by avian haemosporidians over the year and throughout the range of a long-distance migrant. J Biogeogr. 2019; 46:83–96.

81. Fecchio A, Pinheiro R, Felix G, Faria IP, Pinho JB, Lacorte GA, *et al*. Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. Ecography. 2017;41:505–15.

82. Vanstreels RE, da Silva-Filho RP, Kolesnikovas CK, Bhering RC, Ruoppolo V, Epiphanio S, *et al*. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil. Vet Res. 2015; 46:30.

83. Lacorte GA, Felix GM, Pinheiro RR, Chaves AV, Almeida-Neto G, Neves FS, *et al*.

Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites: a molecular survey from Southeast Brazil. PLoS One. 2013;8(3): e57770.

84. Merino S, Moreno J, Vásquez R, Martínez J, Sánchez-Monsalvez I, Estádes C, *et al*. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. Austral Ecol. 2008;33:329–40.

85. Inumaru M, Murata K, Sato Y. Prevalence of avian haemosporidia among injured wild birds in Tokyo and environs, Japan. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2017;6(3):299-309.

86. Loiseau C, Melo M, Lobato E, Beadell JS, Fleischer RC, Reis S, *et al*. Insularity effects on the assemblage of the blood parasite community of the birds from the Gulf of Guinea. J Biogeogr. 2017;44(11):2607-17.

87. Galen SC, Witt CC. Diverse avian malaria and other haemosporidian parasites in Andean house wrens: evidence for regional co-diversifi cation by host-switching. J Avian Biol. 2014; 45:374–86.

88. Ricklefs RE, Fallon, SM. Diversification and host switching in avian malaria parasites. Proc Biol Sci. 2002; 269(1494):885-92.

89. Yabsley MJ, Vanstreels RET, Martinsen ES, Wickson AG, Holland AE, Hernandez SM, *et al*. Parasitaemia data and molecular characterization of *Haemoproteus catharti* from New World vultures (Cathartidae) reveals a novel clade of Haemosporida. Malar J. 2018; 17:12.

90. Villar Couto CM, Cumming GS, Lacorte GA, Congrains C, Izbicki R, Braga EM *et al*. Avian haemosporidians in the cattle egret (Bubulcus ibis) from central-western and southern Africa: High diversity and prevalence. PLoS ONE. 2019;14(2):e0212425.

APÊNDICE A – Distribuição das linhagens de acordo com o local de estudo

Local	Hospedeiro	ID Amostra	Parasita	Linhagem#	Acesso GENBANK	Padrão de movimento*	*Status**
Curucutu, SP	**PASSERIFORMES**						
	Conopophagidae						
	Conopophaga lineata	PESM122	*Plasmodium sp.*	LEAMA01	JX021454	não migratória	LC
	Furnariidae						
	Lochmias nematura	PESM58	*Plasmodium sp.*	**99% AMMAUR01/CINRUF01**		não migratória	LC
	Parulidae						
	Basileuterus culicivorus	PESM144	*Plasmodium sp.*	**99% NYCNYC01**		não migratória	LC
	Thamnophilidae						
	Dysithamnus mentalis	PESM40	*Plasmodium sp.*	PYLEU01	JX021484	não migratória	LC
	Tyrannidae						
	Elaenia albiceps chilensis	PESM108	*Plasmodium cathemerium*	PADOM09	AF069611	migratória	LC
	Elaenia albiceps chilensis	PESM138	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	MYISWA01	KU562174	migratória	LC
	Elaenia albiceps chilensis	PESM160	*Leucocytozoon sp.*	**98% GRAQUI02**		migratória	LC
	Elaenia albiceps chilensis	PESM55	*Plasmodium sp.*	**99% DENVID01**		migratória	LC
	Elaenia albiceps chilensis	PESM57	*Leucocytozoon sp.*	Mista	--	migratória	LC
	Elaenia mesoleuca	PESM10	*Plasmodium sp.*	TRMEL02	JX021468	migratória	LC
	Vireonidae						
	Vireo chivi	PESM36	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) vireonis*	VIGIL09	MF817757	migratória	LC
Esquel, ARG	**PASSERIFORMES**						
	Fringillidae						
	Spinus barbatus	PAT0475	*Leucocytozoon sp.*	**99% TROAED02**		migratória	LC
	Furnariidae						
	Asthenes pyrrholeuca	PAT0472	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	**96% CATAUR01/MYCAME08**		migratória	LC
	Thraupidae						
	Phrygilus patagonicus	PAT0479	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	**99% TROAED14**		migratória	LC
	Turdidae						
	Turdus falcklandii	PAT0481	*Leucocytozoon sp.*	**99% TURPEL02**		migratória	LC

Local	Hospedeiro	ID Amostra	Parasita	Linhagem#	Acesso GENBANK	Padrão de movimento*	*Status**
Esquel, ARG	**Turdidae**						
	Turdus falcklandii	PAT0482	*Leucocytozoon sp.*	**99% TURNAU01**		migratória	LC
	Turdus falcklandii	PAT0483	*Leucocytozoon sp.*	**99% TURNAU01**		migratória	LC
	Tyrannidae						
	Elaenia albiceps chilensis	PAT0491	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	MYISWA01	KU562174	migratória	LC
Michelin, BA	**APODIFORMES**						
	Trochilidae						
	Phaethornis pretrei	ZOO001	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	EUMIN01	KC121053	não migratória	LC
	Eupetomena macroura	ZOO012	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	**EUPMAC03 (99% TROAED18)**		não migratória	LC
	Glaucis hirsutus	ZOO017	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	**EUPMAC03 (99% TROAED18)**		não migratória	LC
	PASSERIFORMES						
	Passerellidae						
	Arremon taciturnus	ZOO041	*Plasmodium sp.*	**ARRTAC06 (99% LEPCOR05)**		não migratória	LC
	Thamnophilidae						
	Thamnomanes caesius	ZOO030	*Plasmodium sp.*	CYCYA01	DQ241529	não migratória	LC
	Thraupidae						
	Tangara sayaca	ZOO010	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	**THRSAY01 (99% PACPEC02)**		migratória	LC
	PASSERIFORMES						
	Turdidae						
	Turdus leucomelas	ZOO003	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	EUMIN01	KC121053	não migratória	LC
	Turdus leucomelas	ZOO013	*Plasmodium nucleophilum*	DENPET03	AY640137	não migratória	LC
	Turdus leucomelas	ZOO014	*Plasmodium sp.*	MASTR01	JX029876	não migratória	LC
	Turdus leucomelas	ZOO039	*Plasmodium sp.*	TULEU06	JX029878	não migratória	LC
	Tyrannidae						
	Myiarchus ferox	ZOO033	*Plasmodium sp.*	CYCYA01	DQ241529	não migratória	LC
Milagres, BA	**PASSERIFORMES**						
	Passerellidae						
	Zonotrichia capensis	MILA13	*H. (Parahaemoproteus) erythrogravidus*	ZOCAP01	EF153649	migratória	LC
	Polioptilidae						
	Polioptila plumbea	MILA01	*Plasmodium cathemerium*	PADOM09	AF069611	não migratória	LC
	Tityridae						
	Pachyramphus viridis	MILA39	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	**99% PAPOL03**		não migratória	LC

Local	Hospedeiro	ID Amostra	Parasita	Linhagem#	Acesso GENBANK	Padrão de movimento*	Status*
	COLUMBIFORMES						
	Columbidae						
	Leptotila verreauxi	PNSHL74	*Haemoproteus (Haemoproteus) sp.*	**99% LEPRUF02**		não migratória	LC
	PASSERIFORMES						
	Cardinalidae						
	Habia rubica	PNSHL29	*Plasmodium cathemerium*	TACRUB04	KU562739	não migratória	LC
	Habia rubica	PNSHL34	*Plasmodium cathemerium*	TACRUB04	KU562739	não migratória	LC
	Habia rubica	PNSHL35	*Plasmodium cathemerium*	TACRUB04	KU562739	não migratória	LC
	Parulidae						
	Basileuterus culicivorus	PNSHL70	*Plasmodium cathemerium*	PADOM09	AF069611	não migratória	LC
	Basileuterus culicivorus	PNSHL72	*Plasmodium lutzi*	RAMCAR01	KF482346	não migratória	LC
	Pipridae						
PARNA Saint Hilaire-Lange	*Chiroxiphia caudata*	PNSHL60	*Plasmodium sp.*	ANGAL01	JX029873	não migratória	LC
	Thraupidae						
	Trichothraupis melanops	PNSHL19	*Plasmodium cathemerium*	PADOM09	AF069611	não migratória	LC
	Tachyphonus coronatus	PNSHL45	*Plasmodium juxtanucleare*	PADOM11	HM146899	não migratória	LC
	Tachyphonus coronatus	PNSHL51	*Plasmodium lutzi*	RAMCAR01	KF482346	não migratória	LC
	Tachyphonus coronatus	PNSHL58	*Plasmodium juxtanucleare*	PADOM11	HM146899	não migratória	LC
	Tityridae						
	Schiffornis virescens	PNSHL78	*Plasmodium juxtanucleare*	PADOM11	HM146899	não migratória	LC
	Turdidae						
	Turdus albicollis	PNSHL04	*Plasmodium lutzi*	TURALB01	KU562808	não migratória	LC
	Turdus albicollis	PNSHL06	*Plasmodium unalis*	**99% HYLMUS01**		não migratória	LC
	Turdus albicollis	PNSHL10	*Plasmodium lutzi*	TURALB01	KU562808	não migratória	LC
	Turdus albicollis	PNSHL44	*Plasmodium unalis*	**99% HYLMUS01**		não migratória	LC
	Turdus albicollis	PNSHL46	*Plasmodium unalis*	**99% HYLMUS01**		não migratória	LC
	PICIFORMES						
	Ramphastidae						
	Ramphastos dicolorus	PNSHL07	*Plasmodium nucleophilum*	DENPET03	AY640137	migratória	LC

Local	Hospedeiro	ID Amostra	Parasita	Linhagem#	Acesso GENBANK	Padrão de movimento*	*Status**
	Formicariidae						
	Chamaeza campanisona	PUCRS_6012	*Plasmodium sp.*	**CHACAM03**	MK695483	não migratória	LC
	Passerellidae						
	Zonotrichia capensis	PUCRS_5967	*Plasmodium cathemerium*	PADOM09	MK695270	migratória	LC
	Zonotrichia capensis	PUCRS_5977	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) erythrogravidus*	ZOCAP01	MK695346	migratória	LC
	Thraupidae						
	Tangara cyanoptera	PUCRS_5958	*Plasmodium sp.*	PHPAT01	MK695371	não migratória	NT
	Turdidae						
	Turdus albicollis	PUCRS_6036	*Plasmodium unalis*	**TURALB05**	MK695484	não migratória	LC
	Turdus amaurochalinus	PUCRS_5951	*Plasmodium unalis*	TUMIG03	MK695324	migratória	LC
	Turdus flavipes	PUCRS_5930	*Plasmodium unalis*	TUMIG03	MK695325	migratória	LC
	Turdus flavipes	PUCRS_5954	*Plasmodium sp.*	TURALB01	MK695330	migratória	LC
	Turdus flavipes	PUCRS_5992	*Plasmodium unalis*	**TURFAL06**	MK695482	migratória	LC
	Turdus flavipes	PUCRS_6062	*Plasmodium unalis*	TUMIG03	MK695326	migratória	LC
	Turdus flavipes	H120170	*Plasmodium sp.*	TURALB01	MK695329	migratória	LC
	Turdus rufiventris	PUCRS_5972	*Plasmodium unalis*	TURUF03	MK695406	não migratória	LC
Pro Mata, RS	*Turdus rufiventris*	PUCRS_6000	*Plasmodium sp.*	TURALB01	MK695331	não migratória	LC
	Turdus rufiventris	PUCRS_6035	*Plasmodium unalis*	TURUF03	MK695407	não migratória	LC
	Turdus rufiventris	PUCRS_6070	*Plasmodium sp.*	TURALB01	MK695332	não migratória	LC
	Turdus subalaris	PUCRS_6067	*Plasmodium unalis*	TUMIG03	MK695327	não migratória	LC
	Tyrannidae						
	Myiarchus swainsoni	PUCRS_5933	*Plasmodium nucleophilum*	DENPET03	MK695230	migratória	LC
	Elaenia mesoleuca	PUCRS_6028	*Plasmodium cathemerium*	PADOM09	MK695269	migratória	LC
	Vireonidae						
	Vireo olivaceus	PUCRS_5923	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) sp.*	VIGIL09	MK695341	migratória	LC
	Vireo olivaceus	PUCRS_5960	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) vireonis*	VIOLI06	MK695232	migratória	LC
	Vireo olivaceus	PUCRS_5987	*Plasmodium sp.*	ARRTAC01	MK695215	migratória	LC
	Vireo olivaceus	PUCRS_6056	*Haemoproteus (Parahaemoproteus) vireonis*	VIOLI05	MK695485	migratória	LC

# Novas linhagens descritas nesse estudo estão em **negrito**. Os números de acesso GenBank do RS são de Fecchio et al., 2019 (Apêndice B), os demais são das descrições originais das linhagens. *Status* de ameaça e padrão de movimento de acordo com a IUCN (https://www.iucnredlist.org/).
LC = Pouco preocupante; NT = quase ameaçado.

APÊNDICE B - Artigo Publicado no Molecular Ecology

Received: 29 January 2019 | Revised: 27 March 2019 | Accepted: 28 March 2019
DOI: 10.1111/mec.15094

ORIGINAL ARTICLE

MOLECULAR ECOLOGY WILEY

Avian host composition, local speciation and dispersal drive the regional assembly of avian malaria parasites in South American birds

Alan Fecchio[1] | Jeffrey A. Bell[2] | Rafael B.P. Pinheiro[3] | Victor R. Cueto[4] | Cristian A. Gorosito[4] | Holly L. Lutz[5,6] | Milene G. Gaiotti[7] | Luciana V. Paiva[8] | Leonardo F. França[8] | Guilherme Toledo-Lima[9] | Mariana Tolentino[10] | João B. Pinho[11] | Vasyl V. Tkach[2] | Carla S. Fontana[12] | Juan Manuel Grande[13] | Miguel A. Santillán[14] | Renato Caparroz[15] | Andrei L. Roos[16,17] | Rafael Bessa[18] | Wagner Nogueira[19] | Thiago Moura[20] | Erica C. Nolasco[20] | Kiba J.M. Comiche[21] | Karin Kirchgatter[21] | Lilian O. Guimarães[21] | Janice H. Dispoto[22] | Miguel Â. Marini[23] | Jason D. Weckstein[22,24] | Henrique Batalha-Filho[1] | Michael D. Collins[25]

[1]Laboratório de Evolução e Biogeografia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil
[2]Department of Biology, University of North Dakota, Grand Forks, North Dakota
[3]Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
[4]Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), CONICET – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel, Chubut, Argentina
[5]Department of Surgery, University of Chicago, Chicago, Illinios
[6]Integrative Research Center, Field Museum of Natural History, Chicago, Illinios
[7]Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil
[8]Laboratório de Ecologia de Populações Animais, Departamento de Biociências, Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, Brazil
[9]Laboratório de Ornitologia, Departamento de Botânica e Zoologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil
[10]Laboratório de Evolução e Comportamento Animal, Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil
[11]Laboratório de Ecologia de Aves, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil
[12]Laboratório de Ornitologia, Museu de Ciências e Tecnologia e Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, PUCRS, Porto Alegre, Brazil
[13]Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, Argentina
[14]División Zoología, Museo de Historia Natural de la Provincia de La Pampa, Santa Rosa, Argentina
[15]Laboratório de Genética e Biodiversidade, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasilia, Brasília, Brazil
[16]Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Florianópolis, Brazil
[17]Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil
[18]Sustentar Meio Ambiente LTDA ME, Betim, Brazil
[19]Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, Universidade Federal de Viçosa, Florestal, Brazil
[20]Departamento de Zoologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brazil
[21]Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brazil
[22]Department of Ornithology, Academy of Natural Sciences of Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania
[23]Departamento de Zoologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil
[24]Department of Biodiversity, Earth, and Environmental Science, Drexel University, Philadelphia, Pennsylvania
[25]Department of Biology, Rhodes College, Memphis, Tennessee

 © 2019 John Wiley & Sons Ltd

Correspondence
Alan Fecchio, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil.
Email: alanfecchio@gmail.com

Funding information
Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio); Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade (Sisbiota); Pantanal Research Center (CPP)/Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU); Geographical Genetics and Regional Planning for Natural Resources in Brazilian Cerrado (GENPAC) ; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); US National Science Foundation, Grant/Award Number: DEB-1503804 to JDW and DEB-1120734 to VVT; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Abstract

Identifying the ecological factors that shape parasite distributions remains a central goal in disease ecology. These factors include dispersal capability, environmental filters and geographic distance. Using 520 haemosporidian parasite genetic lineages recovered from 7,534 birds sampled across tropical and temperate South America, we tested (a) the latitudinal diversity gradient hypothesis and (b) the distance–decay relationship (decreasing proportion of shared species between communities with increasing geographic distance) for this host–parasite system. We then inferred the biogeographic processes influencing the diversity and distributions of this cosmopolitan group of parasites across South America. We found support for a latitudinal gradient in diversity for avian haemosporidian parasites, potentially mediated through higher avian host diversity towards the equator. Parasite similarity was correlated with climate similarity, geographic distance and host composition. Local diversification in Amazonian lineages followed by dispersal was the most frequent biogeographic events reconstructed for haemosporidian parasites. Combining macroecological patterns and biogeographic processes, our study reveals that haemosporidian parasites are capable of circumventing geographic barriers and dispersing across biomes, although constrained by environmental filtering. The contemporary diversity and distributions of haemosporidian parasites are mainly driven by historical (speciation) and ecological (dispersal) processes, whereas the parasite community assembly is largely governed by host composition and to a lesser extent by environmental conditions.

KEYWORDS
community assembly, disease ecology, latitudinal diversity gradient, macroecology, parasite biogeography, parasite dispersal

1 | INTRODUCTION

A pervasive feature in host–parasite associations is that host diversity drives parasite diversity (Kamiya, O'Dwyer, Nakagawa, & Poulin, 2014a). Evolutionary processes, such as shifting of parasite lineages across host species, as well as recent ecological regional processes, such as parasite dispersal, are postulated to play a critical role in governing parasite community assembly (Ricklefs, 2010; Ricklefs et al., 2014; Clark et al., 2018). While many parasites have evolved to become specialists (Poulin, 2007), multihost parasites must circumvent ecological and evolutionary barriers to infect unrelated host species, challenging ecologists and epidemiologists to predict when and where a host species is most susceptible to disease. Thus, by identifying the relative contributions of host and parasite phylogenies to regional community assembly across multiple regions, one can gain a better understanding of parasite host-switching patterns and the geographical basis for parasite diversity.

A parasite's host range can be explained as a function of the number of susceptible hosts in a given community, which in turn may be determined by historical biogeographic factors of the host clade. For example, tropical regions harbour higher bird species diversity in comparison with temperate regions (Duchêne & Cardillo, 2015), and thus, avian parasites from tropical regions will have a higher diversity of potential hosts to colonize. Furthermore, the greater diversity of host species in the tropics could lead to increased parasite diversity within host species through parasite lineage sharing and host shifting (Ricklefs et al., 2014; Clark, 2018). Parasite distributions can also be explained by the ecological fitting principle, which posits that a shared evolutionary history with a new host species is necessary for the successful invasion of parasites into new host taxa (Brooks et al., 2006). Thus, the likelihood that a parasite can successfully infect a new host species decreases continuously with increasing phylogenetic distance between its original host and potential new hosts (Davies & Pedersen, 2008; De Vienne, Hood, & Giraud, 2009; Ricklefs, 2010; Poulin, Krasnov, & Mouillot, 2011; Clark & Clegg, 2017).

Assemblage similarity is expected to decrease with increasing geographic distance (Nekola & White, 1999; Soininen, McDonald, & Hillebrand, 2007). The patterns of distance decay of parasite assemblage similarity could be caused by two mechanisms: one related to environmental differences (e.g., gradients in temperature and precipitation) and the other related to the dispersal capability of parasites (Nekola & White, 1999). Several studies, including a

APÊNDICE C – Artigo submetido ao Journal of Animal Ecology

Journal of Animal Ecology

An inverse latitudinal gradient in infection probability and phylogenetic diversity for *Leucocytozoon* blood parasites in New World birds

Journal:	*Journal of Animal Ecology*
Manuscript ID	JAE-2019-00541
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	08-Jul-2019
Complete List of Authors:	Fecchio, Alan; Universidade Federal de Mato Grosso Bell, Jeffrey; University of North Dakota Bosholn, Mariane; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazõnia, Ecologia Vaughan, Jefferson; University of North Dakota Tkach, Vasyl; University of North Dakota Grand Forks Lutz, Holly; Field Museum of Natural History Cueto, Victor; CONICET Esquel Gorosito, Cristian; Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica González-Acuña, Daniel; Universidad de Concepción Stromlund, Chad; University of North Dakota Kvasager, Danielle; University of North Dakota Comiche, Kiba; USP Kirchgatter, Karin; USP Pinho, João ; Universidade Federal de Mato Grosso Berv, Jacob; Cornell University College of Agriculture and Life Sciences, Anciaes, Marina; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia Fontana, Carla; PUCRS Zyskowski, Kristof; Yale University Sampaio, Sidnei; UFBA Dispoto, Janice; Academy of Natural Sciences of Drexel University Galen, Spencer; Sackler Institute for Comparative Genomics Weckstein, Jason; Academy of Natural Sciences of Drexel University Clark, Nicholas; University of Queensland, ; Queensland Museum, Natural Environments
Key-words:	community assembly, latitudinal diversity gradient, macroecology, NDVI, parasite distribution, parasite diversity, phylogenetic diversity

SCHOLARONE™
Manuscripts

An inverse latitudinal gradient in infection probability and phylogenetic diversity for *Leucocytozoon* blood parasites in New World birds

Alan Fecchio[1], Jeffrey A. Bell[2], Mariane Bosholn[3], Jefferson A. Vaughan[2], Vasyl V. Tkach[2], Holly L. Lutz[4], Victor R. Cueto[5], Cristian A. Gorosito[5], Daniel González-Acuña[6], Chad Stromlund[2], Danielle Kvasager[2], Kiba J. M. Comiche[7], Karin Kirchgatter[7], João B. Pinho[8], Jacob Berv[9], Marina Anciães[3], Carla S. Fontana[10], Kristof Zyskowski[11], Sidnei Sampaio[12], Janice H. Dispoto[13], Spencer C. Galen[13], Jason D. Weckstein[13,14], Nicholas J. Clark [15]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT 78060900, Brazil

[2] Department of Biology, University of North Dakota, Grand Forks, ND 58201, USA

[3] Laboratório de Biologia Evolutiva e Comportamento Animal, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brazil.

[4] Department of Surgery, University of Chicago, 5812 S. Ellis Ave., Chicago, IL 60637 and Integrative Research Center, Field Museum of Natural History, 1400 S. Lake Shore Drive, Chicago, IL 60605, USA

[5] Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), CONICET – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel, Chubut, Argentina

[6] Laboratorio de Parásitos y Enfermedades de Fauna Silvestre, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Avenida Vicente Méndez 595, Chillán, Chile

[7] Núcleo de Estudos em Malária, Superintendência de Controle de Endemias, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Brazil

[8] Laboratório de Ecologia de Aves, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT 78060900, Brazil

[9] Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, 215 Tower Road, Ithaca, NY, 14853, USA

[10] Laboratório de Ornitologia, Museu de Ciências e Tecnologia e Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

[11]Peabody Museum of Natural History, Yale University, 170 Whitney Avenue, New Haven, CT 06520, USA

[12] Laboratório de Evolução e Biogeografia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA 40170115, Brazil

[13]Department of Ornithology, Academy of Natural Sciences of Drexel University, Philadelphia, PA 19103, USA

[14]Department of Biodiversity, Earth, and Environmental Science, Drexel University, Philadelphia, PA 19103, USA

[15]School of Veterinary Science, University of Queensland, Gatton, Queensland, Australia

Correspondence author:

Alan Fecchio

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso,

Avenida Fernando Corrêa da Costa 2367, Cuiabá, MT, 78060900, Brazil

E-mail: alanfecchio@gmail.com

Abstract

1. Geographic variation in environmental conditions as well as host traits that promote parasite transmission may impact infection rates and community assembly of vector transmitted parasites.

2. Identifying the ecological, environmental, and historical determinants of parasite distributions and diversity is therefore necessary to understand disease outbreaks under changing environments. Here, we identified the predictors and contributions of infection probability and phylogenetic diversity of *Leucocytozoon* (an avian blood parasite) at site and species levels across the New World.

3. To explore spatial patterns in infection probability and lineage diversity for *Leucocytozoon* parasites, we surveyed 69 bird communities from Alaska to Patagonia. Using phylogenetic Bayesian hierarchical models and high-resolution satellite remote sensing data we determined the relative influence of climate, landscape, geography, and host phylogeny on regional parasite community assembly.

4. Infection rates and parasite diversity exhibited considerable variation across regions in the Americas. In opposition to the latitudinal gradient hypothesis, both the diversity and prevalence of *Leucocytozoon* parasites decreased toward the equator. Host relatedness and traits known to promote vector exposure neither predicted infection probability nor parasite diversity. Instead, the probability of a bird being infected with *Leucocytozoon* increased with increasing vegetation cover (NDVI) and moisture levels (NDWI), whereas the diversity of parasite lineages decreased with increasing NDVI. Infection rates and parasite diversity also tended to be higher in cooler regions and higher latitudes.

5. Whereas low temperature partially constrains *Leucocytozoon* diversity and infection rates, landscape features, such as vegetation cover and water body availability, play a significant role

in modulating the probability of a bird being infected. This suggests that, for *Leucocytozoon*, the barriers to host shifting and parasite host range expansion are jointly determined by environmental filtering and landscape, but not by host phylogeny. Our results show that integrating host traits, host ancestry, bioclimatic data, and microhabitat characteristics that are important for vector reproduction are imperative to understand and predict infection prevalence and diversity of vector-transmitted parasites. Unlike other vector-transmitted diseases, our results show that *Leucocytozoon* diversity and prevalence will likely decrease with warming temperatures.

Key-words: community assembly, latitudinal diversity gradient, macroecology, NDVI, parasite distribution, parasite diversity, phylogenetic diversity

ANEXO A – Autorização para atividade com Finalidade Científica SISBIO no. 57641-3

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57641-3	Data da Emissão: 04/10/2018 09:10:13	Data da Revalidação*: 04/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	revisão literatura	03/2017	05/2017
2	análise dos dados, redação dissertação	11/2018	04/2019
3	defesa, redação artigo científico	05/2019	07/2019
4	infecções, coleta de amostras, biologia molecular	11/2017	04/2019
5	infecções experimentais, biologia molecular	05/2018	11/2018

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Carolina Romeiro Fernandes Chagas	análises esfregaços sanguíneos	324.700.598-60	Brasileira
2	MARGARETH DE LARA CAPURRO GUIMARAES	coordenação das infecções experimentais em pintinhos	007.960.958-92	Brasileira
3	Adriano Pinter dos Santos	coordenação das infecções experimentais em canários	251.773.428-32	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
2	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
3	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
5	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
6	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0576410320181004

Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 57641-3	Data da Emissão: 04/10/2018 09:10:13	Data da Revalidação*: 04/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

SISBIO

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

Observações e ressalvas

7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	São Paulo-SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aves	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Superintendência de Controle de Endemias	Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0576410320181004

ANEXO B - Autorização CEUA do IMT Protocolo 352A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 09 de Maio de 2017

Ilmo(a)
Dr(a). Karin Kirchgatter
(aos cuidados de Kiba Jamila Miguel Comiche)

Certificamos que a proposta intitulada **"Desenvolvimento eritrocítico de parasitas da malária aviária através de infecção experimental visando identificação e classificação de novas espécies"**, registrada com o nº **000352A**, sob a responsabilidade de **Karin Kirchgatter** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 01/02/2017 a 31/01/2019							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	**Linhagem**	**Idade**	**Peso**	**Material**	**Quantidade**		
					M	**F**	**M+F**
Ave	Serinus canaria	entre 6 meses e dois anos	20 g	*a ser Coletado*	0	30	30
Ave	Gallus gallus domesticus	2 dias	10g	*a ser Coletado*	960	0	960
Origem: Aviário - aviário comercial					**TOTAL**		990

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

ANEXO C - Autorização CEUA do ICB Protocolo 29/2017

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Desenvolvimento eritrocítico de parasitas da malária aviária através de infecção experimental visando identificação e classificação de novas espécies***", registrado sob o protocolo nº ***29/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***10/04/2017*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Margareth de Lara Capurro-Guimarães***
- Departamento: *Parasitologia*
- Membros da Equipe: *Karin Kirchgatter (Pesquisador colaborador), Carolina Chagas (Pesquisador colaborador), Kiba Jamila (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Erythrocytic development of avian malaria parasites through experimental infection aiming to identify and classify new species***", protocol nº ***29/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***4/10/2017*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Margareth de Lara Capurro-Guimarães***
- Team members: *Margareth Capurro (Colaborator Researcher), Carolina Chagas (Colaborator Researcher), Kiba Jamila (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Gallus gallus domesticus	*Gallus gallus domesticus*	*Macho/male*	*2 dias/days*	*960*

São Paulo, 18 de abril de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

ANEXO D - Autorização para atividade com Finalidade Científica Argentina

Provincia del Chubut
República Argentina
MINISTERIO DE LA PRODUCCION
DIRECCIÓN DE FAUNA Y FLORA SILVESTRE

RAWSON, 30 OCT 2018

VISTO:

El Expediente N° 3261/16- MP; la Ley N° XI N° 10, Decreto Reglamentario N° 868/90, y Disposición N° 48/08 DFyFS - SSRN-MIA y G; y

CONSIDERANDO:

Que por el Expediente citado en el Visto tramita la autorización de renovación al Director del Proyecto de Investigación denominado: **"Determinantes de la dinámica poblacional de las aves del Bosque Andino - Patagónico",** Dr. Víctor Cueto y a las personas que figuran en el Anexo I de la presente Disposición a realizar tareas de investigación, por el período de un (1) año, a partir del 01 de octubre de 2018 al 30 de septiembre de 2019;

Que el Artículo 25° inc. c) de la Ley Provincial N° XI N° 10 establece que entre las funciones de la autoridad de aplicación (Dirección de Fauna y Flora Silvestre) se encuentran la de armonizar la protección y conservación de la fauna silvestre, con el uso y aprovechamiento de los recursos naturales;

27

Que el Decreto Reglamentario N° 868/90 establece en los Artículos 29°, 30° y 31° las pautas para llevar adelante los estudios o trabajos de investigación en el ámbito de la Provincia;

Que la Disposición N° 48/08 de la Dirección de Fauna y Flora Silvestre establece los requisitos y obligaciones a cumplir por parte de los investigadores dentro del ámbito de la provincia del Chubut;

Que el solicitante ha cumplimentado los requisitos dispuestos en el Artículo 3° de la Disposición 48/08 DFyFS – SSRN – MIAG;

Que corresponde exceptuar el presente trámite del criterio de irretroactividad, dispuesto por el Artículo 32° de la Ley I N° 18, por aplicación del Punto 3) de la misma norma legal;

Que la Dirección General de Asuntos Legales del Ministerio de la Producción ha tomado intervención en el presente trámite;

POR ELLO:

EL DIRECTOR DE FAUNA Y FLORA SILVESTRE

D I S P O N E:

Artículo 1°: Otorgar eficacia retroactiva, al acto conforme lo previsto en el Artículo 32° de la Ley I N° 18, por aplicación del Punto 3) de la misma norma legal.-

Artículo 2°: Renovar la Autorización al Director del Proyecto de Investigación denominado **"Determinantes de la dinámica poblacional de las aves del Bosque Andino - Patagónico",** Dr. Víctor Cueto, y a su equipo de trabajo que figura en el Anexo I de la presente Disposición, a realizar tareas de investigación, a partir del 01/10/2018 al 30/09/2019 inclusive.-

//..

Dr. OSPERO GONZALEZ
ABOGADO
Dirección General de Asuntos Legales
Ministerio de la Producción

Med. Vet. Fernando BERGANO
Director de Fauna y Flora Silvestre
Subsecretaría de Ganadería
Ministerio de la Producción

Provincia del Chubut
República Argentina
MINISTERIO DE LA PRODUCCION
DIRECCIÓN DE FAUNA Y FLORA SILVESTRE

3.-

Artículo 9°: Las infracciones a la presente Disposición serán sancionadas de acuerdo con lo previsto en la Ley XI N° 10 y su Decreto Reglamentario N° 868/90.-

Artículo10°.- Queda prohibida la utilización comercial del material biológico y/o sus resultados y/o su transferencia a terceros sin expresa autorización de la Dirección de Fauna y Flora Silvestre.-

Artículo 11°.- En caso de que el investigador declare la existencia de un potencial y/o real uso comercial del resultado de la investigación, deberá comunicarlo inmediatamente a la Dirección de Fauna y Flora Silvestre, con el fin de suscribir la documentación correspondiente de conformidad con la normativa vigente. (ATM - Acuerdo de Transferencia de Material Biológico y/o Convenio de Distribución de Beneficios).-

Artículo 12°: Regístrese, comuníquese, notifíquese, dése al Boletín Oficial y cumplido, ARCHÍVESE.-

Dr. PROSPERO GONZÁLEZ
ABOGADO
Director General de Asuntos Legales
Ministerio de la Producción

Med.Vet. Fernando BERSANO
Director de Fauna y Flora Silvestre
Subsecretaría de Ganadería
Ministerio de la Producción

DISPOSICIÓN N°: 27 /2018 – SsG-MP

ANEXO E – Ofício FPZSP

ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria do Meio Ambiente

Ofício n° 66/2017/FPZSP/DTC

São Paulo, 26 de abril de 2017.

Senhora Pesquisadora,

Informamos Vossa Senhoria que o Projeto de Pesquisa para elaboração de tese de Mestrado na SUCEN/IMT/USP, intitulado **"Desenvolvimento eritrocítico de parasitas da malária aviária através de infecção experimental visando identificação e classificação de novas espécies"**, a ser desenvolvido pela aluna **Kiba Jamila Miguel Comiche**, foi analisado e aprovado pelas instâncias técnico-científicas da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, sob o registro de Projeto nº 425.

Aproveitamos a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de elevada estima e distinta consideração.

Prof. Dr. João Batista da Cruz
Diretor Técnico Científico

À Senhora
Profa. Dra. **KARIN KIRCHGATTER**
SUCEN / IMT / USP
Instituto de Medicina Tropical / USP

c/c: Departamento de Pesquisas Aplicadas
Divisão de Ciências Biológicas - Setor de Aves
Divisão de Veterinária
Núcleo de Análises Clínicas
Núcleo de Biologia Molecular e Microbiologia

FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLÓGICO DE SÃO PAULO
Av. Miguel Stéfano, 4241 – CEP: 04301-905 – Caixa Postal 12.918 – CEP: 04010-970
Tel.: (0xx11) 5073-0811 – Fax.: (0xx11) 5058-0564 – 5073-7238
São Paulo – SP – Brasil
http://www.zoologico.sp.gov.br