

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

Rafaela Venançoni Matoso

Caracterização morfológica e molecular de *Haemoproteus paramultipigmentatus* (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) em aves Columbiformes na Mata Atlântica, Brasil

JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS
FEVEREIRO DE 2017

Rafaela Venançonni Matoso

Caracterização morfológica e molecular de *Haemoproteus paramultipigmentatus* (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) em aves Columbiformes na Mata Atlântica, Brasil

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Comportamento e Biologia Animal).

Orientadora: Profa. Dra. Marta Tavares D'Agosto

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

JUIZ DE FORA, MINAS GERAIS
FEVEREIRO DE 2017

Rafaela Venançonni Matoso

Caracterização morfológica e molecular de *Haemoproteus paramultipigmentatus* (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) em aves Columbiformes na Mata Atlântica, Brasil

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Comportamento e Biologia Animal).

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Marta Tavares D'Agosto (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^ª. Dra. Patrícia Silveira
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^ª. Dra. Isabel Martinele
Universidade Federal de Juiz de Fora

*À minha amada filha que me ensinou
o verdadeiro significado de amor e resiliência....*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por minha saúde e força para chegar até aqui e me manter firme no meu propósito.

Aos meus pais **Robson Matoso** e **Vanise Venançoni Matoso**, pela educação, carinho, ajuda e ensinamentos durante a vida.

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

À minha filha **Laura Venançoni Matoso** que é minha maior alegria, amiga, força e incentivo.

À professora Dr.^a **Marta D'Agosto** por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe.

Ao professor Dr. **Roberto Dias**, pela paciência, ensinamentos, incentivo, apoio, contribuições e oportunidade.

Aos parceiros de trabalho do “LabProto” **Alessanda Louzada, Elen Furtado, Fabiola Silva, Felipe Santos, Franciane Cedrola, Jéssica Andrade Vilas Boas, Luísa Oliveira, Paula Nunes Mendes, Priscila Fregulia, Raquel Tostes, Roberto Marchesini, Suyane Bordim, Talys Assumpção, Marcus Senra, Yasmine Moreira**, pela amizade, por estarem comigo nos momentos de tensão, pela contribuição profissional e pessoal, pela paciência, experiências, pelas coletas que deixaram saudades, pelos momentos felizes no laboratório.

À **Franciane Cedrola** por me apresentar ao laboratório, por toda contribuição profissional, pessoal, incentivo e carinho.

À **Luísa Oliveira** por ter compartilhado comigo o seu conhecimento e por ter me ajudado nessa caminhada.

À **Alessanda Louzada** por sua amizade e carinho, pelos momentos felizes, pelos estudos juntas e amizade.

À **Glauber Barino** que apesar do pouco tempo mostrou tanto carinho, incentivo, amizade e disponibilidade para ajudar.

Ao professor Dr. **Érik Daemon**, pela contribuição profissional e organização das coletas.

Aos colegas do “**LAP**”, por toda ajuda nas coletas e momentos difíceis e felizes.

Ao Dr. **Ralph Maturano** pela identificação das aves, por ajudar nas coletas e também no laboratório.

Ao professor **Roberto da Gama, Arthur Andriolo** e todos os professores do Programa de pós graduação em Comportamento e Biologia Animal, pela oportunidade e ensinamentos.

Ao **Osmar e Marlu Ferreira** pela paciência e ajuda com a burocracia exigida.

Ao Dr. **Fausto de Souza Sobrinho** e Dr. **Flávio Benites**, pesquisadores da Embrapa- Gado de Leite, por me darem a primeira oportunidade na área de pesquisa e incentivo nessa jornada.

À **UFJF**, pela oportunidade e concessão da bolsa no primeiro ano de mestrado.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa no segundo ano de mestrado e pelo financiamento do projeto.

À todos os meus amigos e familiares que contribuíram de alguma forma para que meu sonho se tornasse realidade e o trabalho fosse concluído com êxito.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo biológico do parasito <i>Haemoproteus</i> spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	17
Figura 2. Relações evolutivas de linhagens de Haemosporida	19
Figura 3. Análises dos gêneros de Hemosporídeos.....	20
Figura 4. Representantes de <i>Haemoproteus</i> spp. encontradas em aves Columbiformes.....	24
Figura 5. Formas evolutivas de <i>Haemoproteus</i> spp. encontradas em esfregaços sanguíneos de aves Columbiformes em fragmentos de Mata Atlântica.....	35
Figura 6. Formas evolutivas de <i>Haemoproteus paramultipigmentatus</i> encontradas nos esfregaços sanguíneos, de aves Columbiformes capturadas em fragmentos de Mata Atlântica de Minas Gerais.....	36
Figura 7. Árvore representando as relações filogenéticas no interior do gênero <i>Haemoproteus</i>	39
Anexo 1. Gel de agarose 2% mostrando os produtos de amplificação do gene citocromo b de <i>Haemoproteus</i> spp.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localidade, espécies de aves e número de hospedeiros coletados em fragmentos da Mata Atlântica de Minas Gerais.....	28
Tabela 2. Dados comparativos das análises morfométricas dos gametócitos maduros de <i>Haemoproteus paramultipigmentatus</i>	37
Tabela 3. Dados sobre prevalência e parasitemia de espécies de <i>Haemoproteus</i> encontradas em aves Columbiformes.....	46

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1. Haemosporida em aves silvestres.....	13
1.2. <i>Haemoproteus</i> Kruse, 1890.....	14
1.2.1. Histórico e estudos no Brasil.....	14
1.2.2. Ciclo biológico e morfologia.....	15
1.2.3. Sistemática e filogenia.....	18
1.2.4. Aspectos ecológicos.....	20
1.2.5 <i>Haemoproteus</i> spp. em aves Columbiformes.....	21
1.3. Aves Columbiformes.....	24
1.4. Apresentação da dissertação.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1. Locais de estudo, hospedeiros e coleta das amostras de sangue.....	28
2. Análises morfológicas.....	28
3. Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	29
4. Análise filogenéticas.....	30
5. Análises ecológicas.....	31
RESULTADOS.....	32
1. Análises microscópicas.....	32

2. Análises moleculares (n PCR) e filogenéticas.....	37
3. Dados ecológicos para <i>H. paramultipigmentatus</i> : seca e chuva.....	39
DISCUSSÃO.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar caracterização multidisciplinar da espécie *Haemopro.* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* e avaliar a prevalência de *Haemoproteus* spp. em aves Columbiformes coletadas na Mata Atlântica da Zona da Mata mineira. Esse é o primeiro registro dessa espécie no Brasil e nos hospedeiros Columbiformes, *Leptotila verreauxi* e *Columbina talpacoti*. Algumas características morfológicas e morfométricas diferiram da descrição original, como por exemplo, a área do núcleo do eritrócito parasitado por macrogametócitos, gametócitos podem tocar a membrana e o núcleo do eritrócito ao mesmo tempo, área do microgametócitos e presença de vacúolos em gametócitos jovens. As linhagens *H. paramultipigmentatus* obtidas neste estudo, se agruparam em um clado monofilético, com elevado valor de suporte (98/1.0), contendo outras linhagens desta espécie obtidas em estudos prévios. Dentre as 76 aves analisadas (63 *C. talpacoti*, 13 *L. verreauxi*), 48 estavam parasitadas por *Haemoproteus* spp. (prevalência total de 63,15%) e dessas, 26 estavam parasitadas pela espécie *H. paramultipigmentatus* (prevalência de 34,21%). Foram estimados também dados inéditos sobre prevalência, parasitemia e agregação de *Haemoproteus paramultipigmentatus* para os 24 meses de coletas das aves, realizadas na seca e chuva sendo a prevalência no período de seca menor 24,32% que no período chuvoso 40,47%. O índice de agregação na seca (0,821) foi maior que aquele registrado no verão (0,762). O trabalho apresenta novos dados sobre hospedeiros, morfologia, biologia molecular, filogenia e ecologia para uma população *H. paramultipigmentatus* encontrada na Mata Atlântica e ressalta importância de caracterizações multidisciplinares para conhecimento da diversidade de hemosporídeos aviários.

Palavras-chave: Hemosporídeos aviários, Columbidae, *Columbina talpacoti*, *Leptotila verreauxi*, Mata Atlântica.

ABSTRACT

The aim of this study was to realize a multidisciplinary characterization of *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* and to evaluate the prevalence of *Haemoproteus* spp. in Columbiform birds, collected in Atlantic Forest, Zona da Mata, Minas Gerais. This, is the first record of this species in Brazil and in the Columbiformes species, *Leptotila verreauxi* and *Columbina talpacoti*. Some characteristics morphological and morphometric differed from the original description, such as: the area of the nucleus in erythrocyte parasitized by macrogametocytes, gametocytes touching envelope and erythrocyte nucleus at the same time, microgametocytes area and the presence of vacuoles in young gametocytes. *H. paramultipigmentatus* lineages obtained in this study, were grouped in a monophyletic clade, with a high support value (98 / 1.0), containing other lineages of this species, obtained in previous studies. Among the 76 birds analyzed (63 *C. talpacoti*, 13 *L. verreauxi*), 48 were parasitized by *Haemoproteus* spp. (Total prevalence 63.15%). Of these, 26 were parasitized by *H. paramultipigmentatus* (prevalence of 34.21%). It was also estimated, for the first time, data on prevalence, parasitemia and aggregation of *Haemoproteus paramultipigmentatus*, during 24 months. These data were carried out in the dry and rainy seasons. The prevalence in the period of dry is smaller (24.32%) than in the rainy (40,47%). The aggregation index in dry (0.821) was higher than that registered in rainy (0.762). This study presents new data on host, morphology, molecular biology, phylogeny, and ecology for an *H. paramultipigmentatus* population found in the Atlantic Forest and emphasizes the importance of multidisciplinary characterizations to know the diversity of avian hemosporids.

Key words: Avian Haemosporidia, Columbidae, *Columbina talpacoti*, *Leptotila verreauxi*, Forest Atlantic.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Haemosporida em aves silvestres

Vassily Danilewsky, entre 1884 e 1896, publicou vários trabalhos sobre hemoparasitos (Haematozoa) contribuindo, principalmente, com os estudos sobre biologia geral desses protozoários. Por não ser taxonomista, Danilewsky não participou da elaboração da classificação da ordem Haemosporida, mas seus trabalhos serviram de base para outros pesquisadores já que ele elencou as principais características que definem o grupo (VALKIŪNAS, 2005). A ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885) é um grupo de protistas (Alveolata, Apicomplexa) parasitos intracelulares obrigatórios de anfíbios, aves, mamíferos e répteis, com ampla distribuição geográfica (VALKIŪNAS, 2005). São unicelulares, eucarióticos, sem organelas locomotoras, e com um complexo apical cuja função é a penetração na célula hospedeira. O ciclo de vida é heteróximo alternando entre hospedeiro vertebrado e invertebrado (díptero hematófago) e consiste em esquizogonia, gamogonia e esporogonia (REMPLE, 2004). A ordem Haemosporida inclui representantes das famílias Haemoproteidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae (VALKIŪNAS, 2005). Por compreender o agente da malária, a família Plasmodiidae é o grupo mais estudado em relação às outras famílias em diversas regiões do mundo (VALKIŪNAS, 2005), sendo *Plasmodium* o primeiro gênero descrito da ordem Haemosporida (MARCHIAFAVA & CELLI, 1885).

Segundo VALKIŪNAS, 2005 são classificados taxonomicamente como:

Reino: Protista (Haeckel, 1866)

Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)

Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)
Família: Haemoproteidae
Gênero: *Haemoproteus* Kruse, 1890
Família: Plasmodiidae
Gênero: *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885
Família: Leucocytozoidae
Gênero: *Leucocytozoon* Berestneff, 1904

1. 2. *Haemoproteus* Kruse, 1890

1.2.1. Histórico e estudos no Brasil

A família Haemoproteidae inclui o gênero *Haemoproteus* Kruse, 1890 que foram caracterizados pela primeira vez por KRUSE (1890), que descreveu as três primeiras espécies desse gênero, *H. columbae* (espécie-tipo), *H. danilewskii* e *H. passeris*, sendo as duas primeiras em Columbiformes e a última em Passeriformes. Possuem ampla distribuição geográfica, assim como seus vetores, insetos dípteros hematófagos, que são observados parasitando aves em diferentes regiões do mundo (DURRANT *et al.*, 2006; BEADELL *et al.*, 2009; CARLSON *et al.*, 2013; BARRIENTOS *et al.*, 2014; VALKIŪNAS *et al.* 2014; ZHANG *et al.*, 2014). Em regiões com baixas temperaturas esses parasitos não são encontrados devido à ausência de vetores nesses locais (BENNETT *et al.*, 1993). O gênero *Haemoproteus* kruse, 1980 é dividido em dois subgêneros (*Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*): *Haemoproteus* infectando Columbiformes e *Parahaemoproteus* infectando outras ordens de aves (BELLO, 2011). *Haemoproteus* spp. são transmitidas às aves no momento da alimentação do inseto, que inocula as formas infectantes no sangue periférico das mesmas (VALKIŪNAS, 2005). Essa separação em subgêneros foi baseada inicialmente pela distinção dos vetores e, mais recentemente, em análises filogenéticas (VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro trabalho sobre hemoparasitos em aves foi feito por ARAGÃO (1908) onde foi descrito o ciclo evolutivo completo de *Haemoproteus* em pombos e no hospedeiro invertebrado da família Hippobocidae (Diptera). Após esse estudo, outros se sucederam em diversas partes do país como o de LUCENA (1939) que estudou hemoparasitos em aves silvestres em Recife e o de LAINSON *et al.* (1970) que diagnosticaram hemoparasitos em Passeriformes. Podemos destacar alguns estudos recentes realizados no país. ADRIANO & CORDEIRO (2001) analisaram a prevalência e parasitemia de hemosporídeos em três espécies de pombas silvestres (*Columbina talpacoti*, *Scardafella squammata*, *Zenaida auriculata*) no estado de São Paulo. MARQUES *et al.* (2007) estudaram a prevalência e parasitemia de hemo e ectoparasitos em *Columba livia* no estado de Santa Catarina. SEBAIO *et al.* (2010) analisaram prevalência utilizando técnicas morfológicas para verificarem se a fragmentação do habitat afeta a relação parasito hospedeiro. LACORTE *et al.* (2013) utilizaram técnicas moleculares para caracterizar a diversidade de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. no sudeste do Brasil. FECCHIO *et al.* (2015) trabalharam com hemosporídeos em aves utilizando uma abordagem molecular e morfológica, com amplificação do gene mitocondrial citocromo b para identificação das linhagens com o objetivo de determinar a prevalência de Hemosporídeos com relação à idade, sexo e sazonalidade de uma população de aves, além de determinar a diversidade genética da linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.

1.2.2. Ciclo biológico e morfologia

O ciclo biológico do gênero *Haemoproteus* (Figura 1) é heteróxico, com fases exoritrocíticas e eritrocíticas ocorrendo nas aves e a fase esporogônica ocorrendo no inseto que são os transmissores pertencentes às famílias Cerapogonidae e Hippoboscidae (VALKIŪNAS, 2005;

REMPLE, 2004). Ao se alimentar o inseto inocula os esporozoítos, presentes nas glândulas salivares, nas aves. Os esporozoítos penetram em células endoteliais, iniciando o desenvolvimento da primeira geração de merozoítos. Após a ruptura das células, estes são liberados e podem novamente penetrar em células endoteliais de vários órgãos originando novos merozoítos ou penetram nas hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico. Nessa fase, ocorre a esquizogonia por meio de reprodução assexuada, originando os esquizontes que penetram em novas células e reiniciam o seu desenvolvimento ou se diferenciam em formas sexuadas, os gametócitos. Após a ingestão destes gametócitos pelos insetos hematófagos, há o desenvolvimento e liberação de gametas no estômago do inseto. Os microgametócitos liberam por exflagelação microgametas, que se unem a macrogametas (singamia), produzidos a partir dos macrogametócitos, originando um zigoto, o qual se diferencia em uma forma móvel, denominada oocineto. O oocineto atravessa a parede estomacal e encista-se na hemocele do inseto, formando o oocisto e tem início a fase esporogônica. Por esporogonia o oocisto produz grande número de esporozoítos e quando maduro se rompe liberando-os na hemocele. Por meio da hemolinfa os parasitos chegam à glândula salivar, onde permanecem até que o díptero se alimente, inoculando os esporozoítos juntamente com a saliva na ave (VALKIŪNAS, 2005).

Quanto a morfologia, macrogametócitos e microgametócitos apresentam dimorfismo sexual claramente identificado. Microgametócitos possuem coloração do citoplasma mais intensa, além de núcleo compacto. Macrogametócitos possuem nucléolo, não presente em microgametócitos, porém essa característica não é facilmente visualizada por microscopia óptica (VALKIŪNAS, 2005). Gametócitos maduros apresentam pigmentos de hemozoína, a posição e quantidade desses pigmentos são importantes caracteres para distinção das espécies, assim como a volutina que também ajuda a distinguir espécies dependendo da presença ou ausência da mesma

(VALKIŪNAS, 2005). Outros caracteres morfológicos também são analisados para identificação das espécies, como: posição do núcleo do parasito, posição do parasito na célula hospedeira, se tocam ou não na membrana e/ou no núcleo do parasito. Como exemplo, podemos citar os trabalhos de VALKIŪNAS *et al.* (2013) e KARADJIAN *et al.* (2013) que utilizam, além das análises moleculares, utilizam caracteres morfológicos para identificar e distinguir espécies.

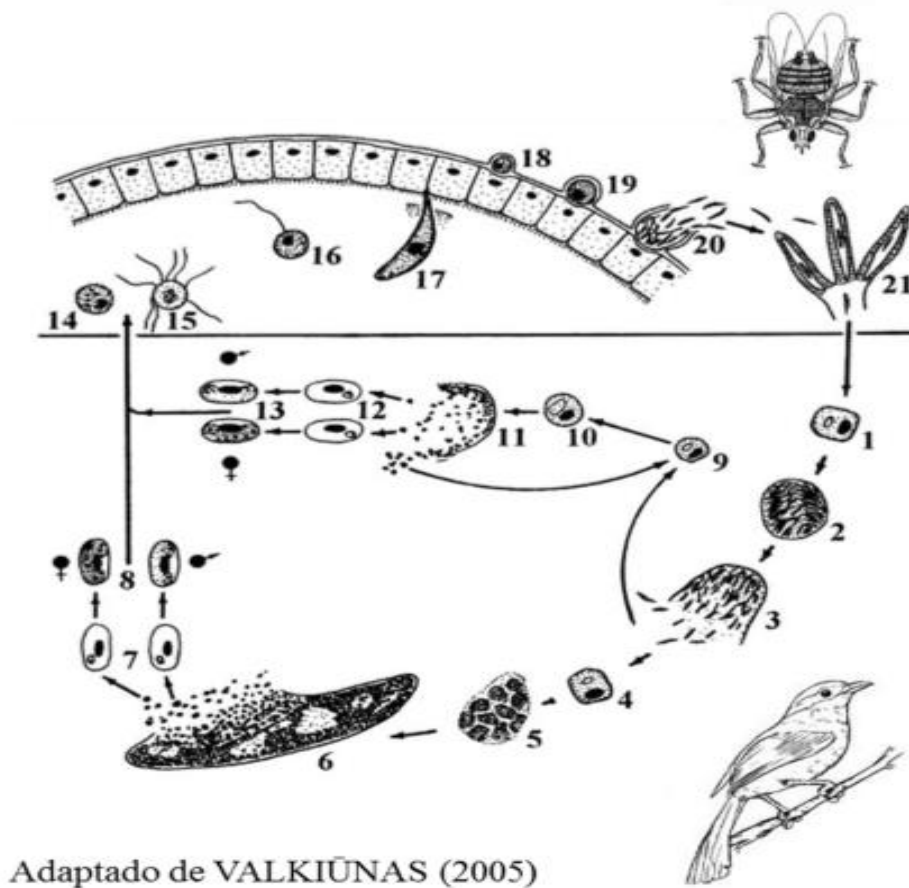


Figura 1. Ciclo biológico do parasito *Haemoproteus* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado: 1 - esporozoítos em células endoteliais; 2, 3 - merontes exo-eritrocíticos primários; 4 - merozoítos em células endoteliais; 5, 6 - crescimento e megalomerozoítos maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 - gametócitos maduros; 9 - merozoítos na célula retículo endotelial no baço; 10, 11 - crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 - merozoítos em eritrócitos; 13 - gametócitos maduros; 14 - macrogameta; 15 - exflagelação de microgametas; 16 - fertilização do macrogameta; 17 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 18 - oocisto jovem; 19, 20 - esporogonia; 21 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. (VALKIŪNAS, 2005).

1.2.3. Sistemática e Filogenia

Haviam poucas hipóteses filogenéticas a respeito de Haemosporida antes da era molecular. Essas hipóteses eram baseadas em hospedeiros vertebrados e história de vida dos parasitos (GARNHAM, 1963). Com base nesses caracteres as primeiras reconstruções da filogenia de Haemosporida mostra um grupo monofilético de *Plasmodium* com caracteres derivados como formação de pigmentos hemozoínicos, enquanto que *Leucocytozoon* não apresenta essa característica foi colocado na base do grupo (GARNHAM, 1966). E embora os pesquisadores concordassem com as diferenças entre os grupos, classifica-los ainda era complicado. Com o advento da biologia molecular a questão sobre a filogenia e sistemática do grupo começou a ser esclarecida. Os dados moleculares são extremamente úteis em caso de espécies crípticas (PERKINS *et al.*, 2011) e também quando nem todos os estágios do ciclo de vida do parasito são observados (PERKINS *et al.*, 2014). Os trabalhos recentes estão incorporando informações moleculares e filogenéticas para descrição de espécies e para apoiarem as hipóteses de novos táxons e sua classificação (PERKINS *et al.*, 2014). Não há consenso sobre as relações filogenéticas de Haemosporida, as hipóteses são resultados de conjunto de dados sobre os genes analisados (PERKINS *et al.*, 2014). Em estudo recente sobre o genoma de *H. tartarkovskiyi* relacionado com parasitos da malária, BENSCH *et al.* (2016) mostraram que *Haemoproteus* é filogeneticamente colocado fora do clado de *Plasmodium* e esse resultado vai em desacordo com estudos anteriores onde os autores utilizam sequencias de *cyt b* combinadas com táxons distantes, como *Toxoplasma gondii* e *Theileria annulata* (ESCALANTE *et al.*, 1998). Dados de sequências de parte do gene mitocondrial citocromo b permitem a divisão do gênero *Haemoproteus* em dois subgêneros, *Parahaemoproteus* e *Haemoproteus* (SANTIAGO-ALARCON *et al.*, 2010). Os dados apontam que o subgênero *Haemoproteus* não parasita apenas aves Columbiformes

conforme acreditava-se, mas também outros grupos de aves não Columbiformes e que essa divisão baseia-se nos vetores que transmitem os parasitos, confirmando a proposta de MARTINSEN *et al.* (2008) (Figuras 2 e 3).

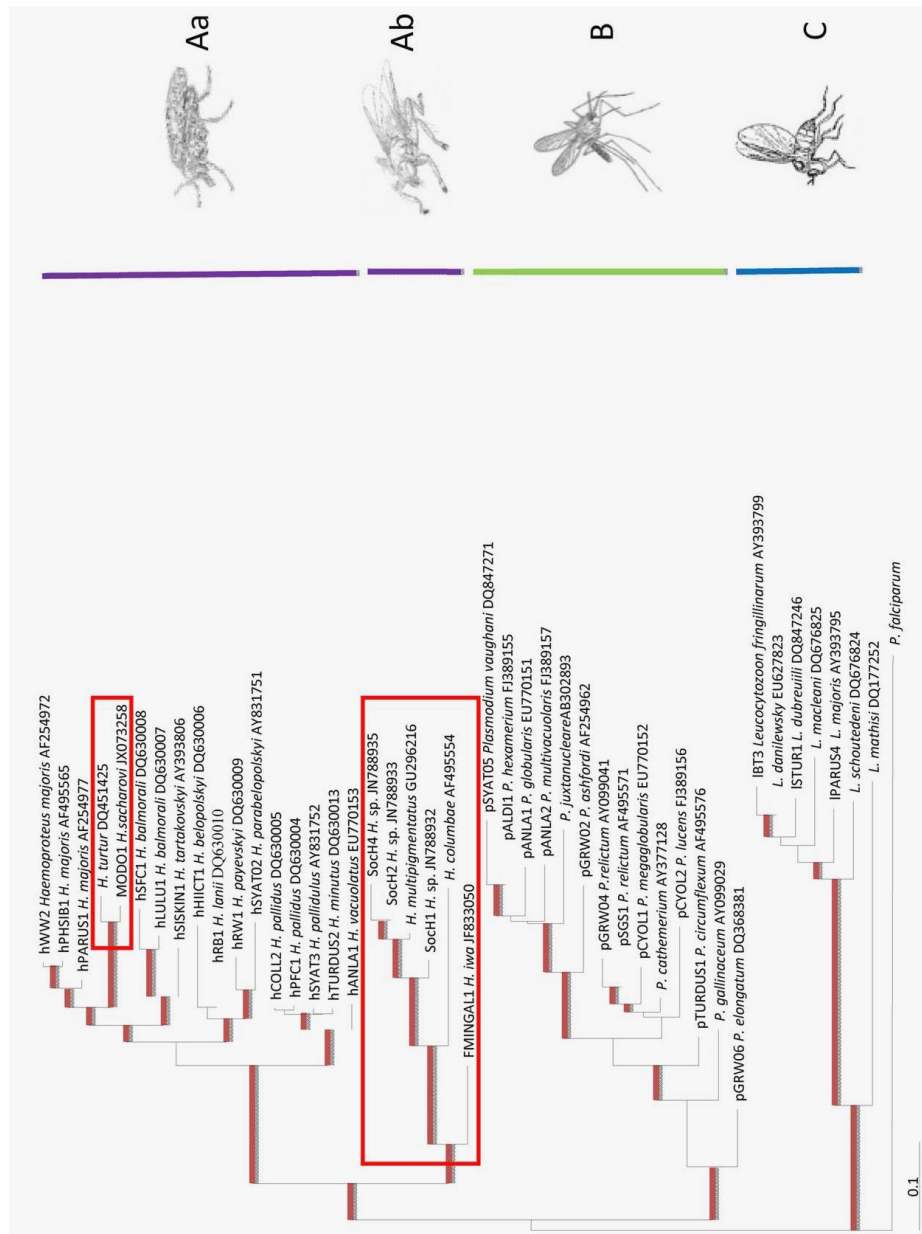


Figura 2. Relações evolutivas de linhagens de Haemosporida. O clado **Aa** representam espécies de *Haemoproreus* transmitidas por Ceratopogonidae, **Ab** são linhagens de *Haemoproreus* transmitidas por Hippoboscidae. O clado **B** inclui espécies de *Plasmodium* transmitidas por Culicidae e o clado **C** espécies de *Leucocytozoon* transmitidas por Simulidae. Fonte: KRIZANAUSKIENE *et al.* (2013).

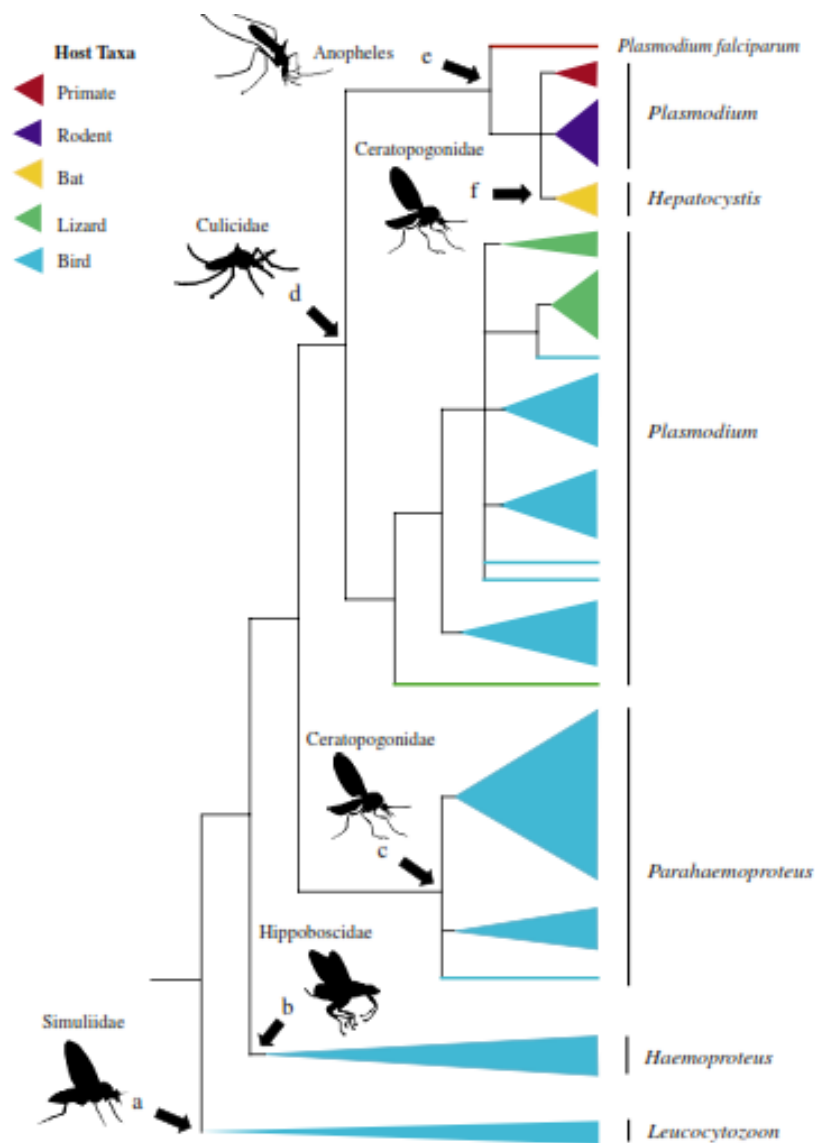


Figura 3. Hipótese sobre relação evolutiva entre gêneros de Hemosporida. As setas indicam grandes mudanças de veotres. *Leucocytozoon* spp. são infectados por moscas da família Simuliidae; B e C gênero *Haemoproteus* divididos em dois subgêneros, *Haemoproteus* vetorados por Hippoboscidae e *Parahaemoproteus* vetorados por Ceratopogonidae; D e E *Plasmodium* spp. vetorados por Culicidae e Anopheles respectivamente; F *Hepatocystis* vetorados por Ceratopogonidae. Fonte: MARTINSEN *et al.* (2008).

1.2.4. Aspectos ecológicos

Mudanças ambientais, desmatamento, temperatura e umidade, afetam interações do sistema parasito-hospedeiro (KEESING *et al.*, 2008). Essas alterações podem facilitar o surgimento de doenças e disseminação de parasitos (VITTOR *et al.*, 2006). Infecções causadas por hemosporídeos em aves são conhecidas e podem variar de assintomáticas a fatais (FERRELL *et al.*, 2007). Além de afetarem o sucesso reprodutivo do hospedeiro, reduzem o *fitness*, causarem apatia e morte (MERINO *et al.*, 2000; VALKIŪNAS *et al.*, 2013). Segundo FERRELL (2007) *Haemoproteus* spp. tem baixa patogenicidade e quase nunca são causa de mortalidade, exceto para Columbiformes, codornizes e perus. Apesar disso, há registro na literatura de mortes de aves não Columbiformes em um zoológico nos Estados Unidos causadas por infecção por *Haemoproteus* spp. (FERRELL *et al.*, 2007). HERNÁNDEZ- LARA, *et al.* (2017) analisaram como os parasitos respondem aos parâmetros ambientais tais como degradação ambiental, seca, chuva e como o ambiente pode influenciar na carga parasitária do hospedeiro, segundo o estudo se o ambiente possui boas condições de sobrevivência com alimento abundante, o hospedeiro teria melhor condição corporal sendo menos susceptível ao parasito. Assim, fica clara necessidade de se ampliar estudos sobre diversidade, especificidade e patogenicidade/dano de hemosporídeos em aves da Mata Atlântica (VALKIŪNAS *et al.*, 2013).

1.2.5. *Haemoproteus* spp. em aves Columbiformes

Atualmente são consideradas válidas mais de 140 espécies de *Haemoproteus* descritas com base em caracteres morfológicos parasitando aves em diversas partes do mundo (VALKIŪNAS, 2005; IEZHOVA *et al.*, 2011), sendo ainda maior este número quando consideramos sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo *b* (BENSCH *et al.*, 2004). No banco de dados sobre

hemosporídeos aviários (BENSCH *et al.*, 2009) há mais de 900 linhagens do gênero *Haemoproteus* depositadas (gene mitocondrial citocromo *b*) (MALAVI, 2016). Porém se considerarmos aves pertencentes a ordem Columbiformes, os números de espécies de *Haemoproteus* se restringem. O gênero é dividido em dois subgêneros com base em estudos moleculares: *Haemoproteus* que possuem como vetores dípteros hematófagos da família Hippoboscidae e *Parahaemoproteus* que possuem como vetores dípteros hematófagos da família Ceratopogonidae (VALKIŪNAS, 2005). Os parasitos que pertencem ao subgênero *Haemoproteus* são tipicamente encontrados em aves da ordem Columbiformes (MERINO *et al.*, 2012). Porém estudos mostraram que o subgênero *Haemoproteus* já foi encontrado em aves não Columbiformes (LEVIN *et al.*, 2011; 2012) e que ferramentas moleculares são essenciais para distinguir esses subgêneros, já que morfológicamente essa distinção entre as formas do parasito não é possível (LEVIN *et al.*, 2011; 2012) devido as fases no sangue dos hospedeiros vertebrados serem semelhantes (VALKIŪNAS, 2005; KRIŽANAUSKIENE *et al.*, 2013). Existem nove espécies do subgênero *Haemoproteus* registradas em aves Columbiformes (Figura 4), são elas: *Haemoproteus columbae* (Kruse), *H. krylovi* Subkhonov, *H. multipigmentatus* Valkiūnas *et al.*, *H. multivolutinus* Valkiūnas *et al.*, *H. palumbis* Baker, *H. paramultipigmentatus* Valkiūnas *et al.*, *H. pteroclis* (Shamsuddin & Mohammad) *H. sacharovi* Novy & MacNeal e *H. turtur* Covalada Ortega & Gállego Berenguer, (VALKIŪNAS, 2005; VALKIŪNAS *et al.*, 2010; 2013). Os parasitos desses dois subgêneros possuem morfologia semelhante no sangue do vertebrado, entretanto, a esporogonia é distinta no invertebrado (VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN *et al.*, 2008).

Embora considerados anteriormente como organismos inócuos, estudos recentes mostraram que *Haemoproteus* spp. podem ser patogênicos dependendo do grau de parasitemia (REMPLE,

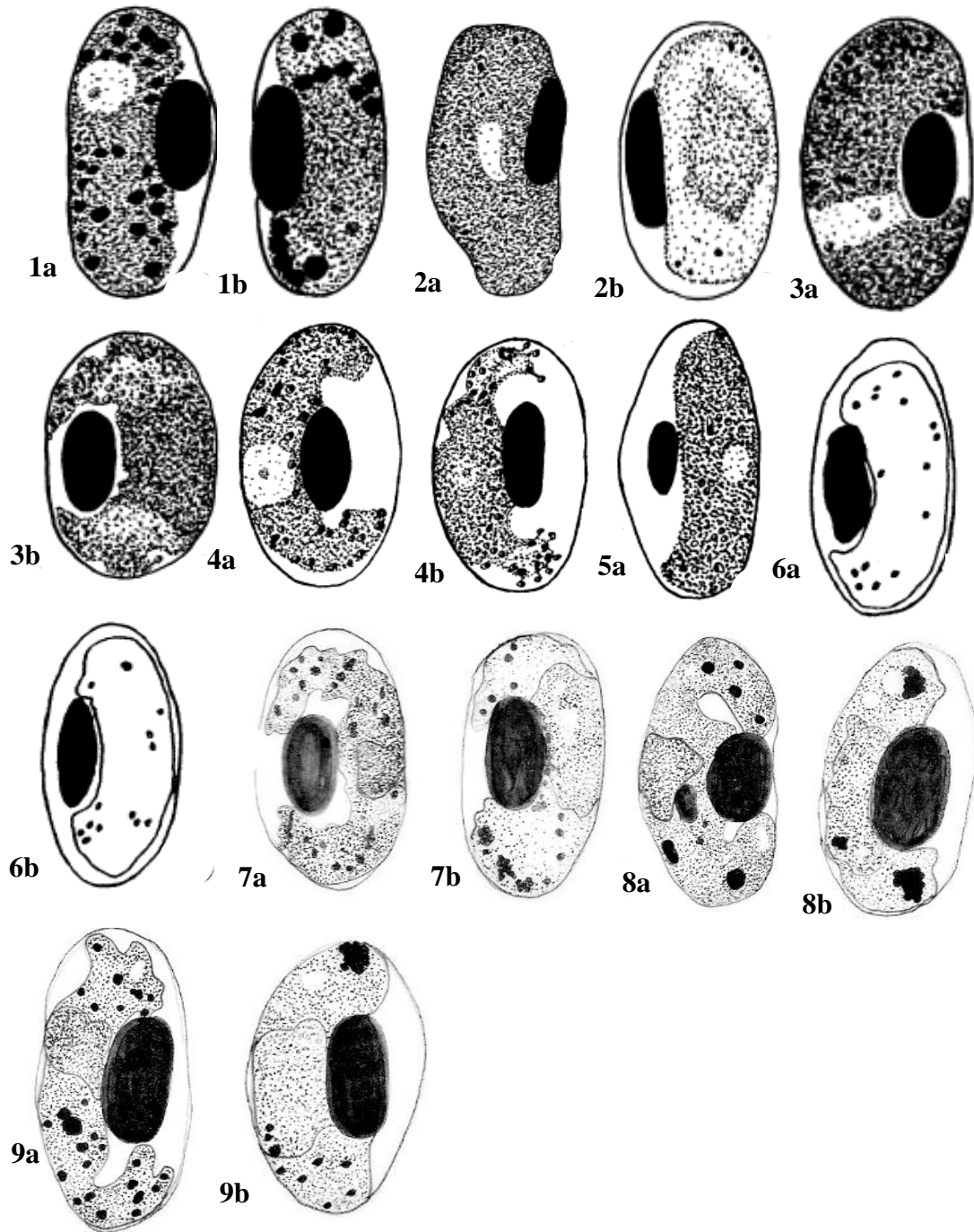


Figura 4. Formas evolutivas de *Haemoproteus* spp. registradas em aves da ordem Columbiformes. 1. *Haemoproteus columbae*; 2. *H. sacharovi*; 3. *H. turtur*; 4. *H. palumbis*; 5. *H. krylovi*; 6. *H. pteroclis*; 7. *H. multipigmentatus*; 8. *H. multivolutinus*; 9. *H. paramultipigmentatus*. a. Macrogametócito; b. Microgametócito.

2004). É o que se nota em FERRELL *et al.* (2007) que registraram a morte de aves em um zoológico que apresentavam boas condições físicas porém a necropsia apontou alterações em diversos órgãos e análises por *nested* PCR com amplificação do gene mitocondrial *cyt b* confirmaram a presença de *Haemoproteus* spp. Os hemoparasitos são responsáveis por causar a extinção de espécies de aves (FELDMAN *et al.*, 1995), alterar o comportamento das mesmas, afetando a seleção sexual, tornando os indivíduos menos hábeis para estabelecer territórios e diminuindo o sucesso reprodutivo podendo ter um impacto significativo na população (RICKLEFS *et al.*, 1992; PADILLA *et al.*, 2004). Há também, estudo mostrando que as aves muito parasitadas possuem capacidade maior de escape de predador (GARCIA-LONGORIA *et al.*, 2015).

1. 3. Aves Columbiformes

Columbiformes são encontrados na maior parte do mundo, bem adaptados aos ambientes urbanos devido a facilidade de encontrar alimentos e podem ser granívoros ou frugívoros (AMÂNCIO *et al.*, 2010). Costumam forragear próximos ao solo, são importantes dispersores de plantas já que ingerem os grãos de sementes inteiros, sem quebra-los (SICK, 2001). Possuem comportamento agregativo o que facilita disseminação de parasitos entre a população (TELLA, 2002). Estudos apontam que a carga parasitária aumenta de acordo com o tamanho da colônia e este é um dos custos da vida em grupo (BROWN & BROWN, 1996). Além disso estudos mostram também que a riqueza de hemoparasitos, tanto em número de espécies quanto em gênero é maior em espécies coloniais do que as solitárias (TELLA, 2002). Portanto, aves Columbiformes estão associadas com diferentes graus de patogenicidade e epizootia (PADILLA *et al.*, 2004).

Columbina talpacoti é popularmente conhecida como Rolinha- roxa, tem ocorrência desde o México até a Argentina e são granívoras (CINTRA *et al.*, 1990). Possuem dimorfismo sexual, habitam bordas de florestas, várzeas, zonas arbustivas, áreas abertas e também ambientes urbanos (AVES CATARINENSES, 2017).

Leptotila verreauxi, chamada também de Juriti pupu pode ser vista no interior de florestas ou bordas das mesmas, vive aos pares ou solitária. Possuem como dieta sementes, insetos, lagartas e frutos caídos no solo (AVES CATARINENSES, 2017).

1. 4. Apresentação da dissertação

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado: “**Estudos sobre ectoparasitos e hemoparasitos de aves silvestres de fragmentos da Mata Atlântica da Zona da Mata de Minas Gerais**”, financiado pela CAPES (Programa de Apoio à Parasitologia Básica), onde foram coletadas mais de 1900 aves de 120 espécies distintas em fragmentos da mata Atlântica mineira. Deste material, nos coube estudar os hemoparasitos em aves da ordem Columbiformes coletadas neste projeto. Este estudo teve por objetivo realizar caracterização multidisciplinar de *Haemoproteus paramultipigmentatus* encontradas em aves Columbiformes de fragmentos da Mata Atlântica, ressaltando importância da taxonomia integrativa, e ainda determinar a prevalência e parasitemia de *Haemoproteus* spp. nas aves Columbiformes.

INTRODUÇÃO

Hemosporídeos aviários (Apicomplexa, Haemosporida) constituem grupo diverso de protozoários parasitos intracelulares obrigatórios, heteroxenos, transmitidos exclusivamente por dípteros hematófagos (VALKIŪNAS, 2005). Os hemosporídeos do gênero *Haemoproteus* (Kruse) (Apicomplexa: Haemosporida) tem como hospedeiros vertebrados aves, anfíbios, mamíferos e répteis, e, como invertebrados dípteros hematófagos das famílias Hippoboscidae (subgênero *Haemoproteus*) e Ceratopogonidae (subgênero *Parahaemoproteus*) (VALKIŪNAS, 2005).

Os hemoparasitos de aves silvestres influenciam seus hospedeiros no processo reprodutivo, *fitness*, comportamento e tamanho da ninhada (MERINO *et al.*, 2000; MARZAL *et al.*, 2005; GARCIA-LONGORIA *et al.*, 2015). Atualmente são consideradas válidas mais de 140 espécies de *Haemoproteus* descritas com base em caracteres morfológicos e moleculares (VALKIŪNAS 2005; IEZHOVA *et al.*, 2011). Se considerarmos linhagens de parasitos com sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo b, essa diversidade é ainda maior podendo ultrapassar 900 linhagens, de acordo com o banco de dados moleculares sobre hemosporídeos aviários (BENSCH *et al.*, 2009; MALAVI, 2016).

A definição de espécies de Haemosporida contribui com os estudos sobre diversidade e especiação parasitária. Diversos estudos mostram que o uso de técnicas restritas (apenas morfologia ou biologia molecular, por exemplo) podem esconder espécies crípticas e subestimar o número de espécies para estes hemoparasitos. Cada vez mais, o uso da chamada taxonomia integrativa vem sendo aplicada buscando melhorar os parâmetros utilizados para definição espécies, constituindo um melhor modelo para estudo taxonômico do grupo (OUTLAW & RICKLEFS, 2014).

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos: fazer caracterização multidisciplinar da espécie *Haemoproteus (Haemoproteus) paramultipigmentatus* Valkiūnas *et al.*, 2013 por meio de técnicas de morfologia, biologia molecular e filogenia e determinar a prevalência e parasitemia de *Haemoproteus* spp. em aves Columbiformes da Mata Atlântica de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Locais de estudo, hospedeiros e coleta das amostras de sangue:

As aves foram coletadas entre janeiro de 2014 a dezembro de 2015 em cinco fragmentos de Mata Atlântica em Minas Gerais (tabela 1). Foram capturadas 76 aves, incluindo 63 *Columbina talpacoti* (Temminck) e 13 *Leptotila verreauxi* (Bonaparte), utilizando redes de neblina. As amostras de sangue (aproximadamente 30µL) das aves foram coletadas por punção da veia braquial e processadas para realização das análises microscópicas e moleculares com o intuito de detectar e identificar os hemosporídeos. As aves foram identificadas de acordo com RIDGELY *et al.* (2009) e SIGRIST (2014), anilhadas e em seguida liberadas. Todos os procedimentos e métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo nº 042/2012) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (nº 29.268–3).

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

Localidade (Zona da Mata mineira)	Espécie de ave	Número de aves coletadas
Caeté (21°48'23" S, 43°15'45.7"W)	<i>Columbina talpacoti</i>	28
	<i>Leptotila verreauxi</i>	7
Chácara (21°40'18.2" S, 43°13'14.2"W)	<i>Columbina talpacoti</i>	16
	<i>Leptotila verreauxi</i>	0
Sítio Passarada (21°48'24.8"S, 43°19'34. 1"W)	<i>Columbina talpacoti</i>	3
	<i>Leptotila verreauxi</i>	0
Santa Bárbara (21°58'51"S, 43°41'44.8"W)	<i>Columbina talpacoti</i>	2
	<i>Leptotila verreauxi</i>	1
Juiz de Fora (21° 43' 52.5" S, 43° 22' 16.2" W)	<i>Columbina talpacoti</i>	14
	<i>Leptotila verreauxi</i>	5

2. Análises morfológicas

Pelo menos quatro esfregaços sanguíneos foram preparados para cada ave e ao menos um esfregaço de cada ave examinados para calcular a prevalência da infecção e a parasitemia. Estas lâminas foram fixadas em metanol, durante 3 minutos, e coradas com Giemsa (1:9 em água destilada), durante 40 minutos, conforme VALKIŪNAS *et al.*, (2008). Em seguida, uma lâmina de cada ave foi analisada sob microscópio de campo claro (Olympus BX-51, Tóquio, Japão) com ampliação de 1000X, onde foram observados 100 campos microscópicos para a estimativa da prevalência da infecção (BUSH *et al.*, 1997), da parasitemia e para a quantificação do número de formas eritrocitárias dos parasitos (GODFREY *et al.*, 1987). Análises morfométricas foram realizadas utilizando o software Image-Pro plus 6.0, de acordo com VALKIŪNAS (2005), medindo-se 50 macrogametócitos e 50 microgametócitos. A razão do deslocamento do núcleo (NDR), foi calculada de acordo com BENNETT *et al.* (1972), utilizando a fórmula $2X / (X + Y)$, em que Y, representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo da célula hospedeira, no lado ocupado pelo parasito, e X representa a distância entre a periferia da célula e a periferia do núcleo da célula hospedeira, no lado não ocupada pelo parasito.

3. Extração de DNA, PCR e sequenciamento

As amostras de sangue foram armazenadas a -20° C, até que a extração de DNA fosse realizada. O DNA total das amostras de sangue foi extraído utilizando o Kit Wizard® Purification (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A amplificação de um fragmento de ~ 479 pb do gene citocromo b (cit b) dos hemosporídeos aviários, foi realizada por meio de *Nested*-PCR. Os iniciadores HaemFNI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') e HaemNR3 (5'-

ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') foram utilizados na primeira reação e os iniciadores HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') e HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), na segunda reação, tal como proposto por BENSCH *et al.* (2000). As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25µL, contendo 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 2,5µL de cada iniciador (10µM), 5 µL ou 1 µL de DNA genômico (primeira e segunda reações, respectivamente), e água livre de nuclease, até completar o volume final da reação. A ciclagem utilizada em ambas as reações foi a mesma, e seguiu o proposto por (HELLGREN *et al.*, 2004). Os produtos da PCR foram submetidos em gel de agarose a 2% e corados com Blue Green Loading Die I (LGC Biotecnologia®, Cotia, São Paulo, Brasil), e visualizados sob luz ultravioleta (figura 3). Os produtos amplificados com sucesso foram purificados, utilizando o Kit de Purificação QIAquick® (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados em um 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

4. Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando um conjunto de sequências do gene citocromo b (cyt b) de hemossporídeos aviários, obtidas do banco de dados molecular, MalAvi (BENSCH *et al.* 2009) e no presente estudo. Toda a manipulação do *dataset* foi realizada em pacotes do programa ARB (LUDWIG *et al.*, 2004). O programa jModelTest_2.1.4 (DARRIBA *et al.*, 2012) foi utilizado para seleção do melhor modelo evolutivo para as reconstruções filogenéticas. A inferência Bayesiana (IB) foi realizada no programa Mr. Bayes v.3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012), aplicando o modelo evolutivo GTR + G + I. Quatro cadeias simultâneas de Markov Monte Carlo (MCMC) foram realizadas em 1.000.000 gerações e um

burn-in de 25% foi aplicado. A análise de máxima verossimilhança (MV) foi realizada no programa PhyML v.3.0 (GUINDON *et al.*, 2010) utilizando o modelo GTR + G + I. A confiabilidade dos ramos foi avaliada utilizando o método não paramétrico do *bootstrap* com 1.000 pseudorréplicas.

5. Análises ecológicas

Foram estimadas prevalência, parasitemia e agregação dos parasitos para os 24 meses de coletas das aves, realizadas na seca e chuva (2014 e 2015), usando o software Quantitative Parasitology v.3.0 (REICZIGEL & RÓZSA, 2005). A agregação dos parasitos nas populações de hospedeiros foi estimada usando o índice de discrepância (ID) proposto por POULIN (1993).

RESULTADOS

1. Análises microscópicas

Dentre as 76 aves analisadas, 48 estavam parasitadas por *Haemoproteus* spp. (prevalência total de 63,15%) (figura 1) e dessas, 26 estavam parasitadas pela espécie *Haemoproteus* (*H.*) *paramultipigmentatus* (prevalência de 34,21%), sendo 25 da espécie *Columbina talpacoti* (prevalência de 32,89%) e uma da espécie *Leptotila verreauxi* (prevalência de 1,31%). A parasitemia média total para ambas as espécies de hospedeiro encontradas para *H.* (*H.*) *paramultipigmentatus* foi de 0,09% ($\pm 0,11$). Esse é o primeiro registro desta espécie de parasito no Brasil e em ambas as espécies de aves encontradas em fragmentos da Mata Atlântica.

***Haemoproteus* (*Haemoproteus*) *paramultipigmentatus* caracterização morfológica**

Todas as formas do parasito encontradas foram registradas em eritrócitos maduros (Figura 2). Os dados morfométricos das formas eritrocíticas está apresentada na Tabela 2. A morfologia da população encontrada no presente estudo está sumarizada a seguir:

Formas Jovens (Figura 2a-d): desenvolvem-se em eritrócitos maduros, podendo ser registradas em qualquer região do eritrócito (Fig. 2a-b), sendo mais comum na região polar (Fig. 2b), e podem ou não tocar o núcleo do hospedeiro (Fig. 2c-e). Possuem formato irregular (Fig. 2a), citoplasma homogêneo, presença de pequenos vacúolos ($0,2 \mu\text{m}^2$) (Fig. 2a-b) e de grânulos de pigmentos de hemozóina dispersos no citoplasma (Fig. 2c-d). O núcleo do parasito é pequeno ($0,6 \mu\text{m}^2$) e de posição mediana ou submediana (Fig. 2c-d).

Macrogametócito jovem (Figura 2d-i): estendem-se ao longo do núcleo do eritrócito (Fig. 2d-e), conforme desenvolvimento, tocando-o com a região mediana (Fig. 2h-i). Possui contorno das extremidades irregular (Fig. 2g-h), citoplasma homogêneo, presença de vacúolos e grânulos de

pigmento hemozoínico (Fig. 2f-h). Não foi observada volutina no citoplasma. Núcleo em posição mediana ou submediana (Fig. 2g-h).

Macrogametócitos (Figura 2j-l): crescem até os polos do eritrócito excedendo o comprimento do núcleo do hospedeiro, tocando-o (Fig. 2j-k). A extremidade do gametócito é ameboide, com espaços entre as extremidades do parasito e o núcleo do eritrócito dando a ele a aparência de chifre (Fig. 2j-k). Esses espaços desaparecem quando os gametócitos estão completamente maduros (Fig. 2l). Foi verificada a presença de pequenos vacúolos com uma área média de $0,88 \mu\text{m}^2 (\pm 0,50)$ ao longo do citoplasma homogêneo (Fig. 2h-j). Por vezes, acúmulos de pigmento de hemozoína foram observados nas extremidades do parasito (Fig. 2f). Quando não acumulados, o número médio de pigmentos encontrados foi $19,64 (\pm 5,23)$, com área média de $0,29 \mu\text{m}^2 (\pm 0,15)$, distribuídos ao longo do citoplasma. Não foi observada a presença de volutina. O núcleo do parasito é pequeno apresentando área média de $3 \mu\text{m}^2 (\pm 1)$, formato irregular e posição mediana ou submediana (Fig. 2j, k, l). Macrogametócitos deslocam o núcleo do eritrócito lateralmente até quase tocarem a membrana, ocupando todo o espaço disponível no citoplasma, mas não circundam o núcleo completamente (Fig. 2j, k, l). Macrogametócitos tocam o núcleo do eritrócito com a parte mediana e por vezes podem tocar a membrana e o núcleo do parasito ao mesmo tempo (Fig. 2i, k-l). Os parasitos não alteram o formato dos eritrócitos.

Microgametócitos jovens (Figura 2m-t): crescem ao longo do núcleo do eritrócito, tocando-o (Fig. 2m). Possuem membrana com contorno amebóide (Fig. 2o). O citoplasma é homogêneo, apresentando vacúolos (Fig. 2m, o). Não foi observada a presença de volutina. O núcleo do parasito foi observado ocupando posição mediana. Deslocam o núcleo do eritrócito lateralmente mas não circundam o núcleo completamente (Fig. 2p). Os parasitos não alteram o formato dos eritrócitos.

Microgametócitos (Figura 1): excedem o tamanho do núcleo do eritrócito, tocando o núcleo (Fig. 2q). O formato da extremidade é ameboide (Fig.2p). Observou-se número de pigmentos hemozoínicos menor do que em macrogametócitos (11 versus 19), porém concentrados na extremidade do parasito (Fig. 2s-t). Foram observados vacúolos com área média de $0,89\mu\text{m}^2 (\pm 0,99)$ (Fig. 2s-t). Não foi observada a presença de volutina. O núcleo do parasito apresentou-se maior do que nos macrogametócitos ($8\mu\text{m}^2$ versus $3\mu\text{m}^2$) (Fig. 2r-t). Podem tocar a membrana e o núcleo do eritrócito ao mesmo tempo (Fig. 2n, o, q). Os parasitos não alteram o formato dos eritrócitos.

Observações adicionais

Entre as espécies encontradas parasitando aves Columbiformes, *Haemoproteus paramultipigmentatus* possui características semelhantes a *H. multipigmentatus*, como deslocamento do núcleo do eritrócito ligeiramente e espaços nas extremidades entre o núcleo do eritrócito e o parasito. As duas espécies diferem na presença de volutina (ausente em *H. paramultipigmentatus*) e maior quantidade de pigmentos em *H. multipigmentatus*.

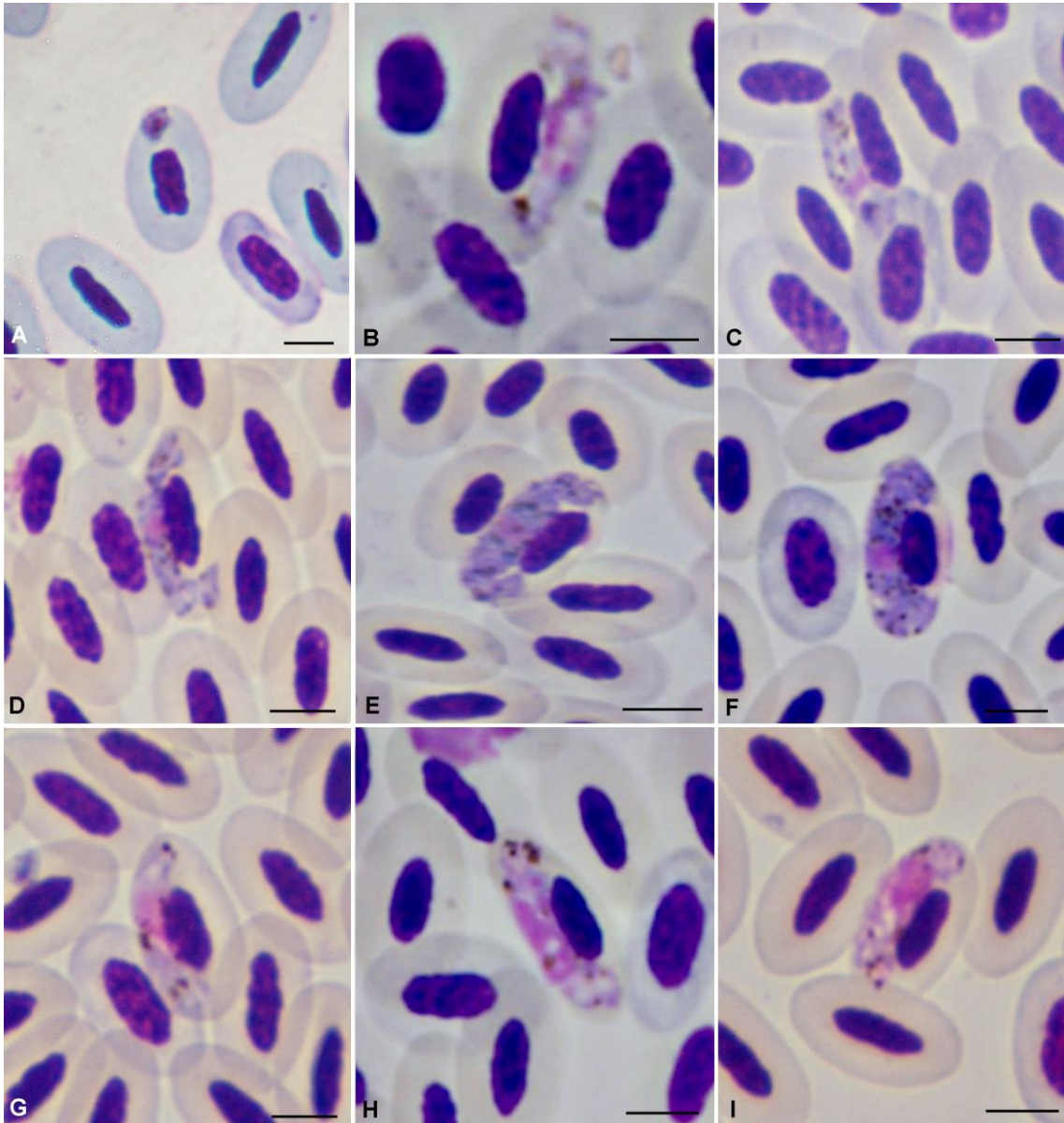


Figura 5: Formas evolutivas de *Haemoproteus* spp. encontradas em esfregaços sanguíneos de aves Columbiformes em fragmentos de Mata Atlântica. A-B. gametócitos jovens; C-F. Macrogametócitos; G-I. Microgametócitos. Barras = 5 μ m.

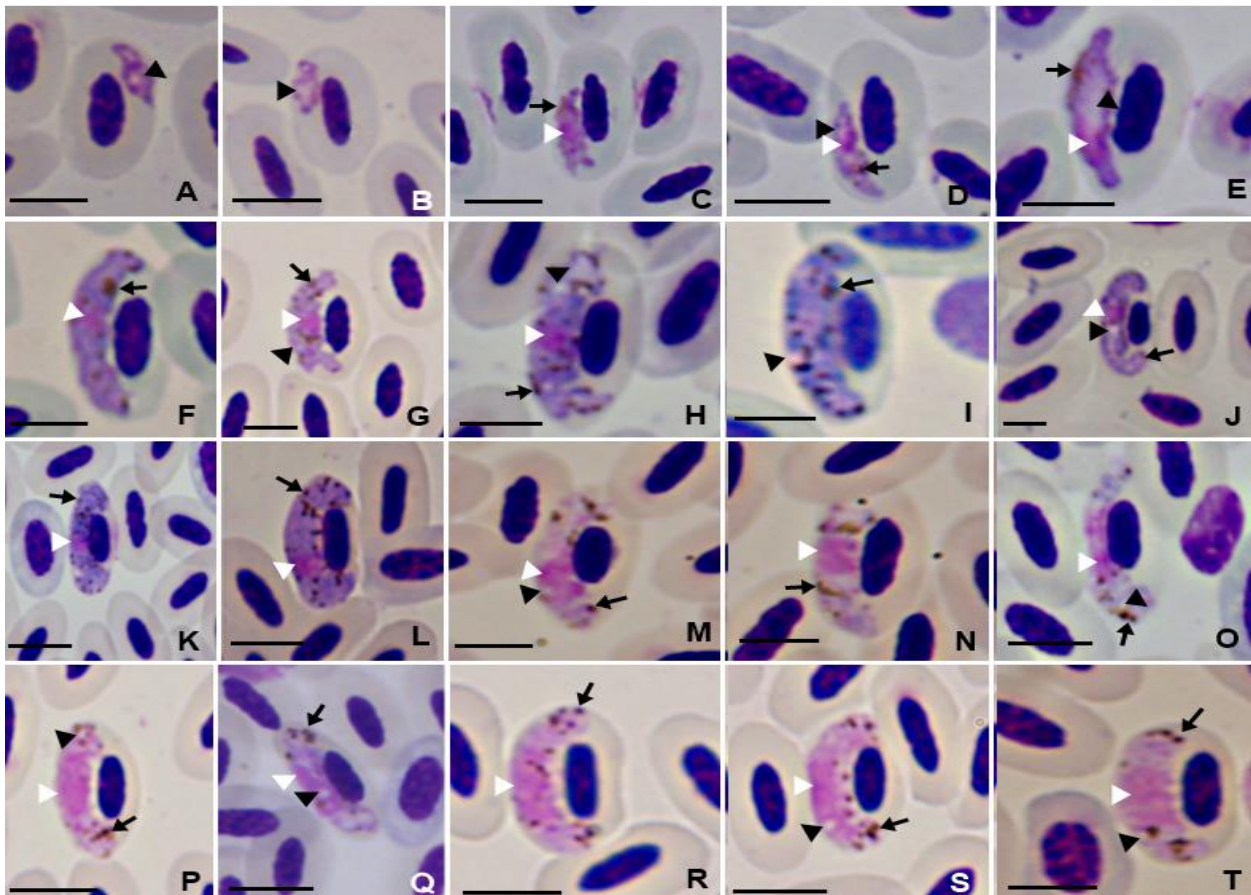


Figura 6. Formas de *Haemoproteus paramultipigmentatus* encontradas em esfregaços sanguíneos de *Columbina talpacoti* em fragmentos da Mata Atlântica. Gametócitos jovens (A- C); macrogametócitos jovens (D- G); macrogametócitos (H- L); microgametócitos jovens (M- P); microgametócitos (Q- T). Setas pretas pequenas indicam vacúolos, setas pretas maiores indicam pigmentos hemozoínicos, setas brancas indicam núcleo do parasito. Barras = 5 μ m.

Tabela 2. Morfometria dos gametócitos maduros de *Haemoproteus paramultipigmentatus* em eritrócitos de *Columbina talpacoti* (presente estudo) e de *Columbina passerina socorroensis* (VALKIŪNAS, *et al.* 2013).

Características	<i>H. paramultipigmentatus</i> em <i>C. talpacoti</i> (presente estudo) ^a	<i>H. paramultipigmentatus</i> em <i>C. passerina socorroensis</i> (VALKIŪNAS <i>et al.</i> , 2013) ^a
Macrogametócito	n=50	n=21
Comprimento	11.81–21.01 (16.85 ± 2.31)	12.7–18.6 (15.2 ± 1.7)
Largura	1.41–3.55 (2.72 ± 0.44)	2–3.3 (2.7 ± 0.3)
Área	24.98–46.91 (36.94 ± 5.70)	32.7–44.5 (36.8 ± 2.9)
<i>Núcleos dos Gametócitos</i>	n= 50	n= 21
Comprimento	0.72–2.95 (1.71 ± 0.45)	1.8–2.8 (2.3 ± 0.3)
Largura	0.8–2.76 (1.63 ± 0.41)	1.2–2.3 (1.6 ± 0.3)
Área	1.39–5.39 (3.01 ± 1.06)	2–4.2 (3 ± 0.7)
<i>Grânulos de pigmentos</i>	9–31 (19.64 ± 5.23)	24–32 (29 ± 2.4)
Microgametócitos	n= 50	n= 21
Comprimento	4.29–16.60 (13.17 ± 1.91)	11.80–13.7 (12.7 ± 0.6)
Largura	1.84–3.55 (2.55 ± 0.41)	2.3–3.6 (2.8 ± 0.4)
Área	17.86–47.74 (30.74 ± 5.05)	30.5–42.3 (36.8 ± 3.6)
<i>Núcleo dos Gametócitos</i>	n= 50	n= 21
Comprimento	1.86–6.83 (4.06 ± 1.13)	3.8–6.2 (5 ± 0.6)
Largura	1.19–3.41 (2.08 ± 0.48)	2.1–3.6 (2.8 ± 0.4)
Área	2.30–14.33 (8 ± 3.04)	8.7–15.6 (11.7 ± 1.7)
<i>Grânulos de pigmentos</i>	2–19 (10.96 ± 3.76)	14–22 (18.3 ± 2.2)

^aTodas as medidas são dadas em micrômetros usando o software Image Pro-plus 6.0 . Valores mínimo e máximo são dados, seguindo entre parênteses, pela média aritmética e desvio padrão. n: número de formas mensuradas.

2. Análises moleculares (nPCR) e filogenéticas

Foram observadas bandas positivas no diagnóstico por *nested*-PCR usando os iniciadores e as condições da PCR descritas na metodologia (Anexo 1). A relação filogenética de duas linhagens (sequencias) de *H. paramultipigmentatus* (COLCA131 e COLCA104) obtidas neste

estudo, encontradas em associação com duas espécies de aves Columbiformes da Mata Atlântica Mineira, estão apresentadas na figura 3. As linhagens de *H. paramultipigmentatus*, em ambos métodos de reconstrução filogenética (ML/BI), se agruparam em um clado monofilético, com elevado valor de suporte (98/1.0), contendo outras linhagens desta espécie (COLPAS03 e COLBUC01) obtidas em estudos prévios feitos na América do Sul (DURRANT *et al.*, 2006; LACORTE *et al.*, 2013). Em nossas análises filogenéticas a respeito do gênero *Haemoproteus*, houve clara divisão do grupo em dois subgêneros: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*, concluindo assim que o gênero não é monofilético.

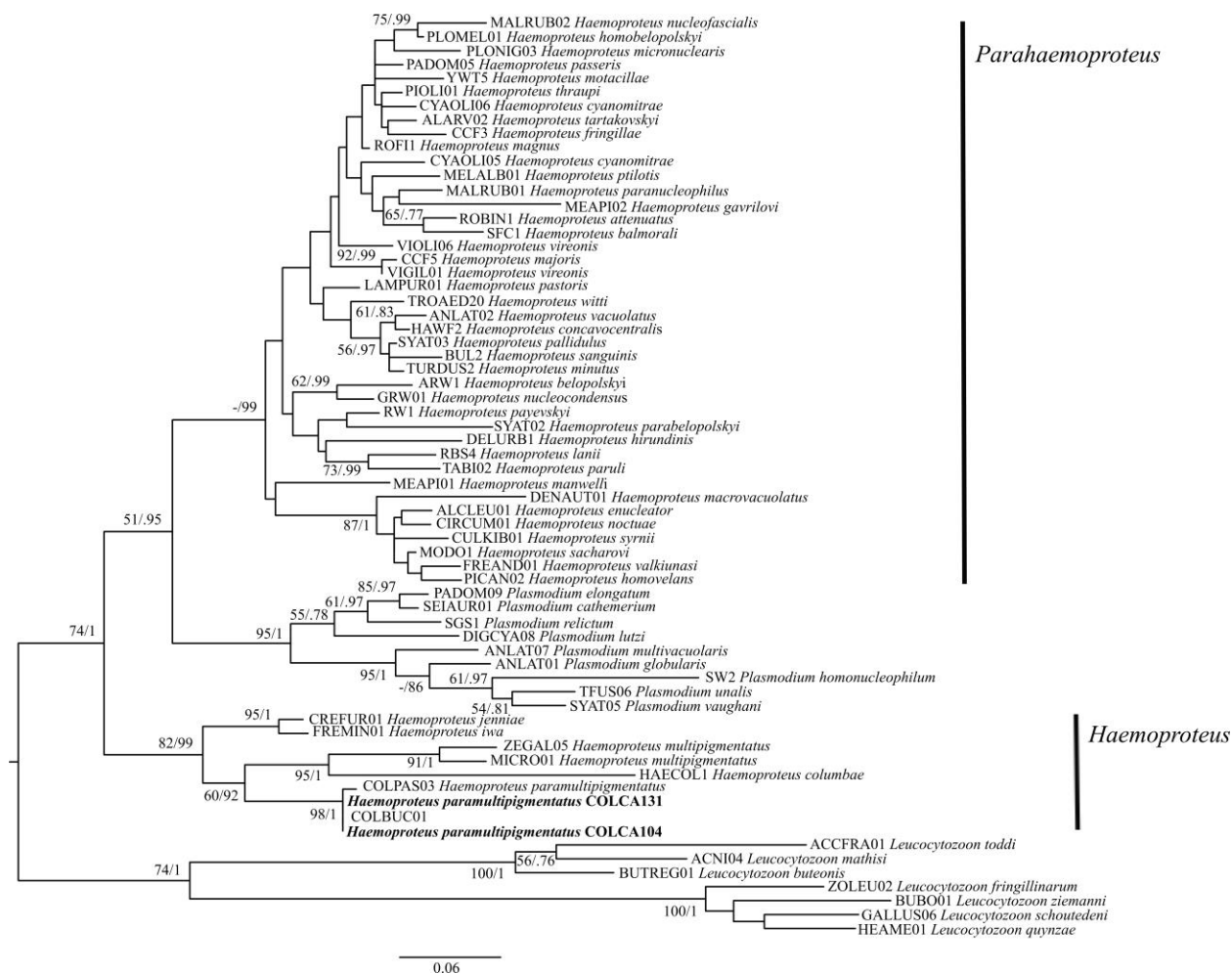


Figura 7. Árvore representando as relações filogenéticas no interior do gênero *Haemoproteus* (Apicomplexa, Haemosporida), inferida por máxima verossimilhança (ML) e com base no gene mitocondrial citocromo b (cyt b). Espécies de *Leucocytozoon* (Apicomplexa, Haemosporida) foram escolhidas como grupo-externo. Os valores nos ramos representam os valores de *bootstrap* (ML) e a probabilidade posterior (BI). O símbolo (-) indica valores de *bootstrap* e/ou probabilidade posterior <50%/0.5. As novas linhagens de *Haemoproteus* (*H.*) *paramultipigmentatus*, obtidas no presente estudo estão destacadas em negrito. A escala representa 6 substituições por 100 nucleotídeos.

3. Dados ecológicos para *H. paramultipigmentatus*: seca e chuva

Dentre as 76 aves analisadas 26 estavam parasitadas pela espécie *Haemoproteus* (*H.*) *paramultipigmentatus* (34,21%), sendo 47% das aves coletadas na seca (março-setembro) e 53%

no verão (setembro-março). A prevalência no período de seca foi menor 24,32% que no período chuvoso 40,47%. A parasitemia média na seca ($0,20 \pm 0,13$) foi maior que aquela registrada no verão ($0,05 \pm 0,04$). O índice de agregação na seca (0,821) foi maior que aquele registrado no verão (0,762). Foram encontradas também moscas da família Hippoboscidae em três hospedeiros *L. verreauxi* (n=2) e *C. talpacoti* (n=1), porém em análises morfológicas não foram detectados *Haemoproteus* spp. em nenhuma dessas aves. Esse é o primeiro relato do vetor encontrado parasitando aves na literatura. Isso sugere que são necessários novos estudos correlacionando vetores, aves e a transmissão dos hemoparasitos.

Sumário taxonômico

Hospedeiros adicionais: *Columbina talpacoti* e *Leptotila verreauxi* (Columbiformes, Columbidae).

Sequências de DNA: mitocondrial *cyt b* (COLCA 131 e COLCA104 – depósito no GenBank ainda não realizado).

Local de infecção: eritrócitos maduros.

Prevalência: 34,21% (n=26/76), sendo 32,89% (n=25/76) na espécie *C. talpacoti* e 0,07% na espécie *L. verreauxi* (n=1/13).

Distribuição geográfica adicional: Mata Atlântica, Zona da Mata mineira, Minas Gerais, Brasil.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi identificado o hemosporídeo *H. paramultipigmentatus* previamente descrito em *Columbina passerina socorroensis* no México e registrado em *Ptilinopus pulchellus* na Nova Guiné (VALKIŪNAS *et al.* 2013). Esse é o primeiro registro dessa espécie no Brasil e nessas espécies de hospederios (*Columbina talpacoti* e *Leptotila verreauxi*). O trabalho revela também alta taxa de prevalência por *Haemoproteus* spp. se comparado com estudos anteriores (tabela 3), esses estudos indicam a ausência de padrão nas taxas de prevalência e parasitemia, com grande variação entre as espécies de hospedeiros, espécies de *Haemoproteus* e locais de estudo.

Foram detectadas diferenças morfológicas entre a população original de *H. paramultipigmentatus* e aquela apresentada neste estudo (Tabela 2). Sobre essas diferenças podemos citar área média dos microgametócitos $30,74\mu\text{m}$ ($\pm 5,05$), área média dos eritrócitos parasitados por macrogametócitos $61,79\mu\text{m}$ ($\pm 5,90$), comprimento médio do núcleo do eritrócito $1,71\mu\text{m}$ ($\pm 0,45$), no estudo feito no México local onde o parasito foi descrito essas medidas correspondem a $36,8\mu\text{m}$ ($\pm 3,6$), $63,30\mu\text{m}$ ($\pm 4,90$), $2,30\mu\text{m}$ ($\pm 0,3$), respectivamente. Além das citadas anteriormente podemos também citar: em gametócitos jovens foram observados a presença de vacúolos e o número de pigmentos menor. Macrogametócitos e microgametócitos tocando o núcleo e a parede do eritrócito ao mesmo tempo. Características como citoplasma homogêneo, ausência de volutina, espaços entre o núcleo do eritrócito e a região polar do parasito, quantidade média de pigmentos em macrogametócitos e microgametócitos, presença de vacúolos e deslocamento lateral do núcleo do eritrócito corroboram com a descrição original. Essas características permitiram identificar morfológicamente a espécie. Portanto, a população de

H. paramultipigmentatus encontrada nas aves da Mata Atlântica possuem grande similaridade morfológica com população original descrita no México por VALKIŪNAS *et al.* (2013). Segundo VALKIŪNAS *et al.* (2013) é surpreendente que *H. paramultipigmentatus* não tenha sido encontrado previamente, visto sua conspícua morfologia e que possa ter distribuição tropical o que ressalta necessidade de estudos em diferentes regiões e com diferentes hospedeiros. Essas variações morfológicas podem ser explicadas por diferenças de localidade e hospedeiro (MARTINSEN *et al.*, 2006). Estudos sugerem que a alta diversidade de hospedeiros e heterogeneidade de ambientes é uma fonte de nichos nos quais os parasitos podem se especializar e divergir (LACORTE *et al.*, 2013). No trabalho feito por MERINO *et al.* (2012), em fragatas foi encontrado *H. iwa* e diferenças morfológicas foram observadas em relação a descrição original e também atribuídas ao fato de ser em hospedeiros diferentes ou infecção mista. Essa segunda opção foi descartada no presente estudo devido à ausência de infecções mistas. As vantagens do estudo morfológico são baixo custo, rapidez no diagnóstico e quantidade de caracteres analisados (VALKIŪNAS, 2005). Além disso, pode-se ressaltar também a importância para entender o ciclo de vida, patologia e o real impacto desses parasitos em seus hospedeiros (MANTILLA *et al.*, 2016).

No presente estudo foi utilizado *nested*-PCR para amplificar 478 bp do gene mitocondrial (citocromo b) dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. As linhagens encontradas nesse estudo de *H. paramultipigmentatus*, se agruparam em um clado monofilético, com elevado valor de suporte (98/1) em ambos métodos de reconstrução filogenética (ML/BI), respaldando a correta identificação com base na morfologia do parasito. MARTINSEN *et al.* (2006) demonstraram que pequenas distância genéticas encontradas podem ser atribuídas a variações intraespecíficas, interespecíficas ou ambas. As sequências encontradas no presente estudo agruparam-se com as do

trabalho feito por LACORTE *et al.* (2013) que fizeram a primeira caracterização molecular de parasitos da malária no sudeste do Brasil. A sequência do estudo anterior foi identificada como *H. multipigmentatus*, porém nenhuma análise morfológica foi realizada. Uma única ou poucas diferenças de pares de bases no gene mitocondrial citocromo b podem mascarar a existência de espécies crípticas (MARTINSEN *et al.*, 2006). Nosso estudo confirma ainda a separação do gênero *Haemoproteus* em dois subgêneros, *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus* sendo o primeiro contendo espécies que infectam aves Columbiformes e o segundo contendo espécies que infectam outros grupos de aves. Essa afirmativa porém, já vem sendo questionada, conforme apresentado nos trabalhos de MARTINSEN *et al.* (2008) usando diferentes marcadores moleculares, *H. turtur*, parasito de Columbiformes, aparece no clado do subgênero *Parahaemoproteus* e MERINO *et al.*, (2012) que utilizaram abordagens molecular e filogenética mostrando espécies de parasitos pertencentes ao subgênero *Haemoproteus* parasitando aves não Columbiformes. LACORTE *et al.* (2013) encontraram linhagens pertencentes ao subgênero *Haemoproteus* infectando aves pertencentes a família Cuculidae. Isso mostra que parasitos pertencentes ao subgênero *Haemoproteus* não está limitado a Columbiformes (KRIŽANAUSKIENE *et al.*, 2013). Portanto, estudos a respeito dessa divisão ainda são necessários para esclarecer melhor essa questão.

Estudos recentes tem demonstrado que a estação do ano é fator atuante na dinâmica das populações de hemosporídeos em aves silvestres (SANTIAGO-ALARCON *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ-LARA *et al.*, 2017), sendo registrado aumento da prevalência e parasitemia no período chuvoso. Isso porque fatores como temperatura e precipitação permitem o desenvolvimento de insetos dípteros (HAY *et al.*, 2000). Sendo assim, o habitat influencia na intensidade da infecção de hemosporídeos em aves silvestres, aumentando ou diminuindo o

contado entre hospedeiros e vetores (LEITE *et al.*, 2013). Dentre os fatores ecológicos podemos citar: região geográfica, urbanização, comportamento dos hospedeiros e dados climáticos (WILKINSON *et al.*, 2016; HERNÁNDEZ-LARA *et al.*, 2017). Nas regiões tropicais, onde as condições ambientais são mais estáveis, os vetores possuem elevada prevalência sobre seus hospedeiros, tal como relatado por AMARAL *et al.* (2013) (93,5%), o que facilita manutenção das infecções por hemossporídios. Entretanto, HERNÁNDEZ-LARA *et al.* (2017) sugerem que a agregação dos parasitos independe das estações do ano. No presente estudo, foi observada maior prevalência parasitária na estação chuvosa, tal como relatado previamente na literatura, entretanto, foram registrados menores valores de parasitemia e agregação no período chuvoso, discordando da literatura. Uma possível explicação pode ser a concentração da população de parasitos da espécie *H. paramultipigmentatus* no período de seca em número menor de hospedeiros, o que justifica baixa prevalência e as elevadas taxas de parasitemia e agregação, visto menor abundância dos vetores disponíveis para disseminar a doença/parasito neste período. Outro fato importante é o comportamento agregado de Columbiformes. Segundo ADRIANO & CORDEIRO (2001) aves Columbiformes exibem formação de pares ou em grupos, principalmente durante forrageamento, o que favorece disseminação dos vetores Hippoboscidae. TELLA (2002) demonstrou que aves que vivem em grupos ou em pares tem maior riqueza de hemoparasitos, tanto em número de espécies quanto em número de gêneros. A urbanização tem sido relatado como importante fator de aumento da prevalência por hemossporídios de aves silvestres (HERNÁNDEZ-LARA *et al.*, 2017), o que corrobora dados registrados neste estudo em fragmentos de Mata Atlântica secundária próximos a áreas urbanas.

No presente estudo foram utilizadas técnicas de morfologia para identificação dos parasitos e molecular para identificação genética dos mesmos, além de análises filogenéticas e ecológicas.

A dificuldade de estabelecer grau de divergência se deve ao fato de que dados sobre *H. paramultipigmentatus* datam a partir de 2013, dificultando a correta identificação da espécie tal como ocorreu no estudo de LACORTE *et al.* (2013). OUTLAW & RICKLEFS, 2014 discutiram sobre o conceito de espécie em Haemosporida, afirmando que a delimitação das mesmas ajuda na compreensão da diversidade e especiação parasitária. Eles mostraram que delimitar uma espécie tornou-se complicado a medida que novas linhagens foram surgindo utilizando apenas abordagem molecular. VALKIŪNAS (2005) define espécie morfológica baseado em similaridade e diferenças de morfologia observadas. MARTINSEN *et al.* (2006) defini espécie genética baseado na taxa de proximidade genética (similaridade ou divergência) e espécie filogenética baseada em monofilia do grupo. No entanto há poucos estudos sobre esses organismos abordando o consenso entre esses três conceitos de espécie (OUTLAW & RICKLEFS, 2014). Sendo assim, cada pesquisador usa uma métrica para definir espécie. Como exemplo, MERINO *et al.* (2012) descreveu *Haemoproteus valkiūnasi* baseado em caracteres morfológicos apesar de ser geneticamente igual a *H. iwa*. Em VALKIŪNAS (2005) há 132 espécies de *Haemoproteus* descritas morfológicamente, em contrapartida, há mais de 2000 linhagens identificadas (MalAvi). Essa falta de critério pode gerar uma subestimação da diversidade de espécies ou uma superestimação das mesmas. Estudos baseados em comparações de morfoespécies propõem que sejam utilizados 5% de divergência no *cyt b* aliados com análises morfológicas. Uma outra proposta feita por OUTLAW & RICKLEFS (2014) seria usar múltiplos marcadores para concordância filogenética. Assim, para as aves amostradas no presente estudo *H. paramultipigmentatus* foi considerada uma única espécie de acordo com os conceitos morfológicos, genéticos e filogenéticos. Sendo registrada pela primeira vez no Brasil e nessas espécies de hospedeiros. Portanto, o uso integrado de ferramentas diversas como, molecular,

morfológica, filogenética e ecológica constitui melhor modelo para estudo taxonômico de Haemosporida para melhor precisão das identificações e real conhecimento da diversidade de Haemosporida.

Tabela 3. Dados de prevalência e parasitemia de *Haemoproteus* spp em espécies de aves Columbiformes.

Espécie de <i>Haemoproteus</i>	Espécies de aves Columbiformes	N amostral	Prevalência %	Parasitemia %	Referências
	<i>Chalcophaps indica</i>	6	0	0	SILVA- ITURRIZA, <i>et al.</i> , 2012
	<i>Phapitreron leucotis</i>	4	0	0	SILVA- ITURRIZA, <i>et al.</i> , 2012
	<i>Macropygia phasianella</i>	1	0	0	SILVA- ITURRIZA, <i>et al.</i> , 2012
<i>H. columbae</i>	<i>Columba livia</i>	50	82	0,15	FORONDA <i>et al.</i> , 2004
	<i>Columbina passerina</i>	19	0	0	ASTUDILLO <i>et al.</i> , 2013
<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Columba livia</i>	1	100	-	ASTUDILLO <i>et al.</i> , 2013
	<i>Columba malherbii</i>	14	0	0	AKINPELU, 2008
<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Columba uncinata</i>	22	9,09	2,4	AKINPELU, 2008
<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Streptopelia semitorquata</i>	42	2,38	0,7	AKINPELU, 2008
<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Streptopelia senegalensis</i>	86	11,60	11,60	AKINPELU, 2008
<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Treron australis</i>	20	5	2,75	AKINPELU, 2008
	<i>Turtur brehmeri</i>	6	0	0	AKINPELU, 2008
<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Turtur typanistria</i>	58	3,45	0,7	AKINPELU, 2008
<i>H. sacahrovi</i>	<i>Columbina cruziana</i>	5	20	-	FORRESTES <i>et al.</i> , 1977
<i>H. columbae</i>	<i>Zenaida asiática</i>	2	100	-	FORRESTES <i>et al.</i> , 1977

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo com aves Columbiformes de fragmentos de Mata Atlântica permitem considerar que:

- Esse é o primeiro registro da espécie *H. paramultipigmentatus* no Brasil e também nessas duas espécies de hospedeiros, *Columbina talpacoti*, *Leptotila verreauxi*. Estes dados ressaltam necessidade de se conhecer diversidade de hemosporídeos em aves da Mata Atlântica;
- Os novos dados obtidos para população de *H. paramultipigmentatus* registrada no Brasil demonstra necessidade de se aprofundar no entendimento da plasticidade (variabilidade) morfológica e morfometria das populações de hemosporídeos no hospedeiro vertebrado e de se investigar possíveis causas desta variabilidade, muitas vezes sugeridas nos trabalhos como consequência da diferença de hospedeiro e heterogeneidade de ambientes;
- A taxas de prevalência e parasitemia encontradas neste estudo, consideradas altas em comparação com estudos anteriores, ressaltam necessidade de se investigar em detalhe como e quais fatores ecológicos/ambientais favorecem a disseminação dos vetores e parasitos e, ainda, quais dados do comportamento das aves facilitam transmissão pelos vetores;
- O uso integrado de técnicas morfológicas, moleculares, filogenéticas e ecológicas objetivando caracterização multidisciplinar dos organismos constitui o melhor modelo de estudo taxonômico de Haemosporida, visto a dificuldade de definição de espécie neste grupo com base apenas nas formas que ocorrem no sangue periférico dos hospedeiros.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, A. E. & CORDEIRO, N. S. Prevalence and intensity of *Haemoproteus columbae* in three species of wild doves from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 96, p. 175–178, 2001.
- AKINPELU, A. I.; Prevalence and intensity of blood parasites in wild pigeons and doves (family: Columbidae) from Shasha forest reserve, Ile- Ife, Nigeria. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 3, n. 2, p. 109- 114, 2008.
- AMÂNCIO, S., SOUZA, V. B., MELO, C. & PEDROSO, E. T. Distribuição Comportamental e Diurna de *Columbina talpacoti* (Columbiformes: Columbidae) em Área Urbana, Uberlândia (MG). **Atualidades Ornitológicas** On-line Nº 154, 2010. Disponível em: www.ao.com.br
Acesso em: 05/05/2015.
- AMARAL, H. L. C., BERGMANN, F. B., SILVEIRA, T., SANTOS, P. R. S. & KRÜGER, R. F. *Pseudolynchia canariensis* (Diptera: Hippoboscidae): distribution pattern and phoretic association with skin mites and chewing lice of *Columba livia* (Aves: Columbidae). **Journal of Natural History**. v. 47, p. 2927–2936, 2013.
- ARAGÃO, H. B. Sobre o ciclo evolutivo e a transmissão do *Haemoproteus columbae*. **Revista Médica de São Paulo**, v. 11, n. 20, p. 409-416, 1908.
- ASTUDILLO, V. G.; HERNÁNDEZ, S. M.; KISTLER, W. M.; BOONE, S. L.; LIPP, E. L.; SHRESTHA, S.; YABSLEY, M. J. Spatial, temporal, molecular, and intraspecific differences of haemoparasite infection and relevant selected physiological parameters of wild birds in Georgia, USA. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** v. 2 p. 178–189, 2013.

AVES CATARINENSES, 2017. Disponível através de:
<http://www.avescatarinenses.com.br/animais/1-aves/267-rolinha-roxa>. Acesso em:
23/01/2017.

BARRIENTOS, R.; VALERA, F.; BARBOSA, A.; CARRILLO, C. M.; MORENO, E.
Biogeography of haemoparasites and ectoparasites of an arid-land bird, the Trumpeter
finch. **Journal of Ari Environments**. v. 106, p. 11-17, 2014.

BEADELL, J. S.; COVAS, R.; GEBHARD, C.; ISHTIAQ, F.; MELO, M.; SCHMIDT, B. K.;
PERKINS, S. L.; GRAVES, G. R.; FLEISCHER, R. C. Host associations and evolutionary
relationships of avian blood parasites from West Africa. **International Journal
Parasitology**. v.39, p. 257-266, 2009.

BENNETT, G. F. & CAMPBELL, A. G. Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus
fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. **Canadian Journal of
Zoology**. v. 50, p. 1269–1275, 1972.

BENNETT, G. F.; PEIRCE, M. A.; ASHFORD, R. W. Avian haemoatozoa: Mortality and
pathogenicity. **Journal of Natural History**, v. 27, p. 993–1001, 1993.

BELLO, N. O. **Prevalência e Diversidade de Haemosporida em aves silvestres de diferentes
habitats no Brasil e na Venezuela**. 119f. Tese (Doutorado em Parasitologia) Universidade
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BENSCH, S., STJERNMAN, M., HASSELQUIST, D., OSTMAN, O., HANSSON, B.,
WESTERDAHL, H. & PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: a study
of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings
of the Royal Society of London B**. v. 267, p. 1583–1589, 2000.

- BENSCH S, PÉREZ-TRIS J, WALDENSTRÖM J, HELLGREN O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**. v. 58, p. 1617–1621, 2004.
- BENSCH, S., HELLGREN, O. & PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 1353–1358, 2009.
- BENSCH, S.; CANBÄCK, B.; DEBARRY, J. D.; JOHANSSON, T.; HELLGREN, O.; KISSINGER, J. C.; PALINAUSKAS, V.; VIDEVALL, E.; VALKIŪNAS, G. The genome of *Haemoproteus tartakovskiyi* and its relationship to human malaria parasites. **Genome Biology and Evolution**. doi:10.1093/gbe/evw081 2016.
- BROWN, C. R.; BROWN, M. B. Coloniality in the *Cliff swallow*. The effect of group size on social behavior. **University of Chicago Press**. London, 1996.
- BUSH, A. O., LAFFERTY, K.D., LOTZ, J. M. & SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. **Journal of Parasitology**. v. 83, p. 575–583, 1997.
- CARLSON, J. S., MARTÍNEZ-GÓMEZ, J. E., VALKIŪNAS, G., LOISEAU, C., BELL, D. A. & SEHGAL, R. N. M. J. Diversity and phylogenetic relationships of hemosporidian parasites in birds of Socorro Island, México, and their role in the re-introduction of the socorro dove (*Zenaida graysoni*). **Journal of Parasitology**. v. 99 (2), p. 270–276, 2013.
- CINTRA, R.; ALVES, M. A. S.; CAVALCANTI, R. B. Dieta da rolinha *Columbina talpacoti* (Aves, Columbidae) no Brasil central - comparação entre sexos e idades. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 50, n.2, p. 469- 473, 1990.

- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**. v. 9 (8), p. 772, 2012.
- DURRANT, K. L.; BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; GRAVES, G.R.; OLSON, S. L.; GERING, E.; PEIRCE, M. A.; MILENSKY, C. M.; SCHMIDT, B. K.; GEBHARD, C.; FLEISCHER, R. Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. **Ornithological Monographs**. v. 60, p. 98–111, 2006.
- ESCALANTE, A. A.; FREELAND, D. E.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 95, p. 8124–8129, 1998.
- FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; SILVEIRA, P.; RIBAS, A. C. A.; CAPARROZ, R.; MARINI, M. A. Age, but not sex and seasonality, influence Haemosporidia prevalence in White-banded Tanager (*Neothraupis fasciata*) in Central Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, v. 93:1, p. 71–77, 2015.
- FELDMAN, R. A., L. A. FREED, AND R. L. CANN. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. **Molecular Ecology**. v. 2, p. 663–673, 1995.
- FERRELL, S. T.; SNOWDEN, K.; MARLAR, A. B.; GARNER, M.; LUNG, N. P. Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 38(2), p. 309–316, 2007.
- FORONDA, P.; VALLADARES, B.; RIVERA-MEDINA, J. A.; FIGUERUELO, E.; ABREU N.; CASANOVA, J. C. Parasites of *Columba livia* (aves: Columbiformes) in tenerife (canary islands) and their role in the conservation biology of the laurel pigeons. **Parasite**. v. 11, p. 311–316, 2004.

- FORRESTES, D. J.; GREINER, E. C.; McFARLANE, R. W. Blood parasites of some Columbiform and Passeriform birds from Chile. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 13, n. 1, p. 94- 96, 1977.
- GARCIA-LONGORIA, L.; MOLLER, A. P.; BALBONTÍN, J.; DE LOPE, F.; MARZAL, A. Do malaria parasites manipulate the escape behaviour of their avian hosts? An experimental study. **Parasitology Research**, DOI 10.1007/s00436-015-4693-7, 2015.
- GARNHAM, P. C. C. Distribution of simian malaria parasites in various hosts. **Journal of Parasitology**. v. 49, p. 905–911, 1963.
- GARNHAM, P. C. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, 1114 p, 1966.
- GODFREY, R. D., FEDYNICH, A.M. & PENCE, D.B. Quantification of hematozoa in blood smears. **Journal Wildlife Diseases**. v. 23, p. 558–565, 1987.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematics Biology**. v. 59 (3), p. 307-321, 2010.
- HAY, S. I.; MYERS, M. F.; BURKE, D. S.; VAUGHN, D. W.; ENDY, T.; ANANDA, N.; & ROGERS, D. J. Etiology of interepidemic periods of mosquito-borne disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 97 (16), p. 9335–9339, 2000.
- HELLGREN, O., WALDENSTROM, J., & BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium* and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**. v. 90 (4), p. 797–802, 2004.

- HERNÁDEZ-LARA, C.; GONZÁLEZ-GARCIA, F.; SANTIAGO-ALARCON, D. Spatial and seasonal variation and avian malaria infections in five different land use types within a Neotropical montane forest matrix. **Landscape and Urban Planning**. v. 157, p. 151-160, 2017.
- IEZHOVA, T. A., DODGE, M., SEHGAL, R. N. M., SMITH, T. B. & VALKIŪNAS, V. New Avian *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) From African Birds, with a Critique of the Use of Host Taxonomic Information in Hemoproteid Classification. **Journal of Parasitology**. v. 97 (4), p. 682–694, 2011.
- KARADJIAN, G.; PUECH, M. P.; DUVAL, L.; CHAVATTE, J. M.; SNOUNOU, G.; LANDAU, I. *Haemoproteus syrnii* in *Strix aluco* from France: morphology, stages of sporogony in a hippoboscid fly, molecular characterization and discussion on the identification of *Haemoproteus* species. **Parasite**. v. 20, p. 32, 2013.
- KEESING, F.; OSTFELD, R. S.; EVINER, V. T. Infectious disease ecology: effects of ecosystems on disease and of disease on ecosystems. **New Jersey: Princeton University Press**. 2008.
- KRIŽANAUSKIENE, A.; IEZHOVA, T. A.; SEHGAL, R. N. M.; CARLSON, J. S.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular characterization of *Haemoproteus sacharovi* (Haemosporida, Haemoproteidae), a common parasite of columbiform birds, with remarks on classification of haemoproteids of doves and pigeons. **Zootaxa**, v. 3613 (1), p. 85- 94, 2013.
- KRUSE, W. Ueber Blutparasiten. **Archiv fun Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinnische Medizin**. v. 121, p. 359–372, p. 453–485, 1890.

- LACORTE, G. A.; FÉLIX, G. M. F.; PINHEIRO, R. R. B.; CHAVES, A. V.; NETO, G. A.; NEVES, F. S.; LEITE, L. O.; SANTOS, F. R.; BRAGA, E. M. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. **Plos One**. v. 8(3): e57770. doi:10.1371/journal.pone.0057770, 2013.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; HUMPHREY, P. S. Preliminary survey of blood-parasites of birds of the Area de Pesquisas Ecológicas do Guamá, Belém, Pará, Brasil. **The Journal of Parasitology**, v. 56, p. 197-198, 1970.
- LEITE, Y. F. C.; PINHEIRO, R. T.; BRAGA, E. M. Prevalência de Hemosporídeos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. **Ornithologia**. v. 6(1), p. 1-13, 2013.
- LEVIN, I. I.; VALKIŪNAS, G.; SANTIAGO-ALARCON, D.; CRUZ, L. L.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; HAILER, F.; DEARBORN, D.; SCHREIBER, E. A.; FLEISCHER, R. C.; RICKLEFS, R. E.; PARKER, P. G. Hippoboscid-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: Evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. **International Journal for Parasitology**, v. 41, p. 1019- 1027, 2011.
- LEVIN, I. I.; VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; PARKER, P. G. Novel *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the Swallow Tailed Gull (Lariidae), with Remarks On the Host Range of Hippoboscid Transmitted Avian Hemoproteid. **Journal of Parasitology**. v. 98 (4), p. 847-854, 2012.
- LUCENA, D. Avian malaria, *Plasmodium lutzi* n. sp. Parasites *Aramides cajaneus cajaneus*, Müller (Malaria Aviaria, *Plasmodium lutzi* n. sp. Parasita da saracura *Aramides cajaneus cajaneus*, Müller). **Biological Bulletin**, v. 4: p. 27–31, 1939.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR; BUCHNER, A.; LAI, T.; STEPPI, S.; JOBB, G.; FÖRSTER, W.; BRETTSCHE, I.; GERBER, S.; GINHART, A. W.; GROSS, O.; GRUMANN, S.; HERMANN, S.; JOST, R.; KÖNIG, A.; LISS, T.; LÜSSMANN, R.; MAY, M.; NONHOFF, B.; REICHEL, B.; STREHLOW, R.; STAMATAKIS, A.; STUCKMANN, N.; VILBIG, A.; LENKE, M.; LUDWIG, T.; BODE, A.; SCHLEIFER, K. H. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic acids research**. v. 32 (4), p. 1361-1371, 2004.

MALAVI, (2016). Disponível através de: <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/> Acesso em: 20/08/2016.

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

MARCHIAFAVA, E.; CELLI, A. Weitere Untersuchungen über die Malaria infektion. **Fortschritte der Medizin**., Berlin, v. 3, p. 787–792, 1885.

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

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

- MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 47, 261-273, 2008.
- MARZAL, A.; DE LOPE, F.; NAVARRO, C.; MOLLER, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, v. 142, p. 541-545, 2005.
- MERINO, S.; MORENO, J.; SANZ, J. J.; ARRIERO, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). **Proceedings of the Royal Society**, v. 267, p. 2507-2510, 2000.
- MERINO, S.; HENNICKE, J.; MARTÍNEZ, J.; LUDYNIA, K.; TORRES, R.; WORK, T. M.; STROUD, S.; MASELLO, J. F.; QUILLFELDT, P. Infection by *Haemoproteus* Parasites in Four Species of Frigatebirds and the Description of a New Species of *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v. 98(2), p. 388–397, 2012.
- OUTLAW, D. C; RICKLEFS, R. E. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. **Parasitology** v. 141, p. 1223–1232, 2014.
- PADILLA, L. R.; SANTIAGO-ALARCON, D.; MERKEL, J.; MILLER, R. E.; PARKER, P. G. Survey for *Haemoproteus* spp., *Trichomonas gallinae*, *Chlamydophila psittaci*, and *Salmonella* spp. in galapagos islands Columbiformes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** v. 35(1), p. 60–64, 2004.
- PERKINS, S. L., MARTINSEN, E. S.; FALK, B. G. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. **Parasitology**. v. 138, p. 1664–1674, 2011.
- PERKINS, S. L. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. **Journal of Parasitology** v. 100(1), p. 11–25, 2014.

- POULIN, R. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. **International Journal for Parasitology**. v. 23, p. 937- 944, 1993.
- REICZIGEL, J.; RÓZSA, L. Quantitative Parasitology 3.0. Budapest. Distributed by the authors. Available online at: <http://www.zoologia.hu/qp/qp.html>. , 2005.
- REMPLE, J. D. Intracellular Hematozoa of Raptors: A Review and Update. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 75-88, 2004.
- RICKLEFS, R. E. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 89, p. 4722–4725, doi:10.1073/pnas.89.10.4722, 1992.
- RIDGELY, R.S. & TUDOR, G. **Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines**. University of Texas Press, Austin, 2009.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. V. D.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology** v. 61 (3), p. 539-542, 2012.
- SANTIAGO-ALARCON, D.; OUTLAW, D. C.; RICKLEFS, R. E. & PARKER, P. G. High lineage diversity of Haemosporidian parasites in New World doves: multiple colonization of the Galapagos Islands. **International Journal of Parasitology**, v. 40, p. 463–470, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.003>
- SANTIAGO-ALARCON, D.; BLOCK, R. ROLSHAUSEN, G.; SCHAEFER, H. M.; SEGELBACHER, G. Prevalence, diversity and interaction patterns of avian haemosporidians in a four-year study of blackcaps in a migratory divide. **Parasitology**, 138, 824- 835, 2011.

- SEBAIO, F.; BRAGA, E. M.; BRANQUINHO, F.; MANICA, L. T.; MARINI, M. A. Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds: effects of fragment size and habitat dependency. **Bird Conservation International**, 20, 432–439, 2010.
- SICK, H. Ornitologia Brasileira. **Nova Fronteira**. Rio de Janeiro, 2001.
- SILVA-ITURRIZA, A.; KETMAIER, V.; TIEDEMANN, R. Prevalence of avian haemosporidian parasites and their host fidelity in the central Philippine islands. **Parasitology International**. v. 61, p. 650–657, 2012.
- SIGRIST, T. Avifauna Brasileira. **Avis Brasilis**, São Paulo, 602 p., 2014.
- TELLA, J. L. The evolutionary transition to coloniality promotes higher blood parasitism in birds. **Journal Evolutionary Biology**, 15, 32–41, 2002.
- VALKIŪNAS, G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. **CRC Press**. Boca Raton, FL, USA, 2005.
- VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., KRIŽANAUSKIENĖ, A., PALINAUSKAS, V., SEHGAL, R.N.M. & BENSCH, S. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. **Journal of Parasitology**, 94, 1395–1401, 2008.
- VALKIŪNAS, G., SANTIAGO-ALARCON, D., LEVIN, I. I., IEZHOVA, T. A. & PARKER, P. G. A New *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the Endemic Galapagos Dove *Zenaida galapagoensis*, with Remarks on the Parasite Distribution, Vectors, and Molecular Diagnostics. **Journal of Parasitology**, 96 (4), 783–792, 2010.
- VALKIŪNAS, G., IEZHOVA, T. A., EVANS, E., CARLSON, J. S., MARTÍNEZ GÓMEZ, J. E. & SEHGAL, R. N. M. Two New *Haemoproteus* Species (Haemosporida: Haemoproteidae) from Columbiform Birds. **Journal of Parasitology**, 99 (3), 513–521, 2013.

- VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; DIMITROV, D.; BERNOTIENĖ, R.; ZEHTINDJIEV, P.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T. A. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. **Parasitology Research** DOI 10.1007/s00436-014-3880-2, 2014.
- VITTOR, A. Y.; GILMAN, R. H.; TIELSCH, J.; GLASS, G.; SHIELDS, T.; LOZANO, W. S.; PINEDO-CANCINO, V.; PATZ, J. The effect of deforestation on the human rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum* malaria in the Peruvian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 74, p. 3–11, 2006.
- WILKINSON, L. C.; HANDEL, C. M.; HEMERT, C. V.; LOISEAU, C.; SEHGAL, R. N. M. Avian malaria in a boreal resident species: long-term temporal variability, and increased prevalence in birds with avian keratin disorder. **International Journal for Parasitology**, 46 (4), 281-290, 2016.
- ZHANG, Y.; WU, Y.; ZHANG, Q.; SU, D.; ZOU, F. Prevalence Patterns of Avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* Parasites and the Influence of Host Relative Abundance in Southern China. **PlosOne**. v. 9(6), p. e99501. doi:10.1371/journal.pone.0099501, 2014.

Anexo 1. Imagem de gel de agarose a 2% demonstrando os produtos da amplificação de um fragmento do gene citocromo b de *Haemoproteus* spp. por *nested* PCR. 1. padrão; 2 controle negativo; 3, 4 amostras positivas; 5-6 amostras não amplificadas, 7-8 controles positivos (*P. galinaceum*).

