

**Universidade Federal de Juiz de Fora**  
**Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**Mestrado em Comportamento e Biologia Animal**

Talys Henrique Assumpção Jardim

**ESPECIFICIDADE, DIVERSIDADE E DINÂMICA PARASITÁRIA DA  
MALÁRIA AVIÁRIA EM HOSPEDEIROS DA SUPERFAMÍLIA  
FURNARIOIDEA COM BASES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES**

Juiz de Fora

2019

**Talys Henrique Assumpção Jardim**

**ESPECIFICIDADE, DIVERSIDADE E DINÂMICA PARASITÁRIA DA  
MALÁRIA AVIÁRIA EM HOSPEDEIROS DA SUPERFAMÍLIA  
FURNARIOIDEA COM BASES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Marta D'Agosto

**Coorientador:** Prof<sup>º</sup> Roberto Dias

Juiz de Fora, fevereiro de 2019

Talys Henrique Assumpção Jardim

**ESPECIFICIDADE, DIVERSIDADE E DINÂMICA PARASITÁRIA DA MALÁRIA  
AVIÁRIA EM HOSPEDEIROS DA SUPERFAMÍLIA FURNARIOIDEA COM  
BASES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre

**APROVADO EM:** 27, Fevereiro de 2019

**BANCA EXAMINADORA:**

*Maristela Peckle Pereira*

Profª. Drª. Maristela Peckle

*M. Rossi*

Profª. Drª. Mariana Rossi

*Roberto Dias*

Profª. Dr. Roberto Dias

*Marta D'Agosto*

Profª. Drª. Marta D'Agosto

Juiz de Fora

2019

Jardim, Talys H A.

ESPECIFICIDADE, DIVERSIDADE E DINÂMICA PARASITÁRIA DA MALÁRIA AVIÁRIA EM HOSPEDEIROS DA SUPERFAMÍLIA FURNARIOIDEA COM BASES PARASITOLÓGICAS E MOLECULARES : MALÁRIA EM AVES SILVESTRES DA SUPERFAMÍLIA FURNARIOIDEA / Talys H A Jardim. -- 2019. 45 p. : il.

Orientadora: Marta Dagosto  
Coorientador: Roberto Dias  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2019.

1. Plasmodium. 2. Hemoparasitos. 3. Biodiversidade. I. Dagosto, Marta , orient. II. Dias, Roberto, coorient. III. Título.

*“O conhecimento nos faz responsáveis”*

Che Guevara

## AGRADECIMENTOS

À Professora **Marta D'Agosto**, pela grande oportunidade de aprender.

Ao Professor **Roberto Dias**, pela paciência, prontidão e compromisso.

À minha amada, **Gabriela Porto**, pelo companheirismo na profissão e na vida.

Aos amigos do **LabProto**, em especial **Luisa de Oliveira** e **Gláuber Barino**, pelas horas cedidas quando mais precisei.

À **UFJF**, por me tornar um cidadão, estimulando uma formação crítica, ética e fraterna.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal** pela oportunidade.

À **FAPEMIG**, pelo apoio financeiro do projeto PPM 00734-16.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo financiamento do projeto.

E agradeço especialmente ao Professor **Érik Daemon**, pelo incentivo incondicional e pelos ensinamentos sempre oportunos.

## RESUMO

Doenças como a malária aviária são um dos grandes empecilhos para o sucesso das espécies hospedeiras. Seu impacto pode gerar consequências negativas sobre as populações de aves, alterar a dinâmica populacional, abundância relativa, dispersão, diversidade genética e na estrutura de comunidade. Os parasitos do gênero *Plasmodium* são os causadores da malária aviária. Possuem uma ampla distribuição no globo, com sua maior diversidade nos trópicos. Sabendo do potencial devastador que a malária aviária possui sobre as populações naturais de aves, este estudo tem como objetivo investigar a diversidade de *Plasmodium* que ocorre nas aves da superfamília Furnarioidea, aves endêmicas da América do Sul que encontram no Brasil seu grande centro de riqueza de espécies, buscando entender a dinâmica parasitária (prevalência, parasitemia e agregação) e as relações de especificidade com os hospedeiros e distribuição geográfica deste parasito. Através de estudos em microscopia para investigar a diversidade das espécies; estudos em biologia molecular e filogenéticos para recuperar as relações evolutivas; e com modernas ferramentas de bioinformática para a delimitação computacional de espécies; adicionamos cinco novas linhagens do gene *cytb* de *Plasmodium*. Também mostramos que uma parte significativa da população de aves está parasitada (prevalência média = 12%) e que essas infecções, em sua maioria, ocorrem em baixa intensidade (parasitemia média = 0,045) e de forma agregada (ID = 0,941), indicando que se trate na maioria dos casos de infecções crônicas ou desenvolvimento abortivo dos parasitos. Recuperamos através da delimitação computacional de espécies pelo método MPTP, 17 unidades evolutivas de *Plasmodium* ocorrendo nos hospedeiros de Furnarioidea, revelando grande diversidade destes parasitos. Reafirmamos a grande plasticidade de *Plasmodium*, com suas linhagens mostrando inespecificidade em relação às cinco famílias dos hospedeiros, sugerindo a capacidade de trocar de hospedeiros com sucesso durante seu processo evolutivo. Revelamos a ampla distribuição geográfica de *Plasmodium*, mostrando que espécies globalmente difundidas, como *P. relictum* e com alto potencial patogênico, como *P. gallinaceum* estão ocorrendo nessas aves endêmicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Plasmodium*; parasitos; biodiversidade; endemismo; delimitação computacional de espécies;

## ABSTRACT

Diseases such as avian malaria are one of the major obstacles to the success of host species. Its impact can have negative consequences on bird populations, change population dynamics, relative abundance, dispersal, genetic diversity and community structure. Parasites of the genus *Plasmodium* are the cause of avian malaria. They have a wide distribution in the globe, with their greater diversity in the tropics. Knowing the devastating potential that avian malaria has over natural bird populations, this study aims to investigate the diversity of *Plasmodium* that occurs in the birds of the superfamily Furnarioidea, endemic birds of South America that find in Brazil its great wealth center of species, trying to understand the parasitic dynamics (prevalence, parasitemia and aggregation) and the specificity relations with the hosts and geographic distribution of this parasite. Through microscopy studies to investigate the diversity of species; studies in molecular biology and phylogenetics to recover evolutionary relationships; and with modern bioinformatics tools for the computational delimitation of species; we added five new lines of the *Plasmodium* cytb gene. We also show that a significant part of the bird population is parasitized (mean prevalence = 12%) and that these infections mostly occur at low intensity (mean parasitemia = 0.045) and in aggregate form (ID = 0.941), suggesting that in most cases of chronic infections or abortive development of the parasites. We recovered through the computational delimitation of species by the MPTP method, 17 evolutionary units of *Plasmodium* occurring in the hosts of Furnarioidea, revealing a great diversity of these parasites. We reaffirm the great plasticity of *Plasmodium*, with its lineages showing in specificity in relation to the five host families, suggesting the ability to change host successfully during its evolutionary process and the wide geographical distribution of *Plasmodium*, showing that globally widespread species such as *P. relictum* and with high pathogenic potential, such as *P. gallinaceum* are occurring in these endemic birds.

**KEY-WORDS:** *Plasmodium*; parasites; biodiversity; endemism; computational delimitation of species;

## RESUMO COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Doenças como a malária aviária são um dos grandes empecilhos para o sucesso das espécies hospedeiras. Seu impacto pode gerar consequências negativas sobre as populações de aves, alterar a dinâmica populacional, abundância relativa, dispersão, diversidade genética e a estrutura de comunidade. Os parasitos do gênero *Plasmodium* são os causadores da malária aviária. Possuem uma ampla distribuição no globo, com sua maior diversidade nos trópicos. Esses parasitos tem a maior parte de suas espécies associadas aos Passeriformes, sendo registrados em mais de 500 espécies de hospedeiros. Um dos grupos com potencial para abrigar estes parasitos são as aves da Superfamília Furnarioidea, aves endêmicas da América do Sul, que encontram no Brasil seu grande centro de riqueza de espécies. Esse grupo comporta aves com diferentes especializações ecológicas e comportamentais e, em comum, compartilham o tipo de ninho: os ninhos em forma de fumaça. Sabendo do potencial devastador que a malária aviária possui sobre as populações naturais de aves, este estudo tem como objetivo investigar a diversidade de *Plasmodium* que ocorre nas aves da superfamília Furnarioidea, buscando entender a dinâmica parasitária (prevalência, parasitemia e agregação) e as relações de especificidade com os hospedeiros e distribuição geográfica deste parasito. Através de estudos em microscopia e biologia molecular e com modernas ferramentas de bioinformática adicionamos cinco novas linhagens do gene *cytb* de *Plasmodium*. Mostramos que uma parte significativa da população de aves parasitada e que essas infecções, em sua maioria, ocorrem em baixa intensidade e de forma agregada. Reafirmamos a grande plasticidade de *Plasmodium*, com suas espécies mostrando inespecificidade em relação às famílias dos hospedeiros, sugerindo a capacidade de trocar de hospedeiros com sucesso durante seu processo evolutivo e a considerável ocorrência dessa doença, mostrando que espécies globalmente difundidas e com alto potencial patogênico estão ocorrendo nessas aves endêmicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Plasmodium*; parasitismo; biodiversidade; endemismo; doenças de aves;

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1:** Aves da superfamília Furnarioidea coletadas no Jardim Botânico da Universidade Federal Juiz de Fora; A e B – Dendrocolaptídeos; C e D – Furnarídeos; E – Xenopidae; A – *Xiphorhynchus fuscus*; B- *Lepidocolaptes angustirostris*; C – *Philydor rufum*; D – *Furnarius figulus*; E – *Xenops rutilans*.....página 15

**FIGURA 2:** Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium*: Parte superior no vetor; Parte inferior nas aves hospedeiras; I, II - merogonia exoeritrocitária primária; III – merogonia eritrocítica; IV - merogonia exoeritrocitária secundária; 1 - esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoíto em macrófagos; 5, 6 - metacriptozoítos; 7 - merozoitos no eritrócitos; 8 - gametócitos; 9 - merozoíto em eritrócitos; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoito em células endoteliais de vasos capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoitos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogametócito; 18 - exflagelação de microgametócitos; 19 - fertilização do macrogametócito; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Figura adaptada de VALKIUNAS (2005).....página 18

**FIGURA 3:** Fotomicrografias das formas evolutivas de *Plasmodium* spp. encontradas; A-F trofozoítos; G-M- merontes;. N-S macrogametócito; T-Z microgametócitos. Barra: 10 µm.....página 29

**FIGURA 4:** Árvore filogenética de *Plasmodium* inferida por análise de máxima verossimilhança. Os valores próximos aos nós representam os valores de bootstrap. Os clados formados entre as linhagens obtidas neste estudo e as morfoespécies destacam-se em cinza. As linhagens obtidas neste estudo estão destacadas em negrito e com uma estrela. As morfoespécies destacam-se em vermelho. Barra representa 4 substituições por posições de 100 nucleotídeos.....página 31

**FIGURA 5:** Árvore filogenética de *Plasmodium* inferida por análise de máxima verossimilhança mostrando em círculos coloridos a relação de inespecificidade das linhagens com a família dos hospedeiros. Rosa – Furnariidae; Azul – Dendrocolaptidae; Verde – Formicariidae; Amarelo – Xenopidae.....página 33

**FIGURA 6:** Mapas de distribuição geográfica das espécies de *Plasmodium* onde foram delimitadas, através do MPTP, as linhagens obtidas neste estudo. Destaca-se a ampla ocorrência das espécies de parasitos que parasitam Furnarioidea. Em amarelo a distribuição da linhagem LEPANG07 delimitada com *P. cathemerium*; Em verde as linhagens LEPQUA01 e SITGRI02 delimitadas como as espécies *P. tejerai*, *P. matutinum* e *P. luzzi*; Em azul a linhagem LOCNEM01 delimitada como *P. nucleophilum*; e em vermelho a linhagem XIPFUS01 que não foi relacionada a nenhuma morfoespécie descrita.....página 34

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1:** Classificação taxonômica do gênero *Plasmodium*, segundo VALKIUNAS (2018).....página 16
- TABELA 2:** Localização geográfica, informações ambientais dos locais amostrados na Zona da Mata de Minas Gerais e quantidade de aves coletadas em cada local.....página 24
- TABELA 3:** Espécies da superfamília Furnarioidea coletados e seu número amostral.....página 25
- TABELA 4:** Número de indivíduos coletados em cada família de aves e suas respectivas prevalências médias, parasitemia média e agregação parasitária.....página 30

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	página 7
<b>ABSTRACT</b> .....	página 8
<b>RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	página 9
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	página 14
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	página 21
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	página 23
Área de estudo e obtenção das amostras.....	página 23
Análises dos dados .....	página 26
Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento. ....	página 26
Análise filogenética .....	página 27
Delimitação computacional de espécies.....	página 27
<b>RESULTADOS</b> .....	página 28
Prevalência, Parasitemia e Agregação.....	página 28
Posição filogenética dos Parasitos .....	página 28
Delimitação computacional das espécies de <i>Plasmodium</i> .....	página 32
Inespecificidade e distribuição das espécies de parasitos.....	página 32
<b>DISCUSSÃO</b> .....	página 35
Dinâmica parasitária.....	página 35
Dados moleculares.....	página 36
Especificidade e Distribuição.....	página 36
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	página 38
<b>REFEÊNCIAS</b> .....	página 39

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, são mais de 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais (RENCTAS, 2017) espalhadas nos seis biomas terrestres e nos três grandes ecossistemas marinhos. Dentre as espécies de animais, as aves representam o segundo maior táxon em número de espécies registradas, totalizando 1.919 espécies, distribuídas em 33 ordens, 103 famílias e 705 gêneros (PIACENTINI et al., 2015).

A Mata Atlântica é reconhecidamente um dos grandes centros de riquezas de aves no mundo, estima-se que abrigue em torno de 891 espécies (FIGUEIREDO, 2014). Dentro dessa grande riqueza alguns grupos se destacam em relação endemismo, atualmente esse bioma conta com 27 gêneros e 213 espécies que só ocorrem nele (SICK 1997; CBRO, 2015). A ordem com maior riqueza de espécies é a dos Passeriformes, onde está inserida a Superfamília Furnarioidea GRAY, 1840 (**FIGURA 1**). Esse grupo é monofilético (MOYLE, 2009) e está distribuído restritamente pelas Américas, ocorrendo em todos os tipos de biomas desses continentes, desde ambientes como restinga, até densas florestas como na Amazônia (DERRYBERRY, 2010).

A superfamília Furnarioidea é composta por cinco famílias (CBRO 2015): Dendrocolaptidae Gray, 1840 (**FIGURA 1 A-B**), Formicariidae Gray, 1840, Furnariidae Gray, 1840 (**FIGURA 1 C-D**), Scleruridae Swainson, 1827, e Xenopidae Bonaparte, 1854 (**FIGURA 1 E**). Dendrocolaptidae e Xenopidae são popularmente conhecidos como arapaçús, são arbustófilos ocorrendo principalmente em florestas tropicais de planície, em sua maioria monogâmicos, e não sociais com sua dieta basicamente insetívora (DICKINSON, 2003; MARANTZ et al. 2003;). Furnariidae é a família com maior diversidade de táxons dentro de Furnarioidea e sua biologia é semelhante a das famílias Formicariidae e Scleruridae. Essas famílias incluem aves que ocupam desde o estrato baixo em campos abertos até aves que forrageiam no dossel florestal (SICK, 1997). Sua alimentação consiste de invertebrados, artrópodes, moluscos e pequenos vertebrados (SIBLEY & AHLQUIST, 1990; SICK, 1997). Normalmente formam casais e bandos mistos de forrageio e constroem suntuosos ninhos como os feitos pelos gêneros *Furnarius* e *Synallaxis* ou nidificam em cavidades no solo como o gênero *Geopsitta* (REMSEM, 2003).



**FIGURA 1:** Aves da superfamília Furnarioidea coletadas no Jardim Botânico da Universidade Federal Juiz de Fora; A e B – Dendrocolaptídeos; C e D – Furnarídeos; E – Xenopidae; A – *Xiphorhynchus fuscus*; B- *Lepidocolaptes angustirostris*; C – *Philydor rufum*; D – *Furnarius figulus*; E – *Xenops rutilans*.

As populações de aves têm nas infecções causadas por parasitos grandes empecilhos para o sucesso. Quando parasitados esses animais podem ser mais susceptíveis à predação, sofrem com a redução da habilidade de estabelecer territórios, de obter alimentos e manutenção da massa corporal (ATKINSON, 2008). Em ambientes estáveis, onde os parasitos e hospedeiros coexistem ao longo do tempo espera-se que haja uma relação especificidade parasitária, onde essas infecções tendem a ser menos prejudiciais (RICKLEFS, 2004). Uma vez que novos parasitos colonizem novas áreas e hospedeiros as infecções tendem a ser mais agudas e severas, dada à ausência da memória imunológica do sistema defesa dos hospedeiros aos novos patógenos (POULIN, 1993).

Entre as parasitoses que acometem as aves, uma das mais importantes são as hemosporidioses, entre elas destaca-se a malária aviária. Transmitida por mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* e *Culiseta* (GARNHAM 1980, VALKIUNAS 2005), é causada por parasitos do gênero *Plasmodium* (Apicomplexa, Haemosporida, Plasmodidae). Parasitam aves desde rapinantes como Strigiformes e Falconiformes, migratórias como Anseiriformes e ocorre com grande diversidade como nos Passeriformes. Esses parasitos são encontrados em aves nos mais diversos habitats dispersos por todo o globo, não sendo registrados ainda somente em áreas árticas pela ausência de vetores.

São utilizados diversos caracteres para delimitar espécies *Plasmodium* como a morfologia, o ciclo de vida, os hospedeiros, aspectos ecológicos e comportamentais (GARNHAM, 1966), e nos últimos 15 anos, a identificação por meio da biologia molecular. As características morfológicas são observadas por meio de microscopia óptica, tendo um limite de resolução e sendo limitada pelas formas encontradas naquele momento no esfregaço. Esse tipo de identificação leva em conta somente a fase eritrocitária do parasito: medidas morfométricas como largura e comprimento e a forma de seus gametócitos, trofozoítos e esquizontes; o quanto desloca o núcleo do eritrócito e a quantidade e forma de grânulos de hemozoína (VALKIUNAS, 2018).

O gênero *Plasmodium* junto com os gêneros *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, no banco de dados Malavi (BENSCH, 2009) possuem registros de 3.132 diferentes linhagens em 1.561 hospedeiros, nas mais diversas ordens de aves em todo o globo, exceto Antártida. *Plasmodium* possui 55 espécies morfológicamente descritas (VALKIUNAS, 2018), divididas em cinco subgêneros: *Bennettinia*, *Giovannolaia*, *Haemamoeba*, *Huffia* e *Novyella*.

**TABELA 1:** Classificação taxonômica do gênero *Plasmodium*, segundo VALKIUNAS (2018):

Reino: Protista (Haeckel, 1866)

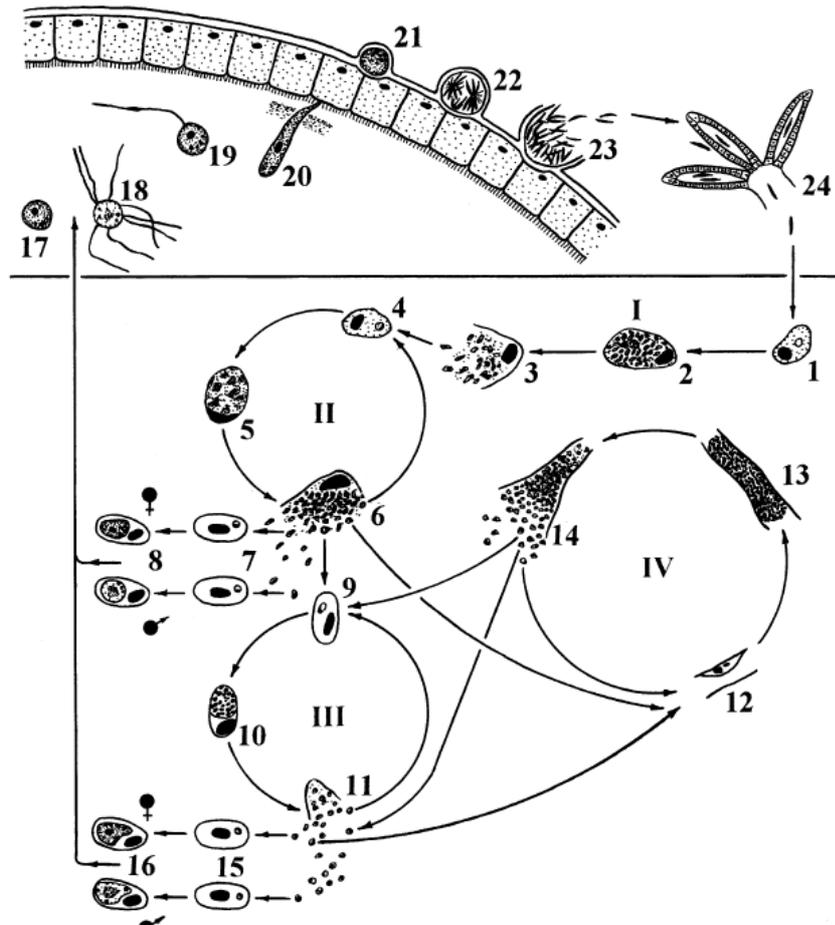
Filo: Apicomplexa Levine, 1970

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)

Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família: Plasmodiidae



**FIGURA 2:** Representação esquemática do ciclo de vida de *Plasmodium relictum*: Parte superior no vetor; Parte inferior nas aves hospedeiras: I, II - merogonia exoeritrocitária primária; III – merogonia eritrocítica; IV - merogonia exoeritrocitária secundária; 1 - esporozoíto em células endoteliais; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoíto em macrófagos; 5, 6 - metacriptozoítos; 7 - merozoítos no eritrócitos; 8 - gametócitos; 9 - merozoíto em eritrócitos; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoíto em células endoteliais de vasos capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogametócito; 18 - exflagelação de microgametócitos; 19 - fertilização do macrogametócito; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Figura adaptada de VALKIUNAS (2005).

Grande parte do conhecimento sobre *Plasmodium* foi adquirido por meio da caracterização dos parasitos durante as fases do ciclo no sangue periférico do hospedeiro vertebrado, porém o ciclo de vida destes parasitos é mais complexo. O ciclo de vida de *Plasmodium* é obrigatoriamente heteróxico, realizando sua fase sexuado no vetor e a fase assexuada nas aves. Segundo VALKIUNAS (2005) e GARNHAM (1966) o ciclo da malária aviária ocorre da seguinte forma (**FIGURA 2**): durante o repasto sanguíneo dos vetores os esporozoítos de *Plasmodium*, presentes na glândula salivar do vetor, são inoculados nas aves e invadem as células endoteliais e mononucleares dando origem à primeira geração de meronte (**FIGURA 2 I-II**). Esta fase ocorre principalmente em órgãos vitais como pulmão, baço, fígado e medula óssea e libera grande quantidade de merozoítos. Esses são capazes de infectar os eritrócitos circulantes dando origem aos trofozoítos, podendo se desenvolver esquizontes (**FIGURA 2 IV**), reiniciando a infecção, ou em sua fase sexuada, os gametócitos (**FIGURA 2 III**).. Quando ingeridos pelo vetor durante o repasto, os gametócitos iniciam o processo de gametogênese. O macrogametócito modifica sua forma em macrogametas ovalados, enquanto que o microgametócito forma flagelos, a exflagelação. A fertilização ocorre no intestino do vetor zigoto se transforma em um oocineto móvel que atravessa a membrana peritrófica do intestino. Durante o processo de deslocamento esse oocineto sofre esporogonia e dá origem aos esporozoítos, corpos unicelulares alongados, os esporozoítos, que quando maduros, rompem a membrana do oocineto e penetram nas glândulas salivares do vetor, onde são inoculados nas aves.

Dados da literatura mostram que hospedeiros parasitados por *Plasmodium* podem ser mais susceptíveis à predação, sofrerem com a redução da habilidade de estabelecer territórios, de obter alimentos e manutenção da massa corporal (ATKINSON, 2000). Existe grande variação nos sintomas da malária aviária, desde indivíduos assintomáticos até casos graves onde o óbito ocorre rapidamente (ATKINSON, 2008). Existem casos em que as aves podem permanecer infectadas por toda a vida, resistindo a recaídas periódicas que são controladas por interações complexas entre a resposta imune do hospedeiro e o estresse fisiológico (ATKINSON & VAN RIPER, 1991), sendo essa fase de infecção crônica difícil de ser detectada através do exame de esfregaços sanguíneos.

Segundo GARNHAM (1966) existe uma relação entre a parasitemia e a evolução dos sintomas, onde quanto maior a virulência do parasito mais rápido ele se

desenvolve causando danos ao hospedeiro, normalmente quando o hospedeiro não está habituado a este parasito. Os sintomas comuns de aves com infecções crônicas são letargia, manifestação de sinais de dor, rejeição de alimento, penas eriçadas, cabeças caída e olhos fechados, quando a infecção se desenvolve em sua forma mais aguda pode ocorrer palidez das mucosas, inapetência, regurgitação e morte (ATKINSON et al., 1995).

O impacto da malária aviária sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem influência não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, mas também na abundância relativa, dispersão, diversidade genética e na estrutura de comunidade (GARAMSZEGI, 2005; MARZAL, 2005). Para aves silvestres tais patogenias podem ser devastadoras (ATKINSON, 1991), e casos de mortalidade, declínio populacional e extinção de espécies de aves em decorrência de infecções virulentas, já foram reportados, como o clássico caso da introdução acidental de *Plasmodium relictum*, bem como de seus vetores em Ilhas Havaianas na década de 1980 (VAN RIPER III et al., 1986).

O conhecimento sobre a malária aviária, apesar de importante, ainda é insipiente (VALKIUNAS & IEZHOVA, 2018) e no mundo grande parte dos estudos estão focados em aves domésticas (VALKIUNAS, 2005). No Brasil, houve um aumento considerável nos estudos desta área (BRAGA, 2011) e a maioria desses são estudos de diagnóstico e investigações sobre diversidade em aves silvestres. Após a revisão publicada por BRAGA (2011) sobre a malária aviária no Brasil, novos estudos foram publicados, como VANSTREELS (2014, 2015, 2016, 2017) em estudos com diversidade e patologia em pinguins, TOSTES (2015, 2018) em estudos de diversidade hemsporídeos em rapinantes e passeriformes, FECCHIO (2011 2012, 2017, 2018) investigou a ecologia e filogeografia de *Plasmodium*, SEBAIO (2012) a diversidade destes parasitos na Mata Atlântica, BELO (2011) comparou a prevalência em áreas urbanas e florestais, FERREIRA-JÚNIOR (2017) realizou análises sobre o gradientes ambientais e prevalência e SVENSSON-COELHO (2013) investigou a diversidade, filogenia e ecologia de *Plasmodium* na Amazônia.

## INTRODUÇÃO

Na natureza as infecções causadas por parasitos são um dos grandes empecilhos para o sucesso das espécies hospedeiras. Quando parasitados esses animais podem ser mais susceptíveis à predação, sofrem com a redução da habilidade de estabelecer territórios, de obter alimentos e manutenção da massa corporal (ATKINSON, 2000). Em ambientes estáveis, onde os parasitos e hospedeiros coexistem ao longo do tempo espera-se que haja uma relação especificidade parasitária, onde essas infecções tendem a ser menos prejudiciais (RICKLEFS, 2004). Uma vez que novos parasitos colonizem novas áreas e hospedeiros as infecções tendem a ser mais agudas e severas, dada à ausência da memória imunológica do sistema defesa dos hospedeiros aos novos patógenos (POULIN, 1993).

A malária aviária é uma das patologias conhecidas mais prejudiciais para as aves (VALKIUNAS, 2005). O impacto da malária aviária pode gerar consequências negativas sobre as populações de aves, na dinâmica populacional, abundância relativa, dispersão, diversidade genética e na estrutura de comunidade (GARAMSZEGI, 2005; MARZAL, 2005). Transmitida por mosquitos dos gêneros *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* e *Culiseta* (Garnham 1980, Valkiunas 2005) afeta diretamente seus hospedeiros, que em casos agudos apresentam anemia, letargia, inapetência sexual, fadiga extrema e o mais grave, bloqueio de capilares e veias sanguíneas que podem levar o tecido afetado a necrose e o hospedeiro a óbito (ATKINSON 1991, 1995, 2008, MARZAL, 2005, CLARK 2009).

Os parasitos responsáveis pela malária aviária são os protozoários hemosporídeos do gênero *Plasmodium* (Apicomplexa, Plasmodidae). Este gênero de parasito possui 55 espécies morfologicamente descritas (VALKIUNAS, 2018) e, segundo a base de dados MalAvi (BENSCH, 2009), mais de 4500 linhagens genéticas. Ocorrem em todo o mundo, exceto na Antártida e já foram registrados em mais de 30 ordens de aves. A maior riqueza das espécies de *Plasmodium* está associada aos Passeriformes, sendo registrado em mais de 500 espécies de hospedeiros (MalAvi, 2018).

Dentro da ordem dos Passeriformes estão as aves da superfamília Furnarioidea, grupo monofilético (MOYLE, 2009) que tem sua distribuição restrita a América Sul, onde seu centro de riqueza concentra-se na região Amazônica (SICK, 1997). É

composta por cinco famílias (CBRO 2015): Dendrocolaptidae, Formicariidae, Furnariidae, Scleruridae e Xenopidae (MARANTZ, 2003). Comporta aves com diferentes especializações ecológicas e comportamentais e, em comum, compartilham o tipo de ninho: os ninhos em forma de fuma (DICKINSON, 2003).

Sabendo do potencial devastador que a malária aviária possui sobre as populações naturais de aves, principalmente espécies de parasitos generalistas como relatado por ATKINSON (1991) este estudo tem como objetivo investigar a diversidade de *Plasmodium* que ocorre nas aves da superfamília Furnarioidea, buscando entender a dinâmica parasitária (prevalência, parasitemia e agregação) e as relações de especificidade com os hospedeiros e a distribuição geográfica das espécies desses parasitos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo e obtenção das amostras**

A coleta das aves ocorreu em quatro diferentes locais (**TABELA 2**) da Mata Atlântica, todos situados no sudeste de Minas Gerais, Brasil. A captura das aves ocorreu entre março de 2013 e dezembro de 2015 e foi realizada por meio de redes de neblina. Após a captura todas as aves foram marcadas com anilhas metálicas, identificadas através dos guias de campo RIDGELY et al. (2009) e SIGRIST (2014), fotografadas, pesadas e medidas para a confirmação da identificação, fazendo-se, a seguir, a coleta de sangue e soltura das aves. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob o protocolo nº 042/2012.

A coleta de sangue das aves ocorreu após assepsia do local com algodão embebido em álcool 70° GL (BRAGA et al. 2010), sendo feita extravasamento do sangue da veia braquial com o auxílio de agulha estéril (13 x 4,5 milímetros), respeitando o limite de 1% do peso vivo das aves, segundo recomendado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). Amostras de sangue foram utilizadas imediatamente para a preparação de esfregaços em lâminas de vidro para a análise em microscópio e também foi recolhido sangue em microtubos para análises moleculares, sendo este armazenado a seguir em local refrigerado. Os esfregaços sanguíneos foram fixados em metanol e já secos ao ar foram corados em Giemsa. Os microtubos contendo amostras de sangue foram armazenados em freezer a -20°C até o momento da extração de DNA.

**TABELA 2:** Localização geográfica, informações ambientais dos locais amostrados na Zona da Mata de Minas Gerais e quantidade de aves coletadas em cada local.

<b>Local</b>	<b>Localização geográfica</b>	<b>Altitude (m)</b>	<b>Temperatura média anual</b>	<b>Precipitação média anual</b>	<b>Nº de aves coletadas</b>
<b>Juiz de Fora</b>			20,3° C	1,449 ml	
Jardim Botânico UFJF	-21° 43' 50.0" -43° 22' 15.4"	724			124
Sítio Vista Alegre	-21° 48' 23.0" -43° 15' 45.7"	494			9
<b>Chácara</b>			21,2°C	1,440 ml	
Sítio Paraíso da Barra	-21° 40' 18.2" -43° 13' 14.2"	799			36
<b>Sta. Bárbara do Monte Verde</b>			20,1°C	1,573 ml	
Fazenda Volta Grande	-21° 58' 50.8" -43° 41' 44.4"	821			34

**TABELA 3:** Espécies da superfamília Furnarioidea coletados e seu número amostral

<b>Famílias e espécies dos hospedeiros</b>	<b>N°</b>
<b>Dendrocolaptidae</b> Gray, 1840	<b>96</b>
<i>Dendrocincla turdina</i> Rigway, 1911	3
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i> Gray, 1840	1
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i> Gray, 1840	3
<i>Lepidocolaptes squamatus</i> Gray, 1840	6
<i>Sittasomus griseicapillus</i> Gray, 1840	51
<i>Xiphocolaptes albicollis</i> Veillot, 1818	2
<i>Xiphorhynchus fuscus</i> Gray, 1840	30
<b>Furnariidae</b> Gray, 1840	<b>67</b>
<i>Anabazenops fuscus</i> Veillot, 1816	2
<i>Certhiaxis cinnamomeus</i> (Gmelin, 1788)	2
<i>Cranioleuca pallida</i> Wied, 1831	4
<i>Furnarius figulus</i> (Lichtenstein, 1823)	4
<i>Furnarius rufus</i> Gray, 1840	11
<i>Lochmias nematura</i> Gray, 1840	3
<i>Phacellodomus erythrophthalmus</i> (Wied, 1821)	1
<i>Phacellodomus rufifrons</i> (Wied, 1821)	4
<i>Philydor rufum</i> (Veillot, 1818)	5
<i>Synallaxis albescens</i> Temminck, 1823	2
<i>Synallaxis ruficapilla</i> Veillot, 1819	18
<i>Synallaxis spixi</i> Sclater, 1856	11
<b>Scleruridae</b> Swainson, 1827	<b>3</b>
<i>Sclerurus scansor</i> Swainson, 1827	3
<b>Xenopidae</b> Bonaparte, 1854	<b>5</b>
<i>Xenops rutilans</i> Temminck, 1821	5
<b>Total</b>	<b>171</b>

## **Análises dos dados**

Os esfregaços foram examinados em microscópio fotônico Olympus BX-51, em aumento de 600x para a determinação da prevalência. Para a avaliação da parasitemia a análise em microscópio fotônico foi feita em aumento de 1000x e calculada segundo BUSH et al., (1997) no software Quantitative Parasitology 1.0.13 (REICZIGEL et al., 2013). Neste mesmo software foi estimada a agregação dos parasitos segundo POULIN (1993).

Para as análises morfológicas dos parasitos foram capturadas imagens dos esfregaços usando uma câmera (Olympus Evolt E-330). Os caracteres foram tomados conforme descrito em VALKIUNAS (2018) levando em conta o comprimento, a largura, a área, o número de vacúolos, e o número e formas dos pigmentos de hemozoína em merontes e gametócitos, quando presentes.

## **Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento.**

Para a extração total do DNA das amostras foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (#96373, Promega, Madison, EUA) seguindo o protocolo de instruções do fabricante. A quantificação do DNA extraído foi verificada por meio de espectrofotometria de Ultra Violeta (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Para amplificação do gene mitocondrial citocromo b (cyt b) foi usado o protocolo de nested PCR proposto por MERINO et al., (2008), onde os iniciadores não específicos utilizados na primeira reação foram: 3760F (5'-ATG GAG TGG GTG TTT TAG AT-3') e 4292Rw (5'-TGG AAT AAC ATG TAR AGG AGT-3') para a detecção hemsporídeos dos gêneros *Haemoproteus*/*Plasmodium* que amplificam 533 pares de bases (pb) do gene mitocondrial. Na segunda reação foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos: PF (5'-GGA TTT GTG GTG GAT ATC TTG-3') e 4292Rw para *Plasmodium*, 422 pb, e HML (5' -GCT ACT GGT GCT TTT ACA GT-3') e HMR (5'-CTC GAG AAA CTA GGATTA CC-3') para *Haemoproteus* 367 pares de bases (MERINO et al., 2008).

Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose a 2% (Invitrogen®) por aproximadamente 45 minutos a 15 V/cm sendo o fluido condutor de corrida tampão tris-EDTA-acetato, pH 8,0 (TAE-1x). Os produtos amplificados foram purificados usando o kit de purificação QIAquick (Qiagen, São Paulo, Brasil), e submetidos a sequenciamento bidirecional usando os primers HaemF / HaemR2 ou HML / HMR (BENSCH et al., 2000; MERINO et al., 2008) O sequenciamento foi realizado em

Sequenciador 3130xL (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia), seguindo as instruções do fabricante.

### **Análise filogenética**

Reconstruções filogenéticas foram baseadas no gene *cytb* de *Plasmodium*, usando cinco sequências obtidas neste estudo combinadas com um conjunto de dados de 95 sequências dos bancos de dados MalAvi (BENSCH et al., 2009) e GenBank (BENSON et al., 2013). Como grupo externo foram escolhidas sequências de *Leucocytozoon buteonis*, *Leucocytozoon fringillinarum* e *Leucocytozoon quynzae*. Apenas sequências confiáveis, formalmente nomeadas, foram utilizadas nas análises.

As sequências foram alinhadas no MAFFT (KATO et al., 2017) com opções padrão e em seguida, inspecionadas visualmente. Após remover posições mal alinhadas através do software GBLOCKS (TALAVERA & CASTRESANA 2007), obteve-se uma matriz com 479 pb. A inferência da filogenia dos hemosporídeos foi realizada através de Máxima Verossimilhança (ML), no software RAxML (STAMATAKIS, 2014), usando o modelo GTR + GAMMA + I com 4 categorias gama (YANG, 1994; TAVARÉ, 1986). Este foi escolhido como o melhor modelo de substituição no JmodelTest, implementado no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). O suporte ao clado foi avaliado com o critério de convergência de bootstrap RAxML (STAMATAKIS, 2014) com 100000 pseudo-replicatas.

### **Delimitação computacional de espécies**

Para a delimitação computacional de espécies foi usado o software de delimitação MPTP (KAPLI, 2017), baseado na coalescência, tendo como arquivo de entrada uma filogenia de máxima verossimilhança (como descrito acima), de acordo com ZHANG (2013). A base de dados foi formada por linhagens de 479 pares de base do gene *cytb* de *Plasmodium* geradas nesse estudo e do banco de dados MalAvi (BENSCH, 2009), onde foram usadas todas as linhagens disponíveis do gênero. Para grupo externo foram usadas sequências de *Leucocytozoon buteonis*, *Leucocytozoon fringillinarum* e *Leucocytozoon quynzae*, resultando em um dataset de 885 linhagens.

## RESULTADOS

### Prevalência, Parasitemia e Agregação

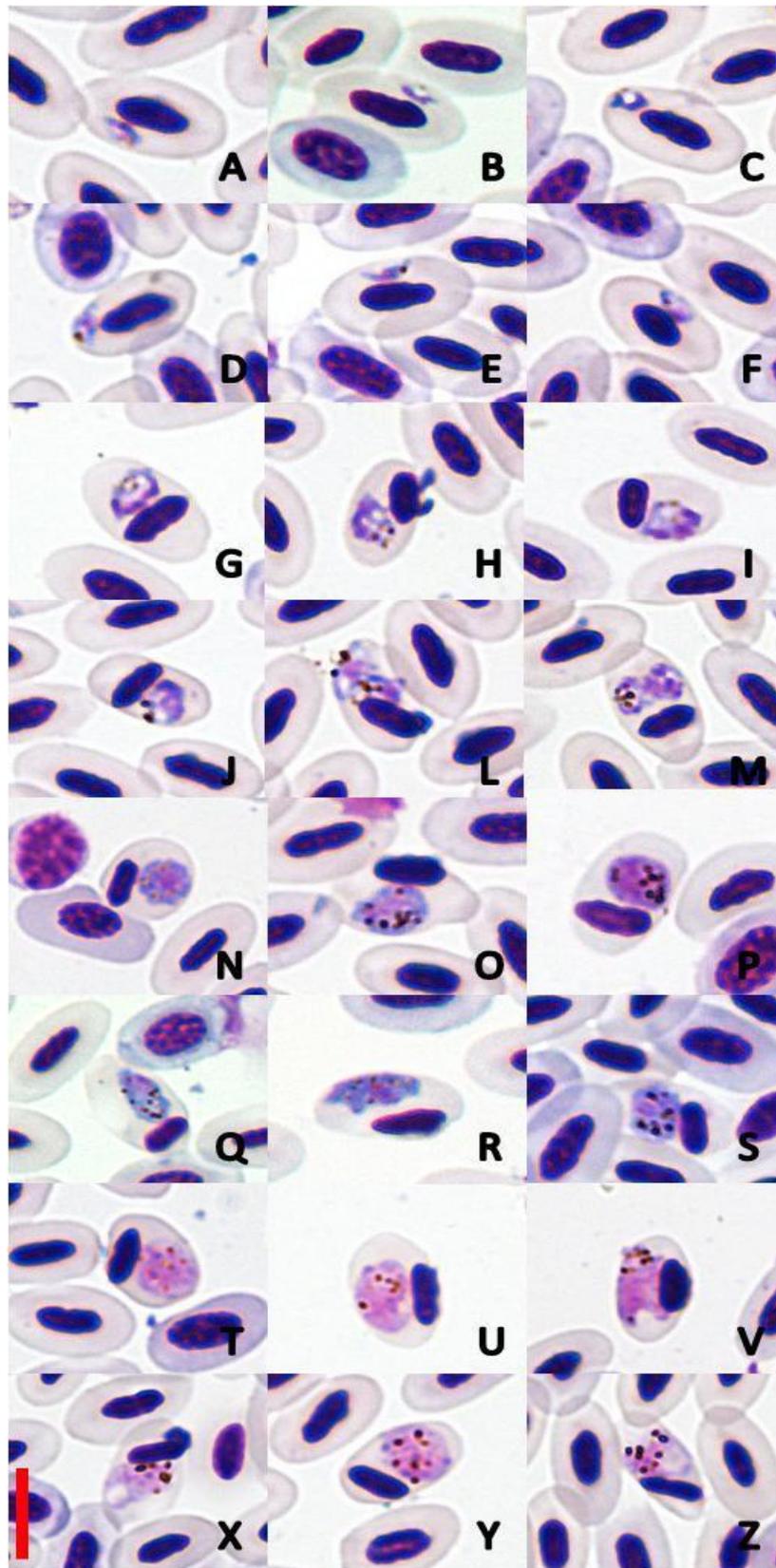
Amostras sanguíneas de 171 aves de 22 espécies da Superfamília Furnarioidea (TABELA 3) foram analisadas sob microscopia revelando a presença de parasitos do gênero *Plasmodium*. As formas imaturas de trofozoítos foram as mais abundantes nas amostras sendo possível observar todas as formas evolutivas do parasito somente em uma amostra de *Lepidocolaptes angustirostris*. Neste caso o parasito foi identificado como a espécie *Plasmodium cathemerium* (FIGURA 1) segundo a chave de identificação de VALKIUNAS (2018).

A prevalência geral de infecção nas amostras foi de 12,2%, onde 21 indivíduos estavam parasitados. A intensidade média de infecção foi de 0,068%. Entre as espécies analisadas as maiores intensidades médias de infecção registradas foram nas espécies *Lepidocolaptes angustirostris* (0,36%) e *Synallaxis ruficapilla* (0,12%). As demais parasitemias das espécies observadas mostraram valores abaixo de 0,1%. A distribuição dos parasitos revelou-se agregada, onde o índice de agregação (ID) foi igual a 0.941 (TABELA 4).

### Posição filogenética dos Parasitos

As amostras positivas em microscopia óptica foram analisadas em biologia molecular. Destas, cinco novas sequencias do gene *cyt b* de *Plasmodium*, de diferentes hospedeiros, foram recuperadas. Nas demais amostras positivas na microscopia a baixa quantidade de dna dos parasitos e inespecificidade dos primers impossibilitaram a recuperação de demais linhagens.

A filogenia mostrou o agrupamento das cinco novas linhagens obtidas nesse estudo com parasitos do gênero *Plasmodium*. As linhagens do gênero *Haemoproteus* formaram um grupo irmão com *Plasmodium* e como esperado *Leucocytozoon* formou um grupo irmão as linhagens desses dois parasitos (FIGURA 2).



**FIGURA 3:** Fotomicrografias das formas evolutivas de *Plasmodium cathemerium* encontradas; A-F trofozoítos; G-M- merontes;. N-S macrogametócito; T-Z microgametócitos. Barra: 10  $\mu$ m.

**TABELA 4:** Número de indivíduos coletados em cada família de aves e suas respectivas prevalências médias, parasitemia média e agregação parasitária.

	Nº	Prevalência média (%)	Parasitemia média (%)	Agregação parasitária (ID)
Furnarioidea	171	12	0,045	0,941
Dendrocolaptidae	96	14	0,065	0,925
Furnariidae	67	13	0,063	0,921
Scleruridae	3	-	-	-
Xenopidae	5	20	0,05	0,667



**FIGURA 4:** Árvore filogenética de *Plasmodium* inferida por análise de máxima verossimilhança. Os valores próximos aos nós representam os valores de bootstrap. Os clados formados entre as linhagens obtidas neste estudo e as morfoespécies destacam-se em cinza. As linhagens obtidas neste estudo estão destacadas em negrito e com uma estrela. As morfoespécies destacam-se em vermelho. Barra representa 4 substituições por posições de 100 nucleotídeos.

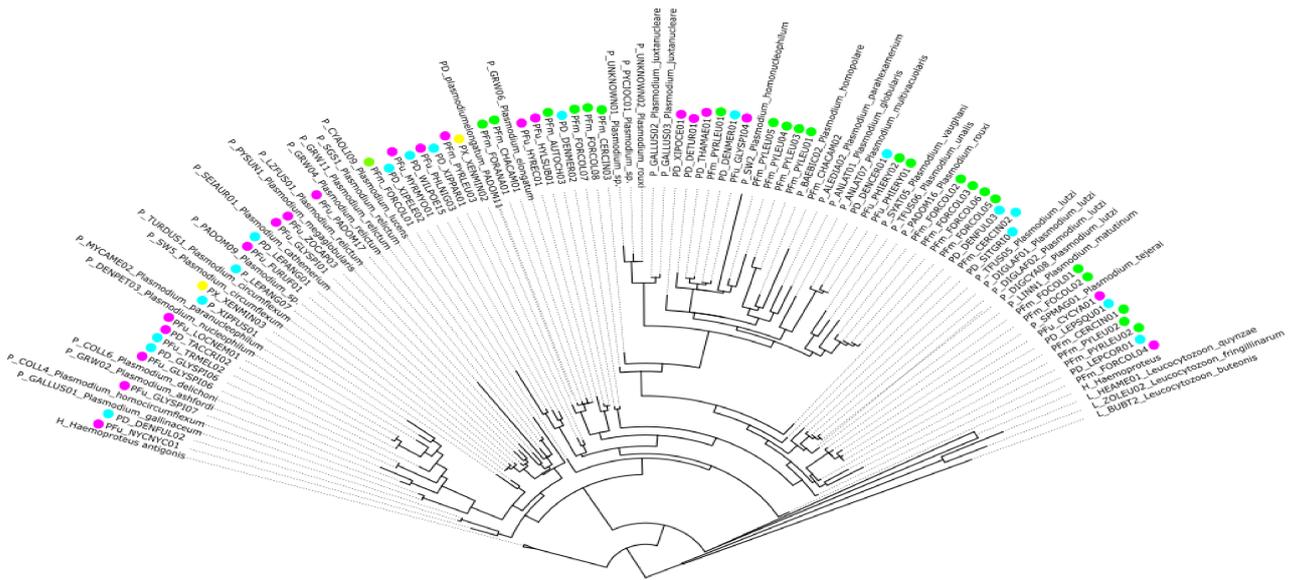
### **Delimitação computacional das espécies de *Plasmodium***

Foram recuperadas 93 unidades evolutivas de *Plasmodium* através do MPTP segundo o critério de coalescência, sugerindo uma alta diversidade de espécies. Das linhagens que ocorrem na superfamília Furnarioidea 17 espécies de *Plasmodium* foram recuperadas. O método MPTP, corroborou parcialmente as análises filogenéticas, mostrando que três das quatro linhagens inéditas obtidas neste estudo pertencem a morfoespécies já descritas de *Plasmodium*. A primeira unidade evolutiva delimitada indicou que a linhagem LEPANG07 pertença à espécie *P. cathemerium*. A segunda espécie contém as linhagens LEPSQU01 e SITGRI01 e as morfoespécies *P. tejerai*, *P. matutinum* e *P. lutzii*. Na terceira a linhagem LOCNEM01 foi classificada como *P. nucleophilum*. A quarta espécie delimitada formou-se entre a linhagem XIPFUS01 e linhagens ainda não caracterizadas morfologicamente.

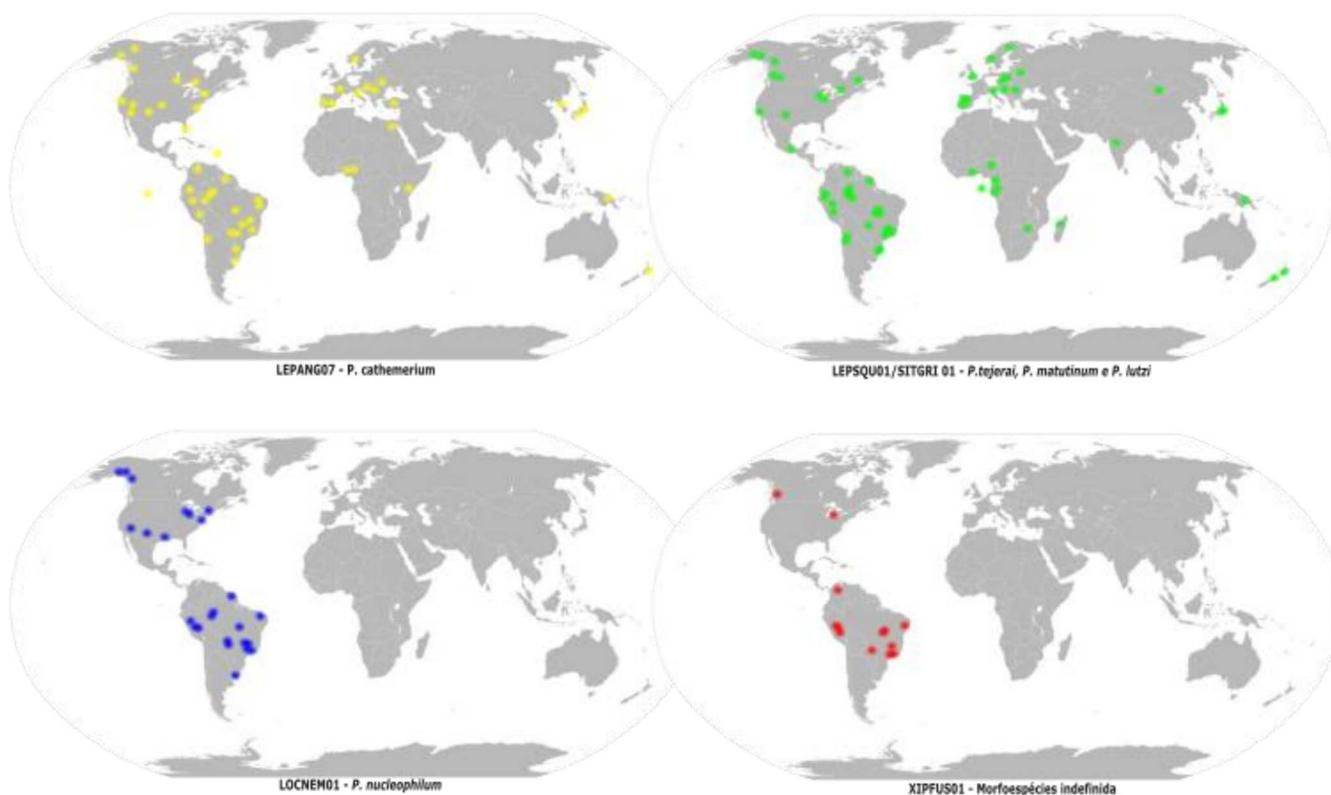
### **Inespecificidade e distribuição das espécies de parasitos**

As 17 espécies de *Plasmodium* que ocorrem nas aves da Superfamília Furnarioidea apresentam inespecificidade em relação aos hospedeiros e também mostram uma distribuição geográfica ampla. As análises filogenéticas mostram que os clados de *Plasmodium* abrigam linhagens de hospedeiros das diferentes famílias que compõem Furnarioidea (**FIGURA 3**). A delimitação computacional de espécies mostrou que as espécies de *Plasmodium* que parasitam Furnarioidea tem uma ocorrência maior que a desses hospedeiros (**FIGURA 4**).

Como esperado, a maioria das espécies delimitadas já tiveram sua ocorrência registrada na América do Sul, local de endemismo dos hospedeiros analisados, porém, destacam-se algumas espécies cuja ocorrência é distante do local de nativo dos hospedeiros. As espécies *P. gallinaceum*, *P. relictum*, *P. delichioni* e *P. ashfordi*, amplamente distribuídas por Europa e Ásia ocorrem também em hospedeiros na América do Sul.



**FIGURA 5:** Árvore filogenética de *Plasmodium* inferida por análise de máxima verossimilhança mostrando em círculos coloridos a relação de inespecificidade das linhagens com a família dos hospedeiros. Rosa – Furnariidae; Azul – Dendrocolaptidae; Verde – Formicariidae; Amarelo – Xenopidae.



**FIGURA 6:** Mapas de distribuição geográfica das espécies de *Plasmodium* onde foram delimitadas, através do MPTP, as linhagens obtidas neste estudo. Destaca-se a ampla ocorrência das espécies de parasitos que parasitam Furnarioidea. Em amarelo a distribuição da linhagem LEPANG07 delimitada com *P. cathemerium*; Em verde as linhagens LEPQUA01 e SITGRI02 delimitadas como as espécies *P. tejerai*, *P. matutinum* e *P. lutzi*; Em azul a linhagem LOCNEM01 delimitada como *P. nucleophilum*; e em vermelho a linhagem XIPFUS01 que não foi relacionada a nenhuma morfoespécie descrita.

## DISCUSSÃO

### Dinâmica parasitária

A ocorrência de *Plasmodium* nas aves da superfamília Furnarioidea já foi registrada em outros estudos (BENNET & LOPES, 1980; WOODWORTH-LYNAS et al., 1989; RIBEIRO et al., 2005; DURRANT, 2006; MERINO, 2008; LACORTE, 2013; HARRIGAN, 2014; MARZAL, 2015; MOENS & PEREZ-TRIS, 2015; FECCHIO, 2017). Estes se baseiam principalmente em estudos de diagnóstico onde são amostradas aves de diversas espécies. Aqui, pela primeira vez, foi investigada a diversidade, as relações filogenéticas e ecológicas dos parasitos que ocorrem nas aves da superfamília Furnarioidea.

A prevalência de 12,2% (n=171) encontrada neste estudo mostra que uma parcela importante das populações das aves da superfamília Furnarioidea nos fragmentos de Mata Atlântica da zona da mata de Minas Gerais está parasitada por *Plasmodium*. A prevalência vista aqui quando comparada com outros estudos destas aves mostra grande variação, WOODWORTH-LYNAS et al., (1989) encontrou 0,6% enquanto RIBEIRO et al., (2005) 39,% nas famílias Dendrocolaptidae e Furnariidae. Os distintos padrões de prevalência, desse e de outros estudos, parecem refletir uma variação local, onde as condições ambientais, a diversidade e abundância dos vetores, parasitos e hospedeiros funcionam filtros desse processo.

A parasitemia encontrada foi baixa quando comparada aos mesmos trabalhos citados acima, sugerindo que os hemosporídeos na população de aves estudada se mantêm em níveis baixos. Esse fato foi reafirmado pela presença de somente trofozoítos na maioria nas amostras, indicando que se trate na maioria dos casos de infecções crônicas ou desenvolvimento abortivo dos parasitos (VALKIUNAS, 2005, RICKLEFS 1992), que em certos casos estão ligados à baixa patogenicidade das espécies de hemosporídeos (GARNHAM, 1966; VANSTREELS, 2017).

As poucas espécies que apresentaram altas parasitemias foram *Lepidocolaptes angustirostris* (0,36%) e *Synallaxis ruficapilla* (0,12%), onde, em ambas as amostras, foram observadas gametócitos dos parasitos. Alguns fatores são relevantes para explicar altas parasitemias, como a competência do sistema imunológico das aves, o estágio da infecção e o tempo em que é estabelecido, as espécies dos parasitos e hospedeiro, sexo e idade do hospedeiro (REMPLE, 2004; VALKIUNAS, 2005, ATKINSON, 2008).

Como são poucas as similaridades ecológicas desses táxons relevantes para as infecções da malária aviária, acreditamos que essas discrepâncias na população possam

ser explicadas pela agregação parasitária. As análises mostraram que distribuição dos parasitos na população de aves estudada foi agregada, corroborando a teoria em que os parasitos se concentram em uma pequena parte da população. Isto já bem relatado na literatura (POULIN, 1992, 1997; MORRIL, 2017) onde outras espécies de parasitos também mostraram esse tipo de tendência em sua distribuição.

### **Dados moleculares**

Observamos um número inferior de amostras positivas nas análises por biologia molecular em relação às análises microscópicas, 18 das amostras positivas em lâminas não foram amplificadas pela PCR. Acreditamos que dois fatores podem explicar este fato, primeiro, a baixa quantidade de parasitos nas amostras não permitiram a amplificação de seu DNA. Em segundo a inespecificidade dos primers utilizados, como relatado MERINO (2008) e discutido por MARTINEZ (2009). A maioria desses primers é baseada em linhagens experimentais de espécies bem conhecidas de hemosporídeos, talvez exista uma variação maior das linhagens ainda desconhecidas que os primers não capturem.

As cinco linhagens inéditas recuperadas neste estudo ajudam a entender melhor a diversidade global de *Plasmodium*, principalmente no Brasil, um país de dimensões e biodiversidade considerável, onde as áreas de ocorrência e a diversidade dos parasitos da malária aviária foram pouco amostradas (BRAGA, 2010). Na Mata Atlântica a descoberta de novas linhagens ganha ainda mais importância, primeiro por que este bioma é um dos maiores hotspots de diversidade de aves conhecidos (CBRO, 2015). Segundo, a Mata Atlântica possui uma das maiores taxas de endemismo do mundo, logo os dois fatores combinados com a grande diversidade de vetores suportam a teoria que esse bioma possa ser um dos mais ricos em espécies de hemosporídeos. Em terceiro, existe grande pressão antrópica sobre a Mata Atlântica, com perdas de habitat consideráveis, que podem levar também a perda de biodiversidade, e incluídos nisso podem estar espécies de *Plasmodium* que ainda não são conhecidas.

### **Especificidade e Distribuição**

Os resultados das análises filogenéticas com as linhagens de *Plasmodium* que parasitam Furnarioidea revelaram o agrupamento dessas em clados distintos (**FIGURA 2**). As linhagens inéditas obtidas neste estudo, apesar de pertencerem a um mesmo local geográfico, agruparam-se em clados diferentes. Isso pode refletir as distintas origens

evolutivas nas linhagens que parasitam essas aves, levando a crer que não haja uma coevolução entre parasitos e hospedeiros. A ausência de especificidade entre as linhagens dos parasitos e as famílias dos hospedeiros (**FIGURA 3**) retrata a plasticidade dos hemosporídeos, já relatados em outros trabalhos (ISHTIAQ, 2007; FECCHIO, 2018; MARTINSEN, 2006), mostrando uma capacidade incrível de trocar de hospedeiros com sucesso. Talvez esse seja o trunfo evolutivo que levou o gênero *Plasmodium*, para uma grande diversificação em ambientes tropicais e diversos em aves. Nesse contexto os vetores podem assumir um papel fundamental, disseminando os parasitos por diversas aves, inclusive de outras famílias e ordens (VALKIUNAS, 2005).

A recuperação de 17 unidades evolutivas de *Plasmodium* que parasitam Furnarioidea através do MPTP ressalta a grande diversidade de parasitos nessas aves. A ocorrência de espécies distribuídas globalmente indica a grande capacidade de colonização e distribuição da malária aviária e também a capacidade destas aves em hospedar espécies conhecidamente patogênicas como *P. relictum*. Algumas espécies já eram conhecidas na América do Sul como *P. tejerai*, *P. nucleophilum* e *P. lutzi* (SILVEIRA, 2013; VANSTREELS, 2014, 2015, 2016; OLIVEIRA, 2018), outras espécies como *P. gallinaceum*, *P. delichioni* e *P. ashfordi*, são comuns em ambientes temperados na Europa e na Ásia.

A ampla distribuição das espécies hospedeiras com que as linhagens de Furnarioidea se agruparam gera a dúvida se essas linhagens são autóctones ou introduzidas, o segundo caso gera preocupação com a possibilidade de infecções mais agudas devido a não adaptação do sistema imunológico dos hospedeiros nativos, podendo gerar baixas consideráveis nas populações de aves (ATKINSON, 1991), aumentando o risco de perda da biodiversidade e até extinção.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo atesta a superfamília Furnarioidea, um grupo monofilético, porém, com inúmeras adaptações fisiológicas, comportamentais e ecológicas como um bom modelo para estudos em parasitologia.

Com adição de novas sequências do gene *cytb* de cinco linhagens inéditas contribuimos para o conhecimento da diversidade de *Plasmodium* que ocorrem na Mata Atlântica, um bioma altamente ameaçado que tem o potencial de abrigar muitas espécies de parasitos da malária aviária ainda não conhecidos pela ciência, dada sua grande biodiversidade e a pouca amostragem já realizada. Também produzimos mais conhecimento sobre a história evolutiva de *Plasmodium*, assim como novos dados a serem somados na relação ecológica entre os parasitos, os vetores e os hospedeiros.

Mostramos que uma parte significativa da população de aves está parasitada e que essas infecções, em sua maioria, ocorrem em baixa intensidade e de forma agregada, indicando que se trate na maioria dos casos de infecções crônicas ou desenvolvimento abortivo dos parasitos. Recuperamos através da delimitação computacional de espécies pelo método MPTP, 17 unidades evolutivas de *Plasmodium* ocorrendo nos hospedeiros de Furnarioidea, revelando grande diversidade destes parasitos.

Reafirmamos a grande plasticidade de *Plasmodium*, com suas linhagens mostrando inespecificidade em relação às cinco famílias dos hospedeiros, sugerindo a capacidade de trocar de hospedeiros com sucesso durante seu processo evolutivo. Revelamos a ampla distribuição geográfica de *Plasmodium*, mostrando que espécies globalmente difundidas, como *P. relictum* e com alto potencial patogênico, como *P. gallinaceum* estão ocorrendo nessas aves endêmicas.

## REFERÊNCIAS

ATKINSON, C. T.; THOMAS, N.J.; HUNTER, D. B. Parasitic Diseases of Wild Birds. **John Wiley & Sons**. 2008.

ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. Birdparasite interactions. Oxford, **Oxford University Press**: p. 19-48. 1991.

ATKINSON, C. T.; WOODS, R. J.; DUSEK, L. S. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). **Parasitology**. v.11: p. 59-69, 1995.

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

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.; STJERNMAN, M.; HASSELQIST, D.; ÖSTMAN, Ö.; HANSSON, B.; WESTREDAHL, H.; PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences**. v. 267: p. 1583–1589. 2000.

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

BRAGA, E. M. 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**, Rio de Janeiro , v. 106, supl. 1, p. 3-11. 2011

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

CLARK, P.; BOARDMAN, W S. J.; RAIDAL, S. R. **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Ed. Blackwell. 2009.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (CBRO). **Listas das aves do Brasil**. 11ª Edição. Acesso em: 15/9/2018. 2015.

DERRYBERRY, E. P.; CLARAMUNT, S.; DERRYBERRY, G.; CHESSER, R. T.; CRACRAFT, J.; ALEIXO, A.; PÉREZ-TRIS, J.; REMSEN, J. V.; BRUMFIELD, R. T. Lineage diversification and morphological evolution during an exceptional continental radiation, the Neotropical ovenbirds and woodcreepers (Aves: Furnariidae). **Evolution**. v. 65(10):p. 2973-2986. 2011.

DICKINSON, E. C. The Howard and Moore Complete Checklist of the Birds of the World, Revised and enlarged 3rd Edition. **Christopher Helm**, London, 1040 p. 2003.

DURRANT, K. L. Avian Hematozoa in South America: A Comparison of Temperate and Tropical Zones.” **Ornithological Monographs**, no. 60, pp. 98–111. 2006.

FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M.; Low prevalence of blood parasites in Cerrado birds, Central Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**. v. 2: p.127-135. 2007.

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

FECCHIO, A.; BELL, J. A.; COLLINS, M. D.; FARIAS, I. P.; TRISOS, C. H.; TOBIAS, J. A.; TKACH, V. V.; WECKSTEIN, J. D.; RICKLEFS, R. E.; BATALHA-FILHO, H. Diversification by host switching and dispersal shaped the diversity and distribution of avian malaria parasites in Amazonia. **Oikos**. v. 127: p. 1233-1242. 2018.

FIGUEIREDO, M. L. Padrões geográficos na riqueza de espécies da superfamília Furnarioidea (Aves: Passeriformes). **Tese de doutorado. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro**. 2005.

GALBADÓN, A.; ULLOA, G. Exoerythrocytic forms of *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 and the presence of this species in Venezuela (Las formas exoeritrocíticas de *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 y presencia de esta

especie em Venezuela). **Malaria and Environmental Protection Bulletin**. v. 16: p. 299-312. 1976.

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

GARNHAM, P. C. Malaria in its various vertebrate hosts. In: Kreier, JP. Malaria. Part 1. Epidemiology, chemotherapy, morphology and metabolism. New York: **Academic Press**. p. 95-144. 1980.

HARRIGAN, R. J., SEDANO, R. , CHASAR, A. C., CHAVES, J. A., NGUYEN, J. T., WHITAKER, A. AND SMITH, T. B, New host and lineage diversity of avian haemosporidia in the northern Andes. **Evol Appl**, 7: 799-811. 2014.

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

ISHTIAQ, F.; GERING, E.; RAPPOLE, J. H.; RAHMANI, A. R.; JHALA, Y. V.; DOVE, C. J.; MILENSKI, C.; OLSON, S. L.; PEIRCE, M. A.; FLEISCHER, R. C. Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: a regional survey. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 43, n. 3: p. 382-398. 2007.

JUNIOR, F. C. F.; RODRIGUES, R. A.; ELLIS, V. A.; LEITE, L. O.; BORGES, M. A. S.; BRAGA, E. M. Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. **PloS one**. v. 12 (6): p. 17. 2017.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, bbx 108. 2017.

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

- MARANTZ, C. A.; ALEIXO, A.; BEVIER, L. R.; & PATTEN, M. A. T. Family Dendrocolaptidae (Woodcreepers). **Handbook of the birds of the world**. Barcelona, Spain: Lynx Edicions. p. 358–447. 2003.
- MARTINSEN, ES, PAPERNA, I, SCHALL, JJ 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. **Parasitology**. v. 133: p. 279-288.
- MARZAL, A.; DE LOPE, F.; NAVARRO, C.; MOLLER, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**. v.142:p. 541-545. 2005.
- MARZAL, A.; GARCÍA-LONGORIA, L.; CÁRDENAS-CALLIRGOS, J. M. Invasive avian malaria as an emerging parasitic disease in native birds of Peru. **Biol Invasions** 17: 39. 2015.
- MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R. A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ, I.; ESTADES, C. F. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Austral Ecology**. v. 33: p. 329–340. 2008.
- MOENS A. J.; PÉREZ-TRIS, J. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites, **International Journal of Parasitology**, Volume 46, Issue 1, 2016.
- MOYLE, R. G.; CHESSER, R. T.; BRUMFIELD, R. T.; TELLO, J. G.; MARCHESE, D. J.; & CRACRAFT, J. Phylogeny and phylogenetic classification of the antbirds, ovenbirds, woodcreepers, and allies (Aves: Passeriformes: infraorder Furnariides). **Cladistics**. v. 25: p. 386-405. 2009.
- POULIN, R. Explaining variability in parasite aggregation levels among host samples. **Parasitology**. v. 140(4): p. 541-546. 2013.
- REMSEN, J.V. Family Furnariidae (ovenbirds). in del Hoyo, Elliott, JA & Christie DA. Handbook of the birds of the world, broadbills to tapaculos. **Lynx Edicions**. Barcelona. v. 8: p. 162–357. 2003.

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

RICKLEFS, R. E. Embryonic development period and the prevalence of avian blood parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 89: p. 4722-4725. 1992.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E. Evolucionary Relationships, Cospeciation and Host Switching in Avian Malaria Parasites. **Systematic Biology**. v. 53: p. 111-119. 2004.

ROPER, J.; HUTSON, A. Ovenbirds. Pp. 438-441 in C Perrins, ed. The New Encyclopedia of Birds. Oxford: **Oxford University Press**. 2003.

ROZSA, L.; REICZIGEL, J.; MAJOROS, G. Quantifying parasites in samples of hosts. **Journal of Parasitology**. v. 86: p. 228-232. 2000.

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

SIBLEY, C. G.; & AHLQUIST, J. E. Phylogeny and Classification of Birds. New Haven: **Yale University Press**. 1990.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro. Editora Nova Fronteira. 1997.

SIGRIST, T. Guia de campo. **Avifauna Brasileira**. Avis Brasilis, São Paulo. 2014

SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; LACORTE, G.; KOLESNIKOVAS, K. M.; VANSTREELS, R. E. T.; CATÃO-DIAS, M. S.; VALKIUNAS, G.; BRAGA, E. M. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South American penguins. **Parasitology International**. v.62: p. 165-171. 2013.

STAMATAKIS, A. "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". **Bioinformatics**. 2014.

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

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

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

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

TOSTES, R.; DIAS, R. J. P.; DE OLIVEIRA, L.; SENRA, V. X. M.; MASSARD, C. L.; D'AGOSTO, M. Molecular and Morphological Characterization of a Brazilian Lineage of *Plasmodium* (Novyella) Unalis in *Turdus* Spp. (Passeriformes) of the Atlantic Forest, with Remarks on New Hosts and High Genetic Variation. **Journal of Parasitology**. Vol. 104, No. 1, p. 70-78. 2018

VALKIUNAS, G. **Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia**. USA: CRC Press. 2005.

VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENE, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R. N. M.; BENSCH, S. A comparative analysis of microscopy and pcr-based detection methods for blood parasites. **The Journal of Parasitology**. v. 94, n. 6: p. 1395-1401. 2008.

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

VANSTREELS, R. E. T.; PARSONS, N. J. MALÁRIA AVIÁRIA E OUTROS HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS. IN CUBAS, ZS, SILVA, JCR & CATÃO-DIAS, JL. São Paulo: Roca. **Tratado de Animais Selvagens**. vol. 2: p. 1427-1443. 2014.

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

VANSTREELS, R. E. T.; BRAGA, E. M.; CATÃO-DIAS, J. BLOOD PARASITES OF PENGUINS: A CRITICAL REVIEW. **Parasitology**. v. 143(8): p. 931-956. 2016.

VANSTREELS, R. E. T.; UHART, M.; RAGO, V.; HURTADO, R.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J. Do blood parasites infect Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in the wild? Prospective investigation and climatogeographic considerations. **Parasitology**. v. 144(5): p. 698-705. 2017.

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

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