

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

Luísa de Oliveira

**HEMOPARASITISMO POR *Plasmodium* spp. E *Haemoproteus* spp. EM  
PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA MINEIRA E CARACTERIZAÇÃO  
MORFOLÓGICA DE *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* LUCENA, 1939**

Juiz de Fora  
2014

Luísa de Oliveira

**HEMOPARASITISMO POR *Plasmodium* spp. E *Haemoproteus* spp. EM  
PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA MINEIRA E CARACTERIZAÇÃO  
MORFOLÓGICA DE *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* LUCENA, 1939**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Marta Tavares D'Agosto (Departamento de Zoologia/UFJF)

Co-orientadora: Dra. Isabel Martinele Corrêa

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Oliveira, Luísa.

HEMOPARASITISMO POR Plasmodium spp. E Haemoproteus spp. EM PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA MINEIRA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE Plasmodium (Haemamoeba) lutzi LUCENA, 1939 / Luísa de Oliveira. -- 2014.

69 p. : il.

Orientadora: Marta Tavares D Agosto

Coorientadora: Isabel Martinele Corrêa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

1. Aves silvestres. 2. Haemoproteus. 3. Plasmodium. 4. nested PCR. I. Tavares D Agosto, Marta, orient. II. Martinele Corrêa, Isabel, coorient. III. Título.


Luisa de Oliveira

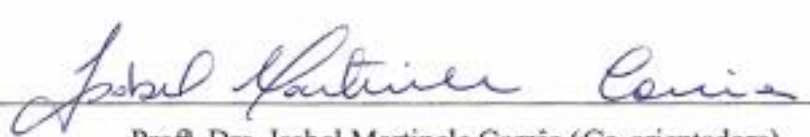
**HEMOPARASITISMO POR *Plasmodium* spp. E *Haemoproteus* spp. EM  
PASSERIFORMES DA MATA ATLÂNTICA MINEIRA E CARACTERIZAÇÃO  
MORFOLÓGICA DE *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* LUCENA, 1939**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 10 de outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

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

  
Prof.ª. Dra. Isabel Martinele Corrêa (Co-orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
Prof. Dr. Huarisson Azevedo Santos  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, Minas Gerais

Outubro de 2014

*Aos meus pais que me educaram e me ensinaram a dar valor às coisas simples da vida...*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida, pela proteção e força, por nunca me deixar desistir. Sempre terei em mente que os seus planos são maiores que meus sonhos.

Aos meus pais, **Estêvão** e **Ilza**, por todos os ensinamentos que me fazem tornar uma pessoa cada dia melhor.

Aos meus irmãos, **Jaqueline**, **Luiz** e **Susi** por todos os momentos felizes e também pelos tristes, especialmente à **Susi** por todo carinho, preocupação, ajuda e paciência.

À professora **Marta D'Agosto**, pela oportunidade, receptividade e orientação, por confiar no meu trabalho e pelo incentivo na busca de novos caminhos.

À professora **Isabel Martinele**, pela paciência, ajuda, apoio, pelos ensinamentos e pelos “puxões de orelha”.

Ao professor **Roberto Dias**, pelo carinho, incentivo, ensinamentos e por notáveis contribuições nessa trajetória.

Aos amigos do “LabProto” **Bianca Sartini**, **Elen Furtado**, **Felipe Santos**, **Franciane Cedrola**, **Marcus Senra**, **Mariana Rossi**, **Priscila Fregulia**, **Rafaela Venançoni**, **Raquel Tostes**, **Roberto Marchesini**, **Talys Assumpção**, pela paciência, ajuda nas coletas e contribuições com o trabalho, pela amizade, por dividirem comigo momentos de alegria, de tensão e experiências que contribuíram para o meu crescimento.

À **Franciane Cedrola**, por tudo, pelo carinho, paciência, conselhos, ensinamentos, imensa ajuda e disposição e acima de tudo pela amizade.

À **Alyssa Rossi**, pelo incentivo, ajuda nas técnicas moleculares, paciência e amizade.

À Professora **Kézia Scopel**, pela dedicação, preocupação, ensinamentos e ajuda nas técnicas moleculares.

Ao professor **Érik Daemon**, pelo incentivo, confiança, pela organização das coletas e contribuições para o trabalho.

Aos colegas do “LAP”, pela ajuda nas coletas, pelos momentos alegres que tornaram dias difíceis em campo, aventuras inesquecíveis.

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

À **Rosângela** e **Raquel**, pelo carinho, amizade, preocupação, dedicação, momentos felizes de confraternização e pelas risadas de todas as manhãs.

Ao **Osmar**, pelo apoio e paciência.

Aos amigos, **Flávio, Iara, Kamila, Luan, Laetitia** e **Lívia** pela amizade, paciência, apoio e momentos alegres de descontração.

À “**Biodelirante**” por todos os momentos marcantes durante os quatro anos de graduação.

Ao **IBAMA**, pela licença para realização das coletas de sangue.

Ao **Departamento de Genética**, pelo uso de equipamentos e disponibilidade.

À **UFJF**, pela oportunidade.

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

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Desenho 1. Ciclo biológico do parasito <i>Haemoproteus</i> spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	16
Desenho 2. Ciclo biológico do parasito <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro e invertebrado.....	18
Fotografia 1. Gel de agoarose 2% mostrando os produtos de amplificação do gene citocromo b de <i>Plamodium</i> spp. ....	32
Prancha I. Formas evolutivas de <i>Plasmodium</i> spp. encontradas nos esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, de aves silvestres provenientes do IBAMA e capturadas no JB-UFJF.....	40
Prancha II. Macrogametócitos e microgametócitos de <i>Haemoproteus</i> spp. encontrados nos esfregaços sanguíneos de aves silvestres provenientes do IBAMA e capturadas no JB-UFJF.....	42
Prancha III. Formas evolutivas de <i>Plasmodium (Haemamoeba) lutzi</i> encontradas nos esfregaços sanguíneos corados em Giemsa da ave <i>Arremon sequitorquatus</i> .....	43



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais estudos com hemosporídeos ( <i>Haemoproteus</i> e <i>Plasmodium</i> ) em aves da ordem Passeriformes da região neotropical.....	25
Tabela 2. Parasitismo por <i>Haemoproteus</i> spp. e <i>Plasmodium</i> spp. em Passeriformes mantidos pelo IBAMA-JF e do JB-UFJF, diagnosticados por microscopia e nPCR.....	34

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1. A ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885).....	12
2. Ciclo biológico dos gêneros <i>Plasmodium</i> Marchiafava & Celli, 1885 e <i>Haemoproteus</i> Kruse, 1890 em aves.....	14
3. Hemoparasitos em aves silvestres no Brasil.....	19
4. Técnicas de diagnóstico.....	20
4.1. Microscopia fotônica.....	20
4.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	22
5. Infecções por hemoparasitos e a biodiversidade de aves.....	23
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1. Locais de estudo.....	27
2. Coleta de sangue.....	28
3. Análises microscópicas.....	28
4. Análises moleculares.....	28
4.1. Extração de DNA.....	28
4.2. Amplificação do gene citocromo b.....	29
4.3. Eletroforese.....	30
RESULTADOS.....	32
1. Análises microscópicas e moleculares (n PCR).....	32
2. Morfologia geral de <i>Plasmodium</i> ( <i>Haemamoeba</i> ) <i>lutzi</i> Lucena, 1939.....	38
DISCUSSÃO.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## RESUMO

Hemosporídeos de aves silvestres são considerados importantes agentes etiológicos e podem causar danos às populações dos hospedeiros. O presente estudo teve como objetivos: determinar a prevalência e a parasitemia para *Plasmodium* spp. *Haemoproteus* spp. de Passeriformes da Mata Atlântica de Minas Gerais, por meio de dois métodos de diagnóstico, microscopia e nested PCR e caracterizar morfológicamente a espécie *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939. Amostras de sangue foram obtidas por punção da veia braquial para preparação de esfregaços que foram fixados em metanol e corados em Giemsa. Foram amostradas 237 aves pertencentes a 18 famílias e 56 espécies da ordem Passeriformes provenientes do IBAMA e capturadas no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (JB-UFJF). A prevalência para *Plasmodium* spp. foi 63,63% em aves do IBAMA e 26,25% em aves do JB-UFJF, apenas três indivíduos encontraram-se parasitados por *Haemoproteus* spp., sendo dois (2,5%) provenientes do IBAMA e um (0,62%) do JB-UFJF. A parasitemia média encontrada para *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foi de 0,08 ( $\pm$  0,08) no IBAMA e 0,05 ( $\pm$  0,04) no JB-UFJF. O maior grau de parasitemia média foi registrado nas espécies *Turdus albicollis*, *Zonotrichia capensis* (0,22%), *Turdus rufiventris* (0,18%  $\pm$  0,29), *Gnorimopsar chopi* (0,1%  $\pm$  0,07) no IBAMA e *Turdus rufiventris* (0,17 %  $\pm$  0,13), *Arremon semitorquatus* (0,11%  $\pm$  0,13) no JB-UFJF. Foi identificada em uma das aves (*A. semitorquatus*), a presença da espécie *Plasmodium (H.) lutzi*, a qual foi morfológicamente caracterizada. A prevalência registrada é considerada alta, entretanto verificou-se uma baixa parasitemia, o que pode estar relacionado à evolução crônica da infecção. Infecções agudas por *Plasmodium* spp. levam ao aparecimento de sinais clínicos com expressão rápida dos sintomas, sendo que nos casos mais graves pode ocorrer a morte do hospedeiro. Visto a elevada prevalência, levantamentos acerca de infecções por hemoparasitos em aves silvestres podem ajudar na elaboração de estratégias de profilaxia e tratamento de doenças parasitárias para a conservação das espécies.

**Palavras-chave:** Aves silvestres, conservação, *Haemoproteus*, malária aviária, nested PCR, *Plasmodium*.

## ABSTRACT

Hemosporidian wild birds are considered important etiological agents and can cause damage to populations of hosts. The present study aimed to: <sup>1</sup>determine prevalence and parasitemia for *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. Passeriformes of the Atlantic Forest of Minas Gerais, through two diagnostic methods, microscopy and nested PCR; and characterize morphologically the species *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939. Blood samples were obtained by puncturing the brachial vein for preparation of smears, fixed in methanol and stained with Giemsa. 237 birds belonging to 18 families and 56 species of the order Passeriformes from IBAMA were sampled and captured in the Botanical Garden of the Universidade Federal de Juiz de Fora (BG-UFJF). The prevalence of *Plasmodium* spp. in birds of IBAMA was 63.63% and 26.25% in birds of BG-FUJF, only three individuals were infected by *Haemoproteus* spp., two (2.5%) from IBAMA and one (0.62 %) of BG-FUJF. The average parasitemia found for *Plasmodium* spp./ *Haemoproteus* spp. was 0.08 ( $\pm$  0.08) at IBAMA and 0.05 ( $\pm$  0.04) in BG-UFJF. The highest degree of mean parasitaemia was recorded in the species *Turdus albicollis*, *Zonotrichia capensis* (0.22%), *Turdus rufiventris* (0.18%  $\pm$  0.29), *Gnorimopsar chopi* (0.1%  $\pm$  0.07) at IBAMA and *Turdus rufiventris* (0.17%  $\pm$  0.13), *Arremon semitorquatus* (0.11%  $\pm$  0.13) in BG-UFJF. Was identified in one of the birds (*A. semitorquatus*) by means of morphology, the presence of *Plasmodium (H.) lutzi* species, which was characterized morphologically. Registered prevalence is considered high, however a low parasitaemia was found, which may be related to chronic course of infection.. Acute infections with *Plasmodium* spp. lead to the onset of clinical signs with rapid symptom expression, and in severe cases death can occur at the host. Since the high prevalence surveys about hemoparasites infections in wild birds can help in developing strategies for prophylaxis and treatment of parasitic diseases to species conservation.

**Keywords:** Avian malaria, conservation, *Haemoproteus*, nested PCR, *Plasmodium*, wild birds.

## INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Parasitos podem exercer uma pressão seletiva sobre os hospedeiros por meio dos efeitos na sobrevivência, sucesso reprodutivo, comportamento e estrutura das comunidades. Fatores bióticos associados aos hospedeiros, como idade, sexo, padrões de migração, forrageamento, estratégias de imunidade e fatores abióticos como condições climáticas e estrutura do habitat influenciam na transmissão dos parasitos (VAN RIPER III et al., 1986; MERINO et al., 2000; MARZAL et al., 2005; BONNEAUD et al., 2009; SEHGAL, 2010; DUNN et al., 2011).

Hemoparasitos causadores da malária aviária (*Plasmodium* spp.) e outros hemosporídeos (*Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.) são um grupo diversificado de parasitos sanguíneos transmitidos por vetores que são abundantes na maioria das famílias de aves. Os parasitos sanguíneos mais comumente encontrados em aves são os que pertencem aos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, sendo que mais de 200 espécies destes hemoparasitos já foram descritos com base na morfologia entre 4.000 espécies de aves estudadas (VALKIUNAS, 2005).

O Brasil apresenta uma diversidade notável de ecossistemas que compõem uma das avifaunas mais ricas do mundo (MARINI, 2005), somente na Mata Atlântica encontram-se 891 espécies de aves, o que representa cerca de 45% das aves encontradas em todo o país (PIVETTA, 2014) as quais podem abrigar uma grande diversidade de hemosporídeos, porém, são escassas as informações sobre estes parasitos em aves do Brasil.

### **1. A ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885)**

Em 1885, o protistologista russo Vassily Danilewsky desempenhou um papel importante no estudo de hemosporídeos. Ao trabalhar com anfíbios, répteis e aves ele descobriu e estudou em grande detalhe a morfologia de vários estádios de desenvolvimento dos protistas intracelulares de sangue, descrevendo e ilustrando parasitos registrados. Os estudos de Danilewsky foram baseados em diferentes grupos de haemosporídeos, mas devido ao fato de não ser taxonomista, não participou da construção da classificação do grupo, que mais tarde foi elaborado por outros estudiosos. No entanto, ele formulou as principais características para a definição da ordem Haemosporida (VALKIUNAS, 2005).

Os hemosporídeos (Apicomplexa: Haemosporida) são protozoários parasitos que se desenvolvem no sangue de animais como anfíbios, répteis, aves e mamíferos e que podem ser caracterizados por apresentar macrogametócitos e microgametócitos que se desenvolvem independentemente, zigoto móvel (ou oocineto), esporozoítos nús e ciclo biológico heteroxeno, onde a esquizogonia ocorre em um hospedeiro vertebrado e a gametogonia e esporogonia em um vetor invertebrado, geralmente artrópodes dípteros hematófagos (REMPLE, 2004).

Na ordem Haemosporida são classificadas as famílias Haemoproteidae, Garniidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae e dentre estas os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* possuem ampla distribuição geográfica e já foram descritos parasitando diversos grupos de aves em todos os continentes com exceção à Antártida (VALKIŪNAS, 2005; SEHGAL, 2010). É o grupo de parasitos sanguíneos mais bem estudado e conhecido devido ao fato de incluir os organismos do gênero *Plasmodium*, os quais são os agentes da malária humana, doença comum em regiões tropicais (VALKIŪNAS, 2005).

Aproximadamente 4.000 espécies de aves já foram avaliadas quanto à presença de hemoparasitos, sendo que mais de 200 espécies de *Haemoproteus*, 96 espécies e variedades de *Leucocytozoon*, 75 espécies e variedades de *Plasmodium* foram descritas com base no ciclo biológico dos parasitos e caracteres morfológicos dos estágios sanguíneos (BENNETT, 1987; VALKIŪNAS, 2005).

Os hemosporídeos possuem grande importância ecológica e são amplamente utilizados em investigações da relação parasito-hospedeiro (LIVELY E DYBDAHL, 2000; KRONE et al., 2008).

Classificação taxonômica dos principais gêneros de hemosporídeos encontrados em aves, segundo VALKIŪNAS (2005):

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

## **2. Ciclo biológico dos gêneros *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 e *Haemoproteus* Kruse, 1890 em aves**

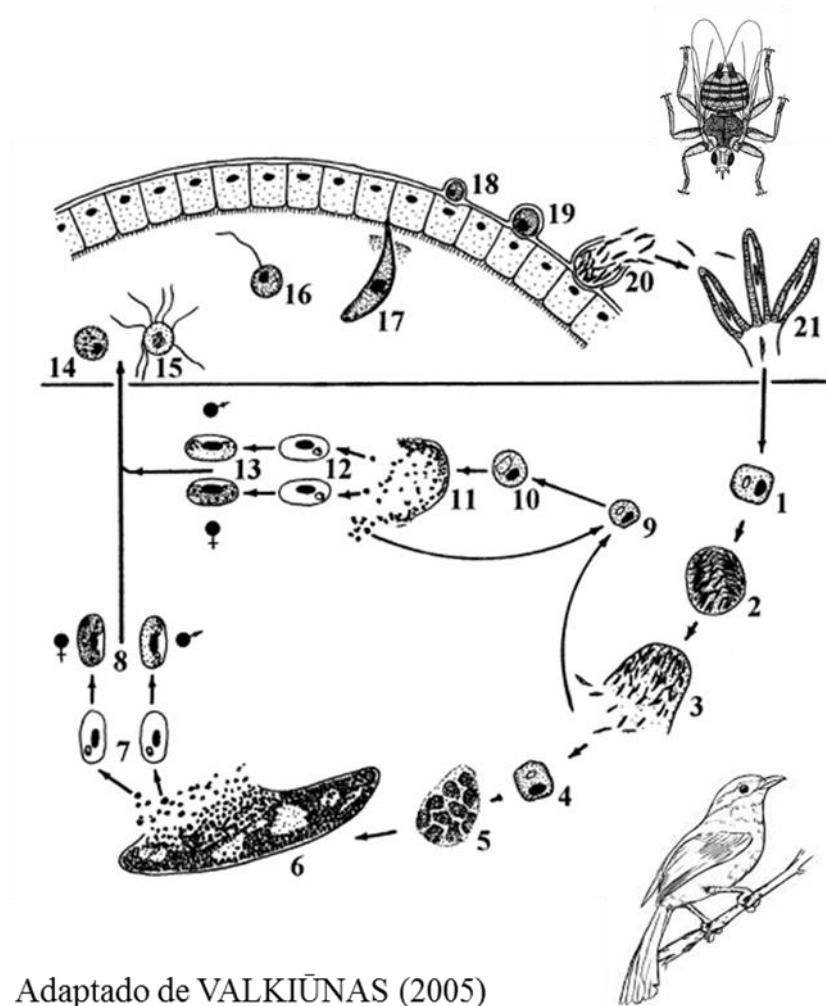
O ciclo biológico dos gêneros *Haemoproteus* (Desenho 1) e *Plasmodium* (Desenho 2) pode ser descrito no ciclo geral dos hemosporídeos aviários, o qual ocorre em três fases, sendo que as fases exoritrocíticas e eritrocíticas ocorrem na ave e a fase esporogônica no inseto vetor (GARNHAM, 1966; REMPLÉ, 2004; VALKIUNAS, 2005). A fase exoeritrocítica inicia-se com a inoculação de esporozoítos, presentes nas glândulas salivares dos dípteros infectados, em aves, durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos podem penetrar ou ser fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), originando, por meio de esquizogonia, a primeira geração de merozoítos. Estes são liberados por ruptura da célula e podem penetrar em outras células do SFM ou células endoteliais de vários órgãos como baço, fígado, cérebro e medula óssea onde, por meio de esquizogonias, dão origem a novos merozoítos que penetram em hemácias, iniciando o ciclo eritrocítico. Durante a fase eritrocítica, os merozoítos que penetram em eritrócitos dividem-se assexuadamente por esquizogonia originando esquizontes, os quais se rompem liberando outros merozoítos. Ao penetrar em outra célula, reiniciam seu desenvolvimento por meio de sucessivas esquizogonias ou diferenciam-se em formas sexuadas, os gametócitos, os quais poderão ser ingeridos pelos dípteros vetores. Essa fase é diferente entre os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, pois no segundo, a esquizogonia só ocorre nos órgãos e apenas gametócitos são encontrados nos eritrócitos (ver Desenho 1), sendo impossível a infecção de hospedeiros vertebrados por sub-inoculação de sangue infectado devido à ausência de merogonia no sangue. Após a ingestão dos 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 (VALKIŪNAS, 2005).

Os parasitos do gênero *haemoproteus* tem como vetores, mosquitos (Diptera: Ceratopogonidae) e moscas (Hipoposcidae) hematófagas e são definidos principalmente pelo seu desenvolvimento intraeritrocitário e produção de grânulos refringentes de pigmento marrom ou preto que são provenientes da digestão da hemoglobina, e caracterizados também pela ausência de reprodução assexuada (esquizogonia) na circulação sanguínea. Assim, as únicas formas encontradas na circulação periférica são os gametócitos (VALKIŪNAS, 2005) (Desenho 1). Outra característica distintiva deste parasito são os enormes esquizontes formados no fígado do vertebrado, que são visíveis a vista desarmada (GARNHAM, 1948).

As espécies de *Haemoproteus* são consideradas hemoparasitos benignos que causam pouco ou nenhum sinal clínico (BENETTI et al., 1993). A anemia é associada como sinal evidente da presença de infecção à fase eritrocítica do parasitismo (CARDONA et al., 2002). De acordo com DONAVAN et al. (2008) a mortalidade de hospedeiros aviários foi evidente na fase pré-eritrocítica, estágios de megalosquizontes, que resultaram em hemorragia hepática, necrose e hepatite.



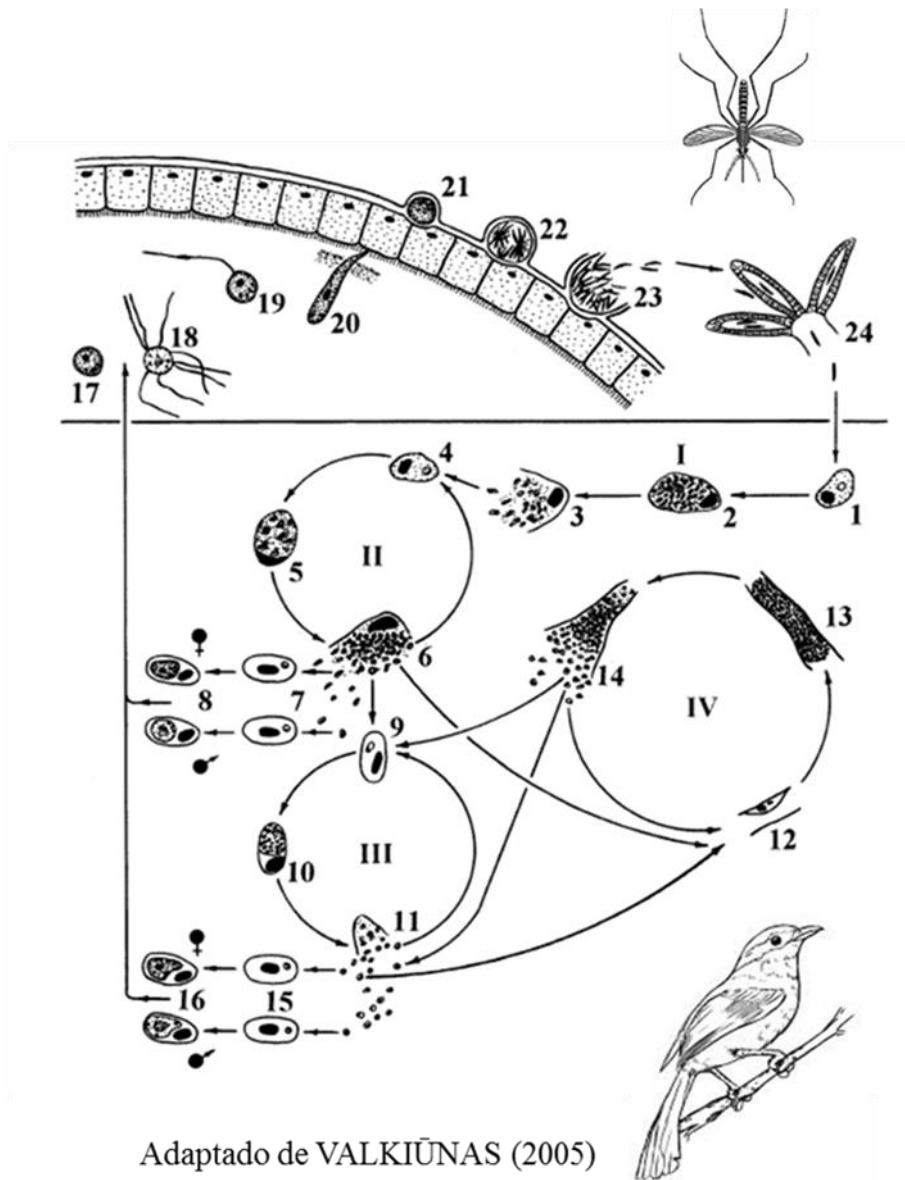


**Desenho 1.** Ciclo biológico do parasito *Haemoproteus* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado: 1 - esporozoítio em células endoteliais; 2, 3 - merontes exo-eritrocíticos primários; 4 - merozoítos em células endoteliais; 5, 6 - crescimento e megalomerontes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 - gametócitos maduros; 9 - merozoítos na célula reticuloendotelial no baço; 10, 11 - crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 - merozoítos em eritrócitos; 13 - gametócitos maduros; 14 - macrogâmata; 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).

Os parasitos do gênero *Plasmodium* são transmitidos para as aves apenas pelas fêmeas dos dípteros devido ao fato de só elas se alimentarem de sangue e, conseqüentemente, participarem da propagação da infecção. A maior parte das espécies de vetor pertencem aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Culiseta*, sendo raras em *Anopheles*. As espécies de *Plasmodium* geram a formação de pigmentos provenientes da digestão de hemoglobina nos eritrócitos das aves infectadas, que são chamados de pigmentos malárico. A esquizogonia ocorre em tecidos endoteliais e na circulação sanguínea (Desenho 2), fazendo com que todas as formas evolutivas do parasito possam ser observadas em esfregaços sanguíneos (VALKIŪNAS, 2005).

Os parasitos do gênero *Plasmodium* são os causadores da malária aviária. A gravidade da doença relaciona-se com a parasitemia e a infecção pode se apresentar em várias fases: pré-patente, onde os parasitos ainda estão se desenvolvendo fora da corrente sanguínea; aguda, caracterizada pelo aparecimento de parasitos na corrente sanguínea e pela crescente parasitemia, com aparecimento de sintomas clínicos; crise, onde a parasitemia atinge o pico; crônica ou latente, as quais apresentam queda nas taxas de parasitemia em consequência do desenvolvimento de resposta imune do hospedeiro, apresentando pouco ou nenhum sinal de infecção. A fase crônica é a mais encontrada na maioria das espécies de aves, que podem permanecer infectadas por toda a vida. Infecções nessa fase são subclínicas, na maioria dos casos, podendo ocorrer recaídas periódicas em condições de estresse fisiológico e/ou ambiental, concomitantes com outras infecções e atividade hormonal (ATKINSON & VAN RIPER, 1991, VALKIŪNAS, 2005).

Aves infectadas apresentam-se geralmente anêmicas, letárgicas, anoréxicas, e apresentam suas penas eriçadas (ATKINSON, 2008). A lesão mais grave, provocada pelas espécies de *Plasmodium* está associada com o bloqueio dos capilares sanguíneos do cérebro e de outros órgãos vitais; os tecidos que envolvem os merontes sofrem anoxia e as células acabam por morrer. A necrose dos tecidos adjacentes aos merontes é normalmente significativa e por vezes, as aves acabam por perecer com sintomas de paralisia cerebral (VALKIŪNAS, 2005).



**Desenho 2.** Ciclo biológico do parasito *Plasmodium* spp. no hospedeiro vertebrado e invertebrado: I, II - merogonia exo-eritrocítica primária; III - merogonia eritrocítica; IV - merogonia exo-eritrocítica secundária; 1 - esporozoítos nas células do retículo endotelial; 2, 3 - criptozoítos; 4 - merozoítos em macrófago; 5, 6 - meta-criptozoítos; 7 - merozoítos no eritrócito; 8 - gametócitos; 9 - merozoítos eritrocíticos; 10, 11 - merontes eritrocíticos; 12 - merozoítos em célula endotelial dos capilares; 13, 14 - fanerozoítos; 15 - merozoítos em eritrócitos; 16 - gametócitos; 17 - macrogameta; 18 - exflagelação de microgametas; 19 - fertilização de macrogameta; 20 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 21 - oocisto jovem; 22, 23 - esporogonia; 24 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor (VALKIŪNAS, 2005).

### 3. Hemoparasitos em aves silvestres do Brasil

Aves em ambiente natural, recém-capturadas ou em cativeiros são frequentemente infectadas por parasitos sanguíneos que desempenham papel decisivo na dinâmica e evolução das comunidades (RICKLEFS, 1992; LIVELY & DYBDAHL, 2000).

Os hemoparasitos podem ser transmitidos entre os hospedeiros a partir do repasto sanguíneo de vetores, quando as formas infectantes podem ser inoculadas na circulação periférica das aves (VALKIŪNAS, 2005). Uma linhagem de parasito pode ser encontrada infectando diversas espécies de hospedeiros (WALDENSTROM et al., 2002). Em regiões áridas, salinas, com baixas temperaturas e de elevada altitude encontra-se baixa prevalência ou até mesmo ausência dos parasitos, devido à escassez dos insetos nesses locais (BENNETT et al., 1993; VALERA et al., 2003).

No Brasil, o primeiro estudo realizado sobre hemoparasitos em aves foi feito por ARAGÃO (1908) em São Paulo, que estudou o ciclo evolutivo de *Haemoproteus columbae* em pombos. Após alguns anos, LUCENA (1939) verificou parasitos sanguíneos em aves silvestres na região de Recife, e LAINSON et al. (1970) diagnosticou parasitos por meio da microscopia óptica com prevalência de 10% em Passeriformes da região Amazônica brasileira.

No estado de São Paulo, BENNETT & LOPES (1980) estudaram 3.449 aves de 195 espécies, encontrando prevalência de 7,8% para hemoparasitos. Neste mesmo estado WOODWORTH-LYNAS et al. (1989) encontraram prevalência de 8,0% de parasitos sanguíneos em estudo realizado com 15.574 aves silvestres e ADRIANO & CORDEIRO (2001) relataram 90% de pombos selvagens infectados por *Haemoproteus columbae*. Estes trabalhos utilizaram como método de diagnóstico análise de esfregaços sanguíneos por microscopia.

Em Minas Gerais, RIBEIRO et al. (2005) registraram prevalência de 39,6 % de infecção por *Plasmodium* spp. em 275 Passeriformes de pequenos e grandes fragmentos da Mata Atlântica. Neste mesmo bioma, SEBAIO et al. (2012) encontraram prevalência de 15,8% de hemoparasitos em aves silvestres.

Em outro estudo, BELO et al. (2007) observaram a ocorrência de infecção por *Plasmodium* spp. entre aves psitacídeos de cativeiro em duas diferentes regiões do Brasil (estados de Minas Gerais e Ceará) e demonstraram ocorrência global de 36%,

associando métodos de diagnóstico direto (microscopia) e amplificação do gene 18SSU do parasito.

LIMA et al. (2010), determinaram a prevalência de 40% de infecção por *Plasmodium spp./Haemoproteus spp.* em aves urbanas de três localidades do Brasil central (Brasília, DF; Uberlândia, MG e Jataí, GO)

BELO et al. (2011) registraram a prevalência de 49,0 % de infecção por *Plasmodium spp./ Haemoproteus spp.* em 676 aves do cerrado do Brasil e LEITE et al. (2013), encontraram 26,15% de infecção por *Plasmodium spp./Haemoproteus spp.* em aves silvestres de uma área urbana de Palmas e de duas unidades de conservação, a prevalencia não diferiu entre a área urbana e as áreas protegidas, estes dois estudos foram realizados no estado do Tocantins.

No trabalho de FECCHIO et al. (2007) foram examinadas 508 aves de 26 espécies do cerrado brasileiro e encontrada prevalência de 6,9% de infecção por *Plasmodium spp.* ou *Haemoproteus*,o que foi considerado uma das menores prevalências registradas para comunidades de aves silvestres na região Neotropical. Em estudo posterior com aves do cerrado, FECCHIO et al. (2011) encontraram prevalência de 10,8% de infecção por *Haemoproteus spp.* e 3,6% por *Plasmodium spp.* Além disso os autores analisaram diferentes fatores relacionados à exposição dos hospedeiros aos vetores destes hemoparasitos, como tamanho e tipo de ninho, massa corporal e socialização das aves e concluíram que características ecológicas das diferentes espécies de aves determinam os padrões de distribuição dos hemoparasitos entre seus hospedeiros.

#### **4. Técnicas de diagnóstico**

##### **4.1. Microscopia fotônica**

A análise de esfregaço sanguíneo sob microscópio fotônico para a identificação de hemoparasitos é um método tradicional de diagnóstico de infecção. A detecção é baseada nas características morfológicas e morfométricas apresentadas por cada parasito em esfregaço de sangue periférico corado com colorações do tipo Romanowsky (colorações Leishman e Giemsa); e para que seja possível uma identificação precisa são necessárias condições de leitura adequadas (FROMONT, 1993; CAMPBELL, 1995; PIERCE, 2008). Este método busca quantificar os hemoparasitos pela distribuição dos

eritrócitos não infectados e dos parasitados com a observação de um determinado número de campos microscópicos ou período de tempo gasto no exame de esfregaços sanguíneos provendo uma estimativa do número de parasitos (VAN RIPER III et al., 1986, VALKIŪNAS et al., 2008).

O conhecimento atual sobre as estratégias básicas da história de vida de hemosporídeos, sua distribuição geográfica e distribuição por hospedeiros, especificidade por hospedeiros e do vetor, mudanças sazonais de infecção, além de outros aspectos da ecologia destes parasitos foram obtidos principalmente a partir de dados gerados pelo método de microscopia (GARNHAM, 1966; BENNETT & LOPES, 1980; ATKINSON & VAN RIPER 1991; FORRESTER & SPALDING, 2003; VALKIŪNAS, 2005).

A maior limitação desse método é a impossibilidade de identificar espécies, mesmo por especialistas, na maioria dos esfregaços. Essa limitação é maior para *Plasmodium* spp em casos de infecções crônicas (baixa intensidade de hemoparasitos) e no caso de infecções mistas (VALKIŪNAS, 2005).

Cinco subgêneros de *Plasmodium* aviários foram descritos utilizando-se métodos tradicionais: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennettinia* (CORRADETTI et al, 1963;. GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005). Dois subgêneros de *Haemoproteus* foram descritos: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus* (VALKIŪNAS, 2005). Estes parasitos estão estritamente relacionados geneticamente, o que não pode ser corroborado por meio da microscopia fotônica apenas (SYNEK et al., 2013).

Análises moleculares recentes tem apoiado conclusões determinadas pelo uso dos métodos tradicionais (microscopia), acrescentando aspectos novos e inovadores para o conhecimento da biologia de hemosporídeos, sobretudo a sua diversidade genética, filogeografia, filogenia e especificidade em relação ao hospedeiro vertebrado (PERKINS & SCHALL, 2002; RICKLEFS et al., 2004;. SEHGAL et al., 2005; KIMURA et al., 2006; KRIŽANAUSKIENĖ et al., 2006; MARTINSEN et al., 2006; BENSCH et al., 2007; PALINAUSKAS et al., 2007; KRONE et al., 2008).

O método de diagnóstico por meio de esfregaço sanguíneo apesar de ser muito trabalhoso, demorado e exigir técnicos especializados para análises minuciosas (BARKER et al., 1992), é ainda considerado essencial para a detecção dos parasitos em aves, sendo utilizado extensivamente como método de diagnóstico padrão (VALKIŪNAS, 2005).

#### 4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os métodos de biologia molecular, principalmente a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são cada vez mais aplicados na detecção de hemoparasitos em aves (KRONE et al., 2008; SEHGAL et al., 2001; VOTÝPKA et al., 2002), especialmente em situações em que pequenos volumes de sangue estão disponíveis. A técnica de PCR pode ser utilizada na caracterização dos hemoparasitos aviários e pode fornecer diagnóstico rápido e confiável, mesmo quando o hospedeiro mostra baixos níveis de parasitismo ou se está infectado por mais de uma espécie de parasito (RICHARD et al., 2002; VALKIŪNAS et al., 2008; CLARK et al., 2009).

Os métodos baseados em PCR para determinar prevalência de infecção por hemosporídios em aves, mostraram-se significativamente mais sensíveis do que a microscopia. Em estudos moleculares realizados por JARVI et al. (2002), a PCR demonstrou sensibilidade de 3 a 4 vezes maior do que a microscopia para detecção de infecções crônicas de parasitos no sangue. DURRANT et al. (2006) relataram que as amostras analisadas por meio das técnicas baseadas em PCR e em esfregaços sanguíneos mostraram diferença na prevalência de hemoparasitos de aproximadamente 10 vezes mais infecções, utilizando técnicas de PCR.

Estudos recentes revelaram que os métodos moleculares, sendo extremamente sensíveis, também tem falhas na detecção de infecções por hemosporídios. Diversos protocolos para o diagnóstico molecular de infecções por *Plasmodium*/*Haemoproteus* já foram desenvolvidos, entretanto, ainda existe grande dificuldade em se diagnosticar infecções mistas pelos dois parasitos em um mesmo hospedeiro. Os ensaios baseados na PCR podem subestimar a prevalência de infecções em aves naturalmente infectadas, sendo a amplificação do DNA do parasito pela PCR frequentemente menor durante as infecções mistas (*Haemoproteus* e *Plasmodium*) (PÉREZ-TRIS & BENSCH, 2005; VALKIŪNAS et al., 2006).

Para facilitar o diagnóstico de amostras contendo infecções mistas, estudos demonstraram ser necessário a construção de iniciadores de regiões altamente conservadas do DNA do parasito para amplificar igualmente espécies de *Haemoproteus* e *Plasmodium* (RICKLEFS et al., 2004; WALDENSTRÖM et al., 2004). Outra forma de diagnosticar infecções mistas por hemosporídeos é a combinação da microscopia

tradicional e métodos baseados em PCR, que pode ser útil também para uma melhor compreensão da biologia destes parasitos (VALKIŪNAS et al., 2006).

A ligação de métodos moleculares e tradicionais (microscopia) é importante, pois esta abordagem proporciona novos conhecimentos para melhor compreensão das doenças letais insuficientemente estudadas causadas por infecções de hemosporídios, particularmente nos estágios exo-eritrocíticos (tecidos) e no vetor (VALKIŪNAS et al., 2014).

## **5. Infecções por hemoparasitos e a biodiversidade de aves**

O aumento da população humana causa transformações na natureza de um modo rápido e sem precedentes. O desmatamento, construções de estradas, ferrovias, hidrelétricas, o uso inadequado de solos devido à invasão agrícola e a expansão dos ambientes urbanos, provocam a fragmentação de florestas e conseqüentemente a perda da biodiversidade (FAHRIG, 2003; FOWLEY et al., 2005; TISCHENDORF et al., 2005; et al., 2008) além disso, interferem nas relações parasito-hospedeiro (LAFERTY & MORRIS, 1996).

Pesquisas tem ligado fragmentação florestal, expansão urbana e mudanças climáticas à introdução de agentes patogênicos e proliferação de doenças infecciosas (LOGIUDICE et al., 2003). À medida que o contato entre espécies silvestres ou mesmo entre o homem e a fauna silvestre aumentam em função de alterações ambientais, eleva-se o risco de infecções (WEISS & MICHAEL, 2004). A introdução de uma infecção ou doença de uma população resistente em uma população susceptível pode causar declínio rápido de populações e diminuir a biodiversidade, uma vez que doenças e parasitos tem sido provavelmente responsáveis por um número considerável de extinções de espécies silvestres (DOBSON & MAY, 1986; MCCALLUM & DOBSON, 1995; BENSCH et al., 2000).

As aves frequentemente são infectadas por hemosporídeos. A patogenia da infecção é variável; os indivíduos infectados apresentam uma fase crônica ou latente de infecção, na qual a resposta imune reduz a parasitemia a níveis baixos e as aves apresentam pouco ou nenhum sinal de infecção e podem permanecer infectadas por toda a vida resistindo a recaídas periódicas (ATKINSON & VAN RIPER, 1991). Entretanto, em infecções agudas (elevada parasitemia), as aves são mais suscetíveis aos predadores, menos hábeis para estabelecer territórios, apresentam alterações na



coloração da plumagem e comprometimento nos padrões de vocalização (ANDERSON & MAY, 1979; LAPOINTE et al., 2012). Isso influencia na sobrevivência e sucesso reprodutivo do animal, podendo levar à extinção de espécies (RICKLEFS, 1992; FELDMAN et al., 1995; LAPOINTE et al., 2012).

Infecções por hemoparasitos causam um forte impacto negativo em seus hospedeiros, especialmente se espécies de aves nativas forem expostas pela primeira vez a algum parasito (BENSCH et al., 2000). Um dos principais exemplos do efeito devastador de uma doença invasiva em aves foi no Havaí, no início do século 20 em que a introdução de uma nova espécie de *Plasmodium* resultou na extinção de aves nativas (DASZAK et al., 2000; DOBSON & FOUFOPOULOS; 2001, HARVELL et al., 2002).

Há registros de parasitismo por hemosporídeos em muitas espécies de aves e famílias, contudo, os Passeriformes são os principais parasitados (VALKIŪNAS, 2005). Na região neotropical, estudos sobre hemosporídeos (*Plasmodium/Haemoproteus*) em Passeriformes avançam lentamente desde o primeiro registro no Panamá, feito por GALINDO & SOUSA (1966), conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais estudos com hemosporídeos (*Haemoproteus* e *Plasmodium*) em aves da ordem Passeriformes da região neotropical.

Localidade geográfica	Método de diagnóstico	Aves analisadas	Aves infectadas	Prevalência (%)	Referências
Panamá	Microscopia	2687	699	26,01	Galindo & Sousa, 1966
Colômbia	Microscopia	62	8	12,9	Bennet et al., 1976
Diversas localidades, região neotropical	Microscopia	8844	1242	14,04	White et al., 1978*
Brasil	Microscopia	3270	150	4,58	Bennet & Lopes, 1980
Panamá	Microscopia	3155	445	14,1	Sousa et al., 1982
Brasil	Microscopia	7565	742	9,8	Woodworth-Lynas et al., 1989
Costa Rica	Microscopia	138	47	34,05	Young et al., 1993
Colômbia	Microscopia	154	16	10,38	Rodríguez & Matta, 2001
Colômbia	Microscopia	159	2	1,25	Matta et al., 2004
Brasil	microscopia/PCR	275	44/109	16/39,63	Ribeiro et al., 2005
México	Microscopia	1593	294	18,45	Garvin et al., 2006
Colômbia	Microscopia	250	23	9,2	Basto et al., 2006
Brasil	Microscopia	508	35	6,88	Fecchio et al., 2007
Colômbia	Microscopia	44	7	15,9	Londoño et al., 2007
Equador	Microscopia	59	26	44,06	Munro et al., 2009
Colômbia	Microscopia	35	12	34,28	Rodríguez et al., 2009
Brasil	PCR	102	13	12,74	Lima et al., 2010
Brasil	Microscopia	759	82	14,4	Fecchio et al., 2011
Brasil	Microscopia	925	111	12	Sebaio et al., 2012
Venezuela	PCR	47	5	10,63	Mijares et al., 2012
Brasil	PCR	2488	540	21,7	Svensson-Coelho et al., 2013
Brasil	Microscopia	177	30	16,94	Leite et al., 2013

\*Revisão sobre hemoparasitos de aves da região neotropical

O Brasil sofre constantemente com a fragmentação de florestas e perda da biodiversidade, principalmente a Mata Atlântica, que é uma das florestas mais ricas em espécies de aves e suporta uma das mais altas taxas de endemismo do planeta. Mais da metade das espécies registradas da Mata Atlântica (476 espécies) pertence à ordem Passeriformes, grupo que reúne 55% das formas conhecidas de aves do planeta, e muitas dessas espécies estão ameaçadas de extinção (PIVETTA, 2014). Pesquisas sobre parasitismo em Passeriformes da Mata Atlântica são necessárias para que a biodiversidade da avifauna seja conservada.

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos: determinar a prevalência e a parasitemia para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. de Passeriformes da Mata Atlântica de Minas Gerais, por meio de dois métodos de diagnóstico, microscopia e *nested* PCR e caracterizar morfológicamente a espécie *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Locais de estudo

As amostras de sangue foram obtidas entre agosto de 2012 e outubro de 2013, de 77 aves mantidas no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em Juiz de Fora, localizado na Av. Prefeito Mello Reis, 1500, bairro Aeroporto, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (21° 45'S, 43° 20'O). As aves provenientes do IBAMA são procedentes de apreensões da região da Zona da Mata, de resgate em situações ambientais de risco ou entregues por moradores da região, em casos de acidentes com os animais. No local, elas são mantidas em recintos fechados, providos de água e alimento e permanecem neste local até serem destinados à soltura, o que frequentemente ocorre em fragmentos de Mata Atlântica próximos ao município de Juiz de Fora. Para realização da coleta de sangue as aves foram contidas por um funcionário do IBAMA durante todo processo de amostragem, depois liberadas no recinto.

Coletas de sangue também foram feitas em 160 aves no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (JB-UFJF), que é um fragmento de Mata Atlântica urbano regenerado situado na região central da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil (21° 45'S, 43° 20'O). No local encontram-se uma lagoa e um riacho central com vasta área de floresta tropical úmida no entorno; precipitação média anual de 1,449 milímetros e temperatura média anual de 20,3°C.

A captura das aves no JB-UFJF foi feita durante os meses de março, abril, maio, julho e dezembro de 2013 e fevereiro de 2014, com o auxílio de redes de neblina de 6 e 12 metros de comprimento, malha de nylon de 36 mm, estendidas em hastes de ferro a altura máxima de 3 metros do chão. As redes foram armadas por cinco dias consecutivos nos meses de coleta e ficaram armadas por volta de 10 horas/dia, do início da manhã ao final da tarde. A inspeção das redes foi realizada em intervalos de 30 minutos para verificação da captura e as aves capturadas foram marcadas, fotografadas, pesadas e examinadas morfometricamente para posterior identificação das espécies. Em seguida, a coleta de sangue foi realizada e os animais foram liberados no local.

Esses métodos de amostragem foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade

Federal de Juiz de Fora, protocolo nº 042/2012, e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), solicitação número 29268-3.

## **2. Coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção da veia braquial de uma das asas do animal, após assepsia com algodão embebido em álcool 70° GL (BRAGA et al., 2010). O volume de sangue recolhido não ultrapassou 1% do peso vivo das aves, segundo recomendação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).

De um a cinco esfregaços sanguíneos foram imediatamente feitos a partir de cada amostra para análise microscópica, sendo que a outra parte do sangue foi armazenada em microtubos mantidos em gelo para análise molecular. As amostras foram levadas ao Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, onde os esfregaços foram fixados em metanol (álcool metílico P.A.) por três minutos, secados e corados em Giemsa (Eosina Azul de Metileno) na diluição de 1:9, durante aproximadamente 40 minutos e os microtubos mantidos a -20°C até o momento da extração de DNA.

## **3. Análises microscópicas**

Os esfregaços sanguíneos foram examinados sob objetiva de imersão em microscópio fotônico Olympus BX-51, aumento (1000x). A parasitemia foi avaliada por contagem do número de parasitos em 10.000 eritrócitos em 100 campos microscópicos formados por uma monocamada celular contendo aproximadamente 100 células (MUÑOZ et al., 1999) e calculada segundo BUSH et al. (1997), a prevalência de infecção foi calculada conforme proposto por SOUZA (1998).

## **4. Análises moleculares**

### **4.1. Extração de DNA**

O DNA total de todas as amostras coletadas foi extraído utilizando-se o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (#96373, Promega, Madison, EUA).

O sangue armazenado foi descongelado e 50-100µL foram colocados em tubos de 1,5mL, no qual adicionaram-se 900µL de solução de lise celular. Os tubos foram invertidos algumas vezes para misturar a solução e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente; agitou-se a mistura de 2-3 vezes durante a incubação; em seguida centrifugou-se por 20 segundos em 13.000-16.000g e o sobrenadante foi descartado, sem causar distúrbio ao *pellet* branco formado no fundo. Os tubos foram agitados vigorosamente utilizando *vortex* (Lab dancer- Ika) para homogeneização por 10-15 segundos e após esse procedimento foram adicionados 300µL de solução de lise nuclear pipetando-se por 5-6 vezes para misturar a solução. Em seguida, adicionaram-se 1,5µL de solução de RNase e encubou-se a 37°C por 15 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 100µL de solução de precipitação de proteína e os tubos foram agitados utilizando *vortex* por 10-20 segundos sendo levados para centrifugação em 13.000-16.000g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol, estes foram invertidos até que as fitas brancas de DNA aparecessem; logo após centrifugou-se em 13.000-16.000g por 1 minuto e todo o líquido presente foi descartado. Assim, os tubos foram colocados invertidos sobre papel absorvente para secar, em seguida adicionaram-se 100µL de solução de re-hidratação de DNA, armazenando-se as amostras com o DNA extraído em temperatura de 2-8°C até o processo de amplificação.

#### **4.2. Amplificação do gene citocromo b**

O DNA extraído foi verificado e quantificado por meio de espectrofotometria de UV (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Para amplificação do gene mitocondrial citocromo b (cyt b) dos hemoparasitos, um protocolo de *nested* PCR segundo MERINO et al. (2008) foi padronizado e aplicado.

Os iniciadores não específicos utilizados na primeira reação foram: 3760F (5'-ATG GAGTGG GTGTTT TAG AT-3') e 4292Rw (5'-TGG AAT AAC ATG TAR AGG AGT-3') para a detecção de parasitos dos gêneros *Haemoproteus* / *Plasmodium* que amplificam 533 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 pb (MERINO et al., 2008).

As reações de PCR consistiram em volume final de 25µL, onde foram utilizados para a primeira reação 12,5µL de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, EUA), 2,5µL de água livre de nuclease que acompanha o kit Go Taq® Green Master Mix, 2,5µL [10µM] do oligonucleotídeo iniciador 3760F, 2,5µL [10µM] do 4292Rw e 5µL de DNA total extraído armazenado em solução de re-hidratação. Para a segunda reação utilizou-se 12,5µL de solução Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, EUA), 9,5µL de água livre de nuclease, 1µL [10µM] de cada oligonucleotídeo iniciador, PF e 4292Rw para o gênero *Plasmodium*, HMR e HML [10µM] para o gênero *Haemoproteus*, e 1µL de DNA produto da primeira reação. Para controle positivo foi utilizada amostra de DNA extraído de *Plasmodium gallinaceum* obtido de cultivo para experimentos e para controle negativo, água livre de nuclease. As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Amplitherm - Thermal Cyclers-) com o programa de amplificação: 5 minutos de *hotstart*, desnaturação 94°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação em 95°C por 40 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e para extensão final, 72°C por 10 minutos.

### 4.3. Eletroforese

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen®) colocando-se 5µL de cada produto da segunda reação juntamente com 2µL de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia®) em cada canaleta do gel, sendo que sempre na primeira e última canaleta adicionaram-se 5µL de padrão de peso molecular 100pb DNA Ladder de 100 a 1.500pb (Promega®) com 2µL do Blue Green.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal, por aproximadamente 40 minutos a 10 V/cm em fonte de alimentação de energia e sistema de transferência (Biorad®), com tampão tris-EDTA-acetato, pH 8,0 (TAE-1x) como fluido condutor de corrida.

Os géis foram colocados sobre aparelho transiluminador com luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia) e sob fotodocumentador (Loccus Biotecnologia) acoplado a um

sistema de captura de imagens para visualização das bandas e análise do DNA amplificado.

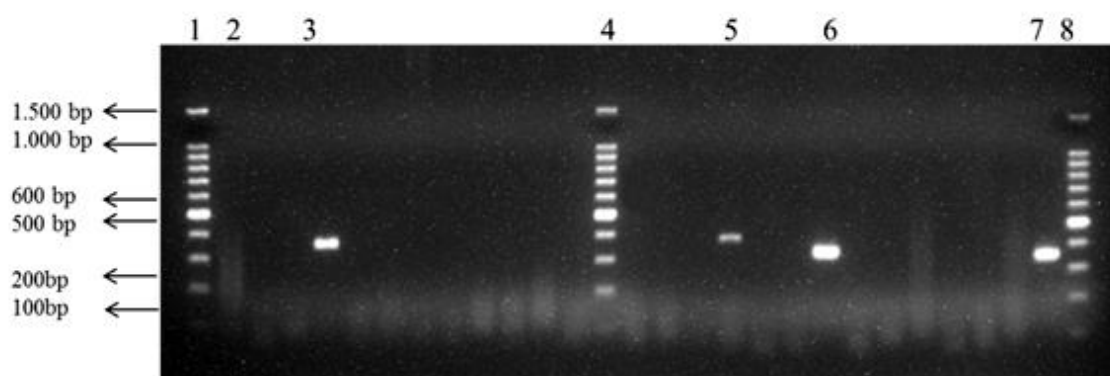


## RESULTADOS

Foram analisadas 237 amostras de sangue de aves da ordem Passeriformes pertencentes a 18 famílias e 56 espécies, dentre as espécies, oito são endêmicas do Brasil e cinco da Mata Atlântica (ICMBIO, 2014). No IBAMA foram examinadas 77 aves de seis famílias e 17 espécies, no JB-UFJF foram examinadas 160 aves de 15 famílias e 38 espécies (Tabela 2). As aves foram examinadas por meio de ambos os métodos de diagnóstico, microscopia e *nested* PCR.

### 1. Análises microscópicas e moleculares (n PCR)

A prevalência geral de infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. pelas análises microscópicas foi de 38,81% (92 indivíduos) e pela *nested* PCR foi de 45,14% (107 indivíduos). Na Fotografia 1, observa-se gel de agarose mostrando os produtos de amplificação do gene citocromo b de *Plasmodium* spp. por *nested* PCR.



**Fotografia 1.** Gel de agarose 2% mostrando os produtos de amplificação de um fragmento do gene citocromo b de *Plasmodium* spp. por *nested*-PCR. 1,4,8: padrão; 2: controle negativo; 3, 5, 6: amostras positivas; 7: controle positivo (*P. galinaceum*).

As aves examinadas do IBAMA pelo método microscópico apresentaram prevalência geral de infecção de 64,93% (50 indivíduos), sendo que 49 aves (63,63%) estavam infectadas por *Plasmodium* spp. e duas (2,5%) por *Haemoproteus* spp., destas, uma ave (*Turdus rufiventris* Vieillot, 1818) apresentou infecção mista. Pelo método de

diagnóstico *nested* PCR a prevalência de infecção por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foi de 70,12% (54 indivíduos) (Tabela 2).

No JB-UFJF foi registrada pela microscopia a prevalência de infecção de 26,25% (42 indivíduos) por *Plasmodium* spp., sendo que um destes indivíduos (*Turdus rufiventris*) também estava infectado por *Haemoproteus* spp. A *nested* PCR revelou prevalência de infecção de 33,12% (53 indivíduos) por *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. (Tabela 2).

A parasitemia média encontrada para *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. foi de 0,08 ( $\pm$  0,08) no IBAMA e 0,05 ( $\pm$  0,04) no JB-UFJF. As maiores parasitemias médias foram registradas nas espécies *Turdus albicollis* Vieillot, 1818 (0,24%), *Zonotrichia capensis* (Statius Muller, 1776) (0,22%), *Turdus rufiventris* (0,18%  $\pm$  0,29), *Gnorimopsar chopi* (Vieillot, 1819) (0,1%  $\pm$  0,07) no IBAMA e *Turdus rufiventris* (0,17 %  $\pm$  0,13), *Arremon semitorquatus* Swainson, 1838 (0,11%  $\pm$  0,13) no JB-UFJF (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parasitismo por *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. em Passeriformes mantidos pelo IBAMA-JF e do JB-UFJF, diagnosticados por microscopia e nPCR.

Famílias/espécies	Nº aves examinadas	Nº aves examinadas IBAMA	M	PCR	Parasitemia média (%)	Nº aves examinadas JB-UFJF	M	PCR	Parasitemia Média (%)
<b>Thamnophilidae</b>	<b>8</b>								
<i>Thamnophilus caerulescens</i> Vieillot, 1816	8					8	2	2	0,03
<b>Conophagidae</b>	<b>1</b>								
<i>Conophaga lineata</i> (Wied, 1831)	1					1		1	
<b>Dendrocolaptidae</b>	<b>12</b>								
<i>Lepidocolaptes squamatus</i> (Lichtenstein, 1822) <sup>1</sup>	7					7	1	2	0,01
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i> (Vieillot, 1818)	1					1		1	
<i>Sittasomus griseicapillus</i> (Vieillot, 1818)	3					3	1	1	0,05
<i>Xenops rutilans</i> Temminck, 1821	1					1	1	1	0,02
<b>Furnariidae</b>	<b>2</b>								
<i>Lochmias nematura</i> (Lichtenstein, 1823)	1					1			
<i>Cranioleuca pallida</i> (Wied, 1831) <sup>1</sup>	1					1		1	
<b>Pipridae</b>	<b>19</b>								
<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1793)	19					19	3	6	0,06
<b>Tityridae</b>	<b>2</b>								
<i>Pachyramphus castaneus</i> (Jardine & Selby, 1827)	2					2			
<b>Platyrinchidae</b>	<b>1</b>								
<i>Platyrinchus mystaceus</i> Vieillot, 1818	1					1			
<b>Rhynchocyclidae</b>	<b>4</b>								
<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis, 1846	4					4			
<b>Tyrannidae</b>	<b>21</b>								
<i>Phyllomyias fasciatus</i> (Thunberg, 1822)	4					4			
<i>Attila rufus</i> (Vieillot, 1819) <sup>1</sup>	3					3			
<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin, 1789)	5					5			

<b>Famílias/espécies</b>	<b>Nº aves examinadas</b>	<b>Nº aves examinadas IBAMA</b>	<b>M</b>	<b>PCR</b>	<b>Parasitemia média (%)</b>	<b>Nº aves examinadas JB-UFJF</b>	<b>M</b>	<b>PCR</b>	<b>Parasitemia Média (%)</b>
<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	3					3	1	2	0,04
<i>Megarynchus pitangua</i> (Linnaeus, 1766)	2					2			
<i>Myiozetetes similis</i> (Spix, 1825)	2					2	1	1	0,02
<i>Myiophobus fasciatus</i> (Statius Muller, 1776)	1					1		1	
<i>Lathrotriccus euleri</i> (Cabanis, 1868)	1					1		1	
<b>Vireonidae</b>	<b>1</b>								
<i>Cyclarhis gujanensis</i> (Gmelin, 1789)	1					1			
<b>Troglodytidae</b>	<b>2</b>								
<i>Troglodytes musculus</i> Naumann, 1823	2					2			
<b>Turdidae</b>	<b>33</b>								
<i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818	1	1							
<i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	5					5	3	4	0,08
<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	25	4	4	4	0,18**	21	12	9	0,17**
<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	1					1		1	
<i>Turdus albicollis</i> Vieillot, 1818	1	1	1	1	0,24				
<b>Mimidae</b>	<b>1</b>								
<i>Mimus gilvus</i> (Vieillot,1807)	1	1							
<b>Passerellidae</b>	<b>5</b>								
<i>Zonotrichia capensis</i> (Statius Muller, 1776)	1	1	1	1	0,22 *				
<i>Arremon semitorquatus</i> Swainson, 1838 <sup>1</sup>	4					4	4	4	0,11
<b>Parulidae</b>	<b>3</b>								
<i>Basileuterus culicivorus</i> (Deppe, 1830)	3					3			
<b>Icteridae</b>	<b>17</b>								
<i>Icterus jamacaii</i> (Gmelin, 1788)	2	2		2					

<b>Famílias/espécies</b>	<b>Nº aves examinadas</b>	<b>Nº aves examinadas IBAMA</b>	<b>M</b>	<b>PCR</b>	<b>Parasitemia média (%)</b>	<b>Nº aves examinadas JB-UFJF</b>	<b>M</b>	<b>PCR</b>	<b>Parasitemia Média (%)</b>
<i>Gnorimopsar chopi</i> (Vieillot, 1819)	14	14	9	10	0,1				
<i>Chrysomus ruficapillus</i> (Vieillot, 1819)	1	1	1	1	0,08				
<b>Thraupidae</b>	<b>101</b>								
<i>Coereba flaveola</i> (Linnaeus, 1758)	9					9			
<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye, 1837	37	34	23	24	0,03	3			
<i>Saltator fuliginosus</i> (Daudin, 1800)	1	1							
<i>Nemosia pileata</i> (Boddaert, 1783)	1					1			
<i>Tachyphonus coronatus</i> (Vieillot, 1822)	23					23	8	11	0,05
<i>Ramphocelus bresilius</i> (Linnaeus, 1766)	4					4	2	2	0,04
<i>Lanio pileatus</i> (Wied, 1821)	1	1							
<i>Lanio melanops</i> (Vieillot, 1818)	5					5	2	1	0,04
<i>Tangara cyanoventris</i> (Vieillot, 1819)	1					1			
<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)	3					3			
<i>Tangara palmarum</i> (Wied, 1823)	2					2		1	
<i>Tangara ornata</i> (Sparrman, 1789) <sup>†</sup>	1	1	1	1	0,03				
<i>Schistochlamys ruficapillus</i> (Vieillot, 1817)	1	1	1	1	0,01				
<i>Paroaria coronata</i> (Miller, 1776)	1	1	1	1	0,02				
<i>Tersina viridis</i> (Illiger, 1811)	1	1	1	1	0,03				
<i>Dacnis cayana</i> (Linnaeus, 1766)	2	1	1	1	0,05	1			
<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	4	4	2	2	0,02				
<i>Sporophila frontalis</i> (Verreaux, 1869)	1	1							
<i>Sporophila lineola</i> (Linnaeus, 1758)	1	1	1	1	0,03				
<i>Sporophila caerulescens</i> (Vieillot, 1823)	1					1	1		0,04

Famílias/espécies	Nº aves examinadas	Nº aves examinadas IBAMA	M	PCR	Parasitemia média (%)	Nº aves examinadas JB-UFJF	M	PCR	Parasitemia Média (%)
<i>Sporophila leucoptera</i> (Vieillot, 1817)	1	1	1	1	0,06				
<b>Cardinalidae</b>	<b>4</b>								
<i>Cyanoloxia brissonii</i> (Lichtenstein, 1823)	4	4	2	2	0,04				
<b>Total</b>	<b>237</b>	<b>77</b>	<b>50</b>	<b>54</b>	<b>0,08</b>	<b>160</b>	<b>42</b>	<b>53</b>	<b>0,05</b>
<b>Prevalência Total M e PCR (%)</b>			<b>64,93</b>	<b>70,12</b>			<b>26,25</b>	<b>33,12</b>	

\* Espécime infectado somente por *Haemoproteus* spp.; \*\* Um espécime infectado por *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp.; M: exame microscópico; PCR: diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase; <sup>1</sup>espécies endêmicas Mata Atlântica.

A análise de esfregaços sanguíneos demonstrou a ocorrência de todas as formas evolutivas de *Plasmodium* spp., sendo os trofozoítos a forma evolutiva mais comumente observada (Prancha I); também foram observados macrogametócitos e microgametócitos de *Haemoproteus* spp. (Prancha II). Ainda, por meio da microscopia, foi possível identificar a espécie *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 infectando a ave *Arremon semitorquatus* Swainson, 1838, então, foram analisadas todas as formas evolutivas deste parasito e o mesmo foi caracterizado em detalhe.

## **2. Morfologia geral de *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 (Prancha III)**

**Trofozoítos:** Os trofozoítos de *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* foram frequentemente observados em eritrócitos jovens (Prancha III, Figura A), mas também foram encontrados em eritrócitos maduros (Prancha III, Figura B); trofozoítos jovens são arredondados (Prancha III, Figura A, B) e não possuem posição específica no eritrócito; muitos trofozoítos não apresentam o típico formato em anel (Prancha III, Figura A, B); trofozoítos maduros possuem formato indefinido (Prancha III, Figura C) e frequentemente ocupam a região polar ou subpolar do eritrócito; alguns apresentam um pequeno vacúolo no citoplasma; o núcleo é largo; apresentam grânulos de pigmentos marrom-escuros e estes estão agrupados em uma massa na margem do parasito; foi observado mais de um trofozoíto infectando um único eritrócito (Prancha III, Figura C).

**Esquizontes:** Os esquizontes foram encontrados tanto em eritrócitos jovens como em eritrócitos maduros (Prancha III, Figura D); vacúolos citoplasmáticos usualmente não estão presentes; quando o esquizonte se desenvolve, o núcleo do parasito decresce em tamanho e a basofilia do citoplasma também decresce; frequentemente apresentam o formato oval (Prancha III, Figura D, E), mas podem apresentar formato irregular; em esquizontes maduros, o núcleo não apresenta posição definida; esquizontes maduros apresentam de seis a 26 merozoítos, deformam os eritrócitos (Prancha III, Figura D-F) e frequentemente deslocam o núcleo dos mesmos (Prancha III, Figura D, E); podem, ainda, anuclear eritrócitos (Prancha III, Figura F).

**Macrogametócitos:** Os macrogametócitos foram encontrados tanto em eritrócitos jovens como em eritrócitos maduros; o citoplasma é homogêneo (Prancha III, Figura

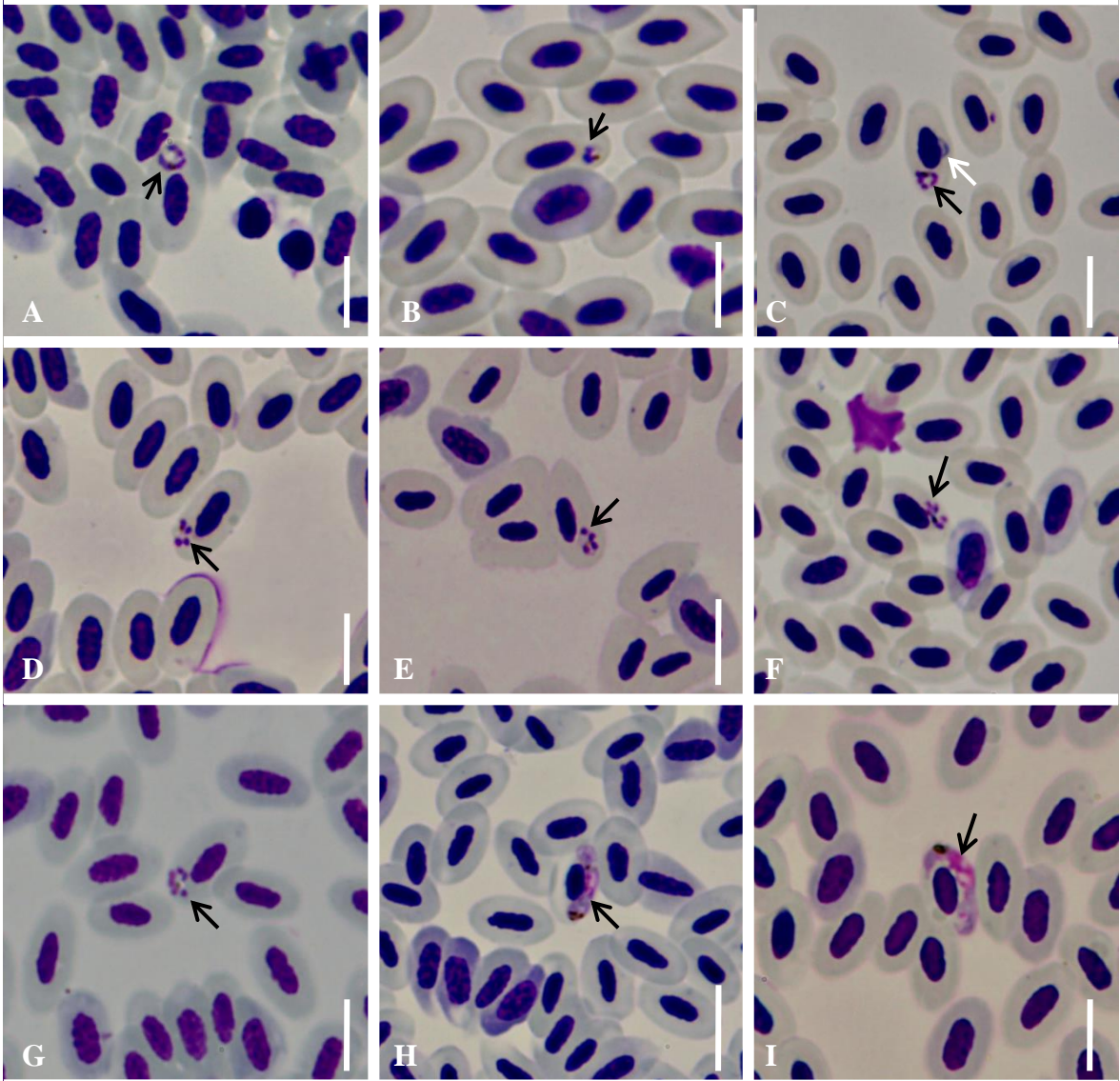
G), porém, alguns apresentam pequenos vacúolos (Prancha III, Figura H, I); gametócitos jovens são morfológicamente idênticos a trofozoítos; gametócitos maduros são frequentemente redondos ou ovais, porém, alguns apresentam formato irregular (Prancha III, Figura J, L); o núcleo do parasito é compacto, variável em forma, usualmente em posição subcentral (Prancha III, Figura G-L); os grânulos de pigmento são arredondados, usualmente de pequeno tamanho (de 0,5  $\mu\text{m}$  a 1  $\mu\text{m}$ ) e claramente agrupados na margem do parasito (Prancha III, Figura G-L); alguns apresentam pigmentos espalhados pelo citoplasma (Prancha III, Figura M); geralmente, o número de grânulos de pigmentos é 15; macrogametócitos deformam os eritrócitos e frequentemente deslocam o núcleo dos mesmos (Prancha III, Figura N); podem, ainda, anuclear eritrócitos (Prancha III, Figura O).

**Microgametócitos:** Os microgametócitos são morfológicamente semelhantes aos macrogametócitos, diferindo apenas na coloração do citoplasma e na distribuição dos grânulos de pigmentos (Prancha III, Figura P).



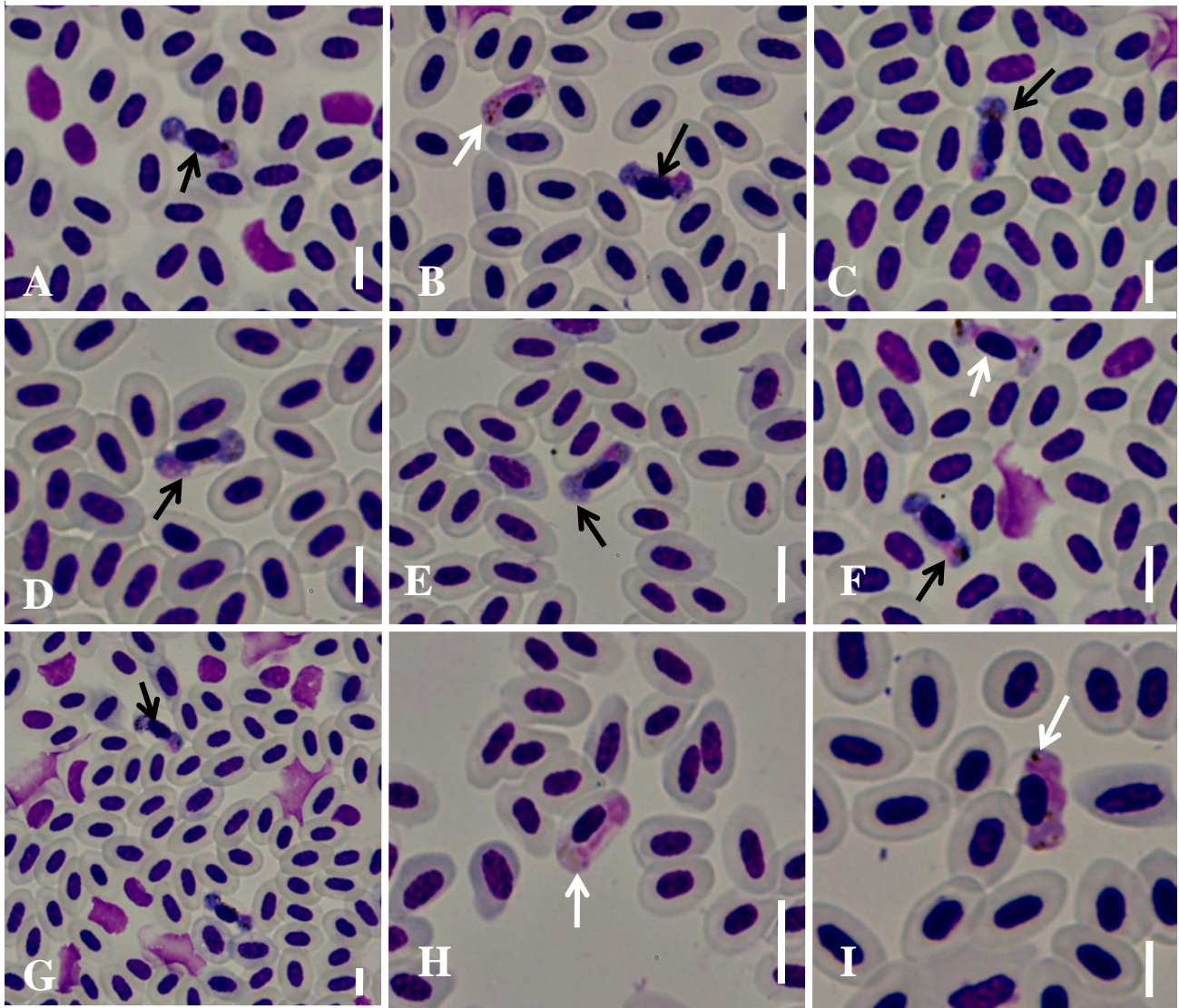
## PRANCHA I

Formas evolutivas de *Plasmodium* spp. encontradas nos esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, de aves silvestres provenientes do IBAMA e capturadas no JB-UFJF. As setas indicam em A, B, C: trofozoítos; D-G: esquizontes; H-I: gametócitos (Aumento 600X; Barras: 10 $\mu$ m).



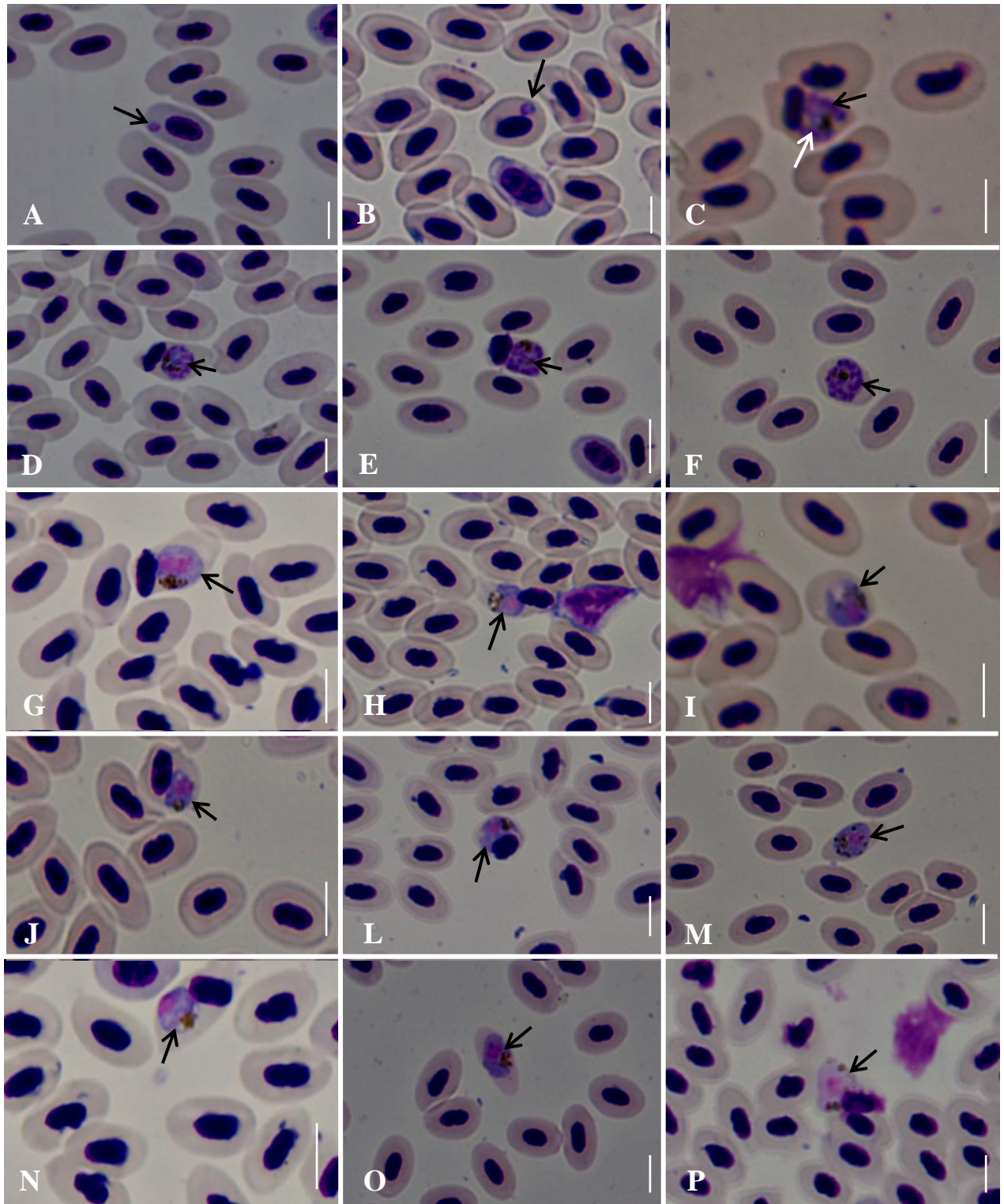
## **PRANCHA II**

Macrogametócitos e microgametócitos de *Haemoproteus* spp. encontrados nos esfregaços sanguíneos corados em Giemsa, de aves silvestres provenientes do IBAMA e capturadas no JB-UFJF. As setas pretas indicam macrogametócitos e as setas brancas indicam microgametócitos (Aumento: 600X; Barras: 10µm).



### PRANCHA III

Formas evolutivas de *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* encontradas nos esfregaços sanguíneos corados em Giemsa da ave *Arremon sequitorquatus*. A-C: trofozoítos; D-F: esquizontes; G-O: macrogametócitos e P: microgametócito (Aumento: 600X; Barras: 10µm).



## DISCUSSÃO

As espécies de aves amostradas representam 6,4% da riqueza das aves da Mata Atlântica, 12% dos Passeriformes e 2,3% das espécies endêmicas no bioma. Esses números são representativos, visto que a Mata Atlântica perdeu 90% de sua extensão original desde a colonização e possui 45% de todas as espécies de aves encontradas no Brasil. O número de espécies que estão ameaçadas neste bioma é exorbitante ao se comparar com o total de espécies ameaçadas no país, são 233 aves em risco de extinção no Brasil e dessas, 147 são endêmicas ou quase endêmicas da Mata Atlântica (PIVETTA, 2014).

A prevalência de infecção por hemoparasitos (*Plasmodium* spp./ *Haemoproteus* spp.) encontrada neste trabalho é considerada alta em comparação com outros estudos realizados no Brasil com o mesmo grupo de aves; registrou-se 38,81% de infecção geral por meio da microscopia e 45,14% pela *nested* PCR. WOODWORTH-LYNAS et al. (1989) registraram que 9,8% das aves examinadas em três regiões de São Paulo estavam infectadas por *Plasmodium* spp./ *Haemoproteus* spp., FECCHIO et al. (2007, 2011) estudando aves do Cerrado, registraram prevalência de 6,88% e 10,8% respectivamente. Da mesma forma, SEBAIO et al. (2012) encontraram prevalência de 12% de infecção em aves da Mata Atlântica de Minas Gerais. Estes estudos utilizaram como método de diagnóstico apenas a microscopia óptica.

Contudo, a alta prevalência registrada neste trabalho diz respeito a infecções causadas por *Plasmodium* spp., 63,63% no IBAMA e 26,25% no JB-UFJF, visto que, apenas dois indivíduos (2,5%) do IBAMA e um (0,62%) do JB-UFJF estavam infectados por *Haemoproteus* spp. A baixa infecção por *Haemoproteus* spp. pode estar relacionada à exposição dos hospedeiros aos vetores, já que os dípteros transmissores de *Haemoproteus* spp. são diferentes dos transmissores de *Plasmodium* spp. É provável que na região estudada, seja menor a distribuição de moscas hematófagas (Hippodocidae), que são os vetores de *Haemoproteus* spp. Segundo SOL et al. (2000) evidências experimentais suportam a visão de que a abundância dos vetores é o principal fator a influenciar a variação espacial na prevalência de hemoparasitos.

O único estudo realizado com aves Passeriformes em ambiente natural no Brasil que encontrou prevalência maior de infecção por *Plasmodium* spp. que a encontrada neste trabalho, foi realizado por RIBEIRO et al. (2005) registrando prevalência de 39,63% de infecção por meio da *nested* PCR, porém os resultados obtidos pela análise

microscópica foi significativamente menor (16%). Apesar de outros estudos também demonstrarem discrepâncias na prevalência de hemoparasitos detectada pela microscopia e PCR (VALKIŪNAS et al., 2006; PÉREZ-TRIS et al., 2007; KRONE et al., 2008; BONNEAUD et al., 2009), no presente estudo não houve diferença significativa entre os métodos de diagnóstico.

A nested PCR foi utilizada para confirmar os resultados obtidos pela microscopia, pois segundo GARAMSZEGI et al. (2010), o número de campos examinados nas análises microscópicas pode influenciar o diagnóstico em infecções crônicas, principalmente para organismos do gênero *Plasmodium*.

Neste estudo, observou-se que algumas amostras que se encontraram positivas pelo exame microscópico não foram amplificadas pela *nested* PCR. O que pode ser explicado pela falta de qualidade na extração de DNA, assim como proposto por BELO (2007), ou também, devido à ineficiência dos iniciadores utilizados, no caso de infecções mistas, como proposto por MERINO et al. (2008).

De acordo com MARTINEZ et al. (2009), a identidade destes iniciadores não é completa com todas as linhagens dos parasitos para os quais seriam específicos; o iniciador HML pode cruzar com duas sequências de *Plasmodium* spp. e o PF com sete sequências de *Haemoproteus* spp.. Assim, na grande maioria dos casos esse teste de PCR é válido, mas tem uma taxa de erros possível, de cerca de 3%; sendo que o sequenciamento de amostras positivas pode auxiliar na discriminação dos gêneros.

Dessa forma, para se obter uma estimativa precisa da prevalência de infecções por hemosporídeos em aves, VALKIŪNAS et al. (2008) recomendam a utilização combinada de ambos os métodos de diagnóstico.

As parasitemias médias totais encontradas para *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. de 0,08 ( $\pm$  0,08) no IBAMA e 0,05 ( $\pm$  0,04) no JB-UFJF, podem ser consideradas baixas quando comparada com outros estudos, como por exemplo, RIBEIRO et al., (2005) e TOSTES (2013) que encontraram parasitemia média de infecção por *Plasmodium* spp. de 2,3% e 1,51% respectivamente. A parasitemia pode estar relacionada à patogenicidade de infecção, que na maioria dos casos é subclínica, sendo que, o aparecimento de sintomas clínicos pode estar associado a infecções agudas, onde há aumento expressivo da parasitemia (ATKINSON et al., 1995).

As maiores parasitemias médias registradas nas espécies *Turdus albicollis* (0,24%), *Zonotrichia capensis* (0,22%), *Turdus rufiventris* (0,18%  $\pm$  0,29) e *Gnorimopsar chopi* (0,1%  $\pm$  0,07) no IBAMA podem estar relacionadas à maior



exposição aos parasitos em níveis de congregação animal. BENNETT et al. (1978) e TELLA (2002) mostraram que espécies de aves coloniais tinham níveis mais altos de parasitos do que espécies solitárias, isso pode associar-se com as condições em que as aves são mantidas no IBAMA, onde são colocadas juntas em viveiros ou próximas umas às outras. Assim, uma vez que o vetor se alimenta em uma ave infectada, pode haver transmissão subsequente de hemoparasitos para as outras aves e a re-infecção nesses locais pode ser freqüente, mantendo os níveis de parasitemia altos.

As maiores parasitemias em *Turdus rufiventris* (0,17 %  $\pm$  0,13) e *Arremon semitorquatus* (0,11%  $\pm$  0,13) no JB-UFJF pode estar relacionada ao hábito de vida dessas espécies, os quais, por serem generalistas, apresentam hábitos alimentares variados, altas taxas de crescimento e alto potencial de dispersão, fatores estes que podem levar a maior exposição dessas espécies aos vetores em relação às espécies que tem hábitos especialistas.

Além disso, o tipo de nidificação também pode estar relacionado aos níveis de parasitemia. FECCHIO (2011) demonstrou que espécies de aves que constroem ninhos fechados (incluindo ninhos em cavidades) foram mais parasitadas por *Plasmodium*. Espécies de *Plasmodium* desenvolvem-se apenas em dípteros dos gêneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta* e *Mansonia* (VALKIŪNAS, 2005). O comportamento de procura pelo hospedeiro nesses insetos é mediado por odor, sendo o dióxido de carbono o principal, ou em combinação com outros compostos voláteis emitidos pelos hospedeiros (GIBSON & TORR, 1997; TAKKEN & KNOLS, 1999). De acordo com SICK (1997) *Turdus rufiventres* constrói ninhos fundos de paredes grossas e *Arremon semitorquatus* ninhos bem acabados, de construção sólida formando uma câmara no interior, o que pode levar ao acúmulo de compostos voláteis aumentando as chances dos vetores encontrarem o hospedeiro.

A análise microscópica de esfregaços sanguíneos permitiu a visualização de características morfológicas de diferentes fases evolutivas dos hemoparasitos em estudo, esse método ainda é um parâmetro muito utilizado para classificar espécies de hemosporídeos em aves. Neste trabalho foi possível identificar o parasito *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939, em uma ave da espécie *Arremon semitorquatus*.

*Plasmodium (H.) lutzi* foi primeiramente observado por Lutz & Meyer em 1908 em aves da espécie *Aramides cajaneus* (Statius Muller, 1776) (Gruiformes) no Brasil, sendo descrita posteriormente por LUCENA (1939), que o encontrou na mesma espécie de ave. RENJIFO et al. (1952) relataram parasitos semelhantes a *P. (H.) relictum* na

mesma espécie de ave na Colômbia. Contudo, GABALDÓN & ULLOA (1976), que encontraram este parasito na mesma ave em três locais na Venezuela, informaram que os parasitos encontrados na Colômbia por RENJIFO et al. (1952) eram possivelmente a espécie *P. (H.) lutzi*. MANTILLA et al. (2013) encontraram *P. (H.) lutzi* parasitando *Turdus fuscater* d'Orbigny&Lafresnaye, 1837 (Passeriformes) na Colômbia. Dessa forma, este é o primeiro registro de *P. (H.) lutzi* parasitando a espécie *Arremon semitorquatus* e o primeiro registro deste parasito em aves da ordem Passeriformes no Brasil, sendo esses dados importantes para ampliar os conhecimentos acerca da distribuição geográfica deste parasito.

Os caracteres morfológicos de *P. (H.) lutzi* foram descritos por LUCENA (1939) e reproduzidos por VALKIŪNAS (2005). Segundos os autores, os principais caracteres de importância taxonômica nesta espécie são os trofozoítos, esquizontes e gametócitos arredondados contendo grânulos de pigmento marrom-escuros frequentemente agrupados na margem do parasito. Tais características foram observadas durante análise dos esfregaços sanguíneos de *A. semitorquatus*.

MANTILLA et al. (2013) redescreveram a espécie destacando estas características morfológicas principais, porém, na descrição original, há relato da ocorrência de outras conformações em cada uma das formas evolutivas, que não foram registradas na redescricao. Dentre estas diferenças, podemos destacar trofozoítos sem o formato típico em anel; esquizontes e gametócitos com formato irregular e contendo grânulos de pigmentos dispersos pelo citoplasma. Estas diferenças foram observadas neste trabalho. O relato e registro fotomicrográfico destas variações morfológicas são importantes para estudos subsequentes que visem a caracterização do *P. (H.) lutzi*, pois facilitam a identificação do parasito.

A infecção por hemosporídeos, principalmente por parasitos do gênero *Plasmodium* pode ter forte impacto negativo sobre o hospedeiro, sobretudo quando uma espécie de ave é exposta ao parasito pela primeira vez (VAN RIPER III et al., 1986) como por exemplo, no Brasil, pinguins *Spheniscus magellanicus* (Foster, 1781), morreram em um zoológico com infecção malárica causada por *Plasmodium relictum* (BUENO et al., 2010) e no Havaí, aves nativas foram extintas devido à introdução de uma espécie de *Plasmodium* (BENSH et al., 2000).

Além desses impactos diretos, em que infecções por hemoparasitos podem levar à morte e extinção do hospedeiro, o parasitismo pode ter efeitos subclínicos e indiretos com efeitos a longo prazo sobre os processos ecológicos, evolutivos e comportamentais

como modificações no voo, sucesso reprodutivo, migração, capacidade competitiva e forrageamento (GARAMSEGI, 2005; MARINI, 2005; MARZAL et al., 2005).

Estudos realizados por VOTYPKA et al. (2003) com Passeriformes, demonstraram que as fêmeas infectadas por hemoparasitos, iniciaram o período de reprodução mais tarde do que fêmeas não infectadas, sendo que o estado nutricional das fêmeas pode influenciar no momento da reprodução. Além disso, protozoários hemoparasitos podem competir por energia, pelo consumo de grande variedade de metabólitos do hospedeiro, como a hemoglobina, e afetando tecidos como o fígado, baço, pulmões, coração ou cérebro (BENNETT et al., 1993, FARGALLO & MERINO, 1999; FIGUEROLA et al., 1999), influenciando dessa forma, o momento da postura. Isso pode afetar outras características reprodutivas, tais como tamanho da ninhada, sobrevivência e número de filhotes (SVENSSON, 1995, NILSSON 1999).

GILMAN et al. (2007) estudaram a influência do parasitismo sobre a vocalização de Passeriformes e descobriram que os animais infectados por *Plasmodium* spp. vocalizavam menos em resposta a playbacks experimentais. Mudanças induzidas pelo parasito em frequência ou qualidade da vocalização podem afetar a seleção de parceiros pelas fêmeas.

A infecção por hemosporídeos envolve todos os fatores intrínsecos relatados anteriormente, mas relaciona-se também com fatores extrínsecos como as alterações ambientais, a fragmentação de habitats e mudanças climáticas, que podem influenciar as trajetórias evolutivas dos parasitos, afetando interações entre o patógeno e o vetor díptero e o hospedeiro (SEHGAL, 2010; TABACHNICK, 2010; MASSAD et al., 2011; LAPOINTE et al., 2012).

A fragmentação florestal aumenta a possibilidade de interações entre vetores e hospedeiros, principalmente em áreas de conservação que se situam dentro de áreas urbanas ou agrícolas, com estradas e ambientes abertos, o que pode aumentar a abundância e dispersão de vetores dentro dos habitats de aves florestais nativas (LAPOINTE et al., 2012). Segundo SAMUEL et al. (2011) ambientes que propiciam o desenvolvimento de larvas de mosquitos é um fator importante na determinação das taxas de transmissão e de prevalência de infecções por hemosporídeos em ambientes florestais.

O JB-UFJF é uma área florestal atingida pela fragmentação situada no centro de Juiz de Fora com ambientes propícios (lagos, córregos) e temperatura adequada para o desenvolvimento de vetores de hemosporídeos, além do mais, é um dos locais de soltura

de aves mantidas pelo IBAMA, as quais ao serem reintroduzidas podem levar infecções para esse ambiente natural e causar impacto como surto de doenças e morte de aves nativas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho com aves mantidas pelo IBAMA e aves do Jardim Botânico-UFJF permitem considerar que:

- A elevada prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. nas aves do IBAMA pode estar relacionada a maneira como elas são mantidas agregadas em recintos, o que facilita a transmissão de doenças fazendo-se necessárias medidas de tratamento e profilaxia e medidas de controle biológico do vetor.

- A elevada prevalência encontrada em Passeriformes do Jardim Botânico ao se comparar com outros estudos feitos com o mesmo grupo de aves no Brasil pode ser devido às condições propícias ao desenvolvimento dos vetores. Medidas de controle biológico do vetor no local podem diminuir as taxas de infecções, uma vez que os hemosporídeos dependem de vetores para o desenvolvimento e transmissão e os mosquitos fornecem um elo crucial entre aves infectadas e suscetíveis.

- O uso combinado das técnicas de diagnóstico, microscopia e PCR, é importante para estimar a prevalência de hemoparasitos de forma precisa e confiável.

- O uso da microscopia é essencial para identificação de espécies de *Plasmodium* por meio da morfologia quando todas as formas evolutivas do parasito estão presentes no esfregaço sanguíneo.

- Estudos sobre hemoparasitos em aves silvestres são necessários para o conhecimento das relações parasito-hospedeiro, das causas dessa interação e assim evitar perda da biodiversidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, R. M.; MAY, R. M. Population biology of infectious diseases: part I. **Nature**, v. 280, p. 361-367, 1979.
- ARAGÃO, H.B. Sobre o ciclo evolutivo e a transmissão do *Haemoproteus culumbae*. **Revista Médica de São Paulo**, v. 11, n. 20, p. 409-416, 1908.
- ARUCH, S.; ATKINSON, C.T.; SAVAGE, A.F.; LAPOINTE, D.A. Prevalence and Distribution of Pox-like Lesions, Avian Malaria and Mosquito Vectors in Kipahulu Valley, Haleakala National Park, Hawaii. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, p. 567-575, 2007.
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Haemoproteus*. In: LOYE, J.E.; ZUK, M. (eds.), Birdparasite interactions. Oxford, **Oxford University Press**, p. 19-48, 1991.
- ATKINSON, K. L.; 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.
- ATKINSON, T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- BAKER, J.; MICHAEL L.; DHURUV G. An Experimental Approach to Making Retail Store Environmen - Griffitt, William (1970), Environmental Effects on Interpertral Decisions. **Journal of Retailing**, v. 68, n. 4, p. 445-60, 1992.
- BELO, N. O. **Prevalência de *Plasmodium* sp. em aves silvestres da família Psittacidae mantidas em cativeiro no Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 60 pp. 2007.
- BELO, N. O.; PASSOS, L. F.; JÚNIOR, L. M. C.; GOULART, C. E.; SHERLOCK, T. M.; BRAGA, E. M. Avian malaria in captive psittacine birds: Detection by microscopy and

18S rRNA gene amplification. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, p. 220-224, 2009.

BELO, N. O.; PINHEIRO, R. T.; REIS, S. E.; RICKLEFS, R. O.; BRAGA, E. M. Host species and parasite lineage diversity of haemosporidians in three different environments with distinct levels of disturbance. **Plos ONE**, v. 6, p. 17654, 2011.

BENNETT, G. F., BLANCOU, J., WHITE, E. M., WILLIAMS, N. A. Blood parasites of some birds from Senegal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, p. 67-73, 1978.

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

BENNETT, A. F.; BORRERO, J. I. Blood parasites of some birds from Colombia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 12, p. 454-458, 1976.

BENNETT, G. F. Hematozoa. In: BURR, E. W. (Ed.) Companion bird medicine. Ames, Iowa: **Iowa State University Press**, p.120-128, 1987.

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

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

BENSCH, S.; 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.; WALDENSTRÖM, J.; JOSÉN, N.; WESTERDAHL, H.; HANSSON, H.; SEJBERG, D.; HASSELQUIST, D. Temporal dynamic and diversity of malaria parasites in a single host species. **Journal of Animal Ecology**, v. 76, p. 112-122, 2007.
- BLANCO, G.; GAJÓN, A.; DOVAL, G.; MARTÍNEZ, F. Absence of blood parasites in griffon vultures from Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, n. 3, p. 640-643, 1998.
- BONNEAUD C, SEPIL I, MILA´ B, BUERMANN W, POLLINGER J, The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. **Journal of Tropical Ecology**, v. 25, p. 439–447, 2009.
- BRAGA, E.M.; BELO, N.O.; PINHEIRO, R.T. Técnicas para estudos de hemoparasitos em aves. In: VON MATTER, S.; STRAUBE, F.C.; ACCORDI, Y.; PIACENTINI, V.; CÂNDIDO JÚNIOR, J.F. (Eds.), Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento. **Technical Books Editora**, 2010, p. 395-412.
- BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; de MENEZES, R. M. T.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; LIMA, G. F. M. C.; ARAÚJO, R. A. S.; GUIDA, F. J. V.; KIRCHGATTER, K. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 123-127, 2010.
- BUSH, A.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v.83, n.4, 575-583, 1997.
- CAMPBELL, T. W. Avian Hematology and Cytology. 2ª ed. Iowa: **State University Press**, p. 30-34, 1995.
- CARDONA, C.J.; IHEJINIKA, A.; BENETT, G.F. *Haemoproteus tophorthrix* infection in bobwhite quail. **Avian Disease**, v.46, p. 249-255, 2002.
- CASTLE, M. D.; CHRISTENSEN, B. M. Hematozoa of wild turkeys from the Midwestern United States: translocation of wild turkeys and its potential role in the introduction of



*Plasmodium kempii*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 2, p. 180-185, 1990.

CHASAR, A.; LOISEAU, C.; VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T.; SMITH, T. B.; SEHGAL, N. M.R. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4121-33, 2009.

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

CORRADETTI, A.; GARNHAM, P.C.C.; LAIRD, M. New classification of the avian malaria parasites. **Parasitologia**, v. 5, p.1-4, 1963.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.; HYATT, A.D. Emerging Infectious Diseases of Wildlife. Threats to Biodiversity and Human Health. **Science**, v. 287 n. 5452 p. 443-449, 2000.

DEVICHE, P.; GREINER, E. C.; MANTECA, X. Interspecific variability of prevalence in blood parasites of adult passerine birds during the breeding season in Alaska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n.1, p. 28-35, 2001.

DEVICHE, P.; MCGRAW, K.; GREINER, E. Interspecific differences in Hematozoan infection in sonoran desert *Aimophila sparrows*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 3, p. 532-541, 2005.

DOBSON, A.; FOUFOPOULOS, J. Emerging infectious pathogens of wildlife. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 356, p. 1001-1012, 2001.

DOBSON, A. P.; MAY, R. M. Disease and Conservation. In: SOULÉ, M. E. (ed.), Conservation Biology. The science of scarcity and diversity, Massachusetts: **Editora**, 1986, p. 345-365.

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

- DUNN J. C.; COLE E. F.; QUINN J.L. Personality and parasites: sex-dependent associations between avian malaria infection and multiple behavioral traits. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 65, p. 1459–1471, 2011.
- 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**, 60, p. 98-111, 2006.
- FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E.; SWANSON, B. L.; BERMINGHAM, E. Detecting avian malaria: An improved polymerase chain reaction diagnostic. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 1044-1047, 2003.
- FARGALLO, J. A. & MERINO, S. Brood size manipulation modifies the intensity of infection by Haematozoa in female Blue Tits *Parus caeruleus*. **Ardea**, v. 87, p. 261-268, 1999.
- 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.; LIMA, M.; SVENSSON, L.M.E.; MARINI, M.A.; RICKLEFS, R.E. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. **Parasitology**, v.140, p. 181-192, 2013.
- FELDMAN, R. A.; FREED, L. A.; CANN, R. L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. **Molecular Ecology**, v. 4 n. 6, p. 663-673, 1995.
- FLEISCHMAN, R. W.; SQUIRE, R. A.; SLADEN, W. J. L.; MOORE, J. Pathologic confirmation of malaria (*Plasmodium elongatum*) in African Penguins (*Spheniscus demersus*). **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 4, p. 133-135, 1968.

- FIGUEROLA, J., MUNOZ, E., GUTIERREZ, R.; FERRER, D. Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the Cirl Bunting, *Emberiza cirlus*. **Funct. Ecol.**, v. 13, p. 594-601, 1999.
- FOWLER, G. S.; FOWLER, M. E. Order Sphenisciformes (Penguins). In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z.S. Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals. 2001, p. 63.
- FROMONT, E. Hematologie et Parasites Sanguins des Rapaces. Étude chez des Oiseaux en Rehabilitation. Tese de doutorado (Doutorado em Veterinária) Lyon: École Nationale Veterinaire de Lyon, 1993.
- GABALDÓN, A.; ULLOA, G. Exoerythrocytic forms of *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 and the presence of this species in Venezuela (Las formas exoeritocíticas de *Plasmodium (Haemamoeba) lutzi* Lucena, 1939 y presencia de esta especie em Venezuela). **Malaria and Environmental Protection Bulletin**, v. 16, p. 299-312, 1976.
- GALEN, S.C.; WITT, C.C. Diverse avian malaria and other haemosporidian parasites in Andean house wrens: evidence for regional co-diversification by host-switching. **Journal of Avian Biology**, v. 45, p.01-13, 2014.
- GALINDO, P.; O. SOUSA. Blood parasites of birds from Almirante, Panama, with ecological notes on the hosts. **Revista de Biología Tropical**, v. 14 p. 2746, 1966.
- GARAMSZEGI, L. Z. Bird song and parasites. **Behavior Ecology and Sociobiology**, 59, p. 167-180, 2005.
- GARAMSZEGI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. **Journal of Parasitology**, v.96, p. 1197-203, 2010.

- GARNHAM, P. C. Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, 1966, 1114 p.
- GARNHAM, P.C.C. Malaria in its various vertebrate hosts. In: KREIER, J.P. (Ed.). Malaria. Part 1. Epidemiology, chemotherapy, morphology and metabolism. New York: **Academic Press**, 1980, p. 95-144.
- GIBSON, G., & TORR, S. J. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, p. 2-23, 1999.
- GILMAN, S.; BLUMSTEIN, D.T.; FOUFOPOULOS, J. The effect of hemosporidian infections on white-crowned sparrow singing behavior. **Ethology**, v. 113, p. 437-445, 2007.
- GREINER, E. C.; BLACK, D. J.; IVERSON, W. O. *Plasmodium* in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 4, p. 555-558, 1981.
- GUTIÉRREZ, R. J. Hematozoa from the Spotted Owl. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, n. 4, p. 614-618, 1989.
- HARVELL, C. D.; MITCHELL, C. E.; WARD, S.; ALTIZER, A. P.; DOBSON, R. S.; SAMUEL, M. D. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. **Science**, v. 296, p. 2158-2162, 2002.
- HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, 90, p. 797-802, 2004.
- HILLE, S. M.; NASH, J. P.; KRONE, O. Hematozoa in endemic subspecies of common kestrel in the Cape Verde Islands. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 4, p. 752-757, 2007.
- ISHAK H.D.; DUMBACHER J.P.; ANDERSON N.L.; KEANE, J.J.; VALKIŪNAS, G.; HAIG, S. M.; TELL, L. A.; SEHGAL, R. N. M. Blood Parasites in Owls with

Conservation Implications for the Spotted Owl (*Strix occidentalis*). **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. 2304, 2008.

ISHTIAQ, F.; GERING, E.; RAPPOLE, J. H.; RAHMANI, A. R.; JHALA, Y. V.; DOVE, C. J.; MILENSKY, 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.

JARVI, S. I.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 153-158, 2002.

KIMURA, M.; DHONDT, A. A.; LOVETTE, I. J. Phylogeographic structuring of *Plasmodium* lineages across the north american range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). **The Journal of Parasitology**, v. 92, p. 1043-1049, 2006.

KIMURA, M.; DARBRO, J. M.; HARRINGTON, L. C. Avian Malaria Parasites Share Congeneric Mosquito Vectors. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 144-151. 2010.

KREINER, J.P. Parasitic protozoa. New York: **Academic Press**, 1994.

KRIŽANAUSKIENĖ, A.; HELLGREN, O.; KOSAREV, V.; SOKOLOV, L.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. J. Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. **Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1319-1324, 2006.

KRONE, O.; WALDENSTRÖM, J.; VALKIŪNAS, G.; LESSOW, O.; MÜLLER, K.; IEZHOVA, T. A.; FICKEL, J.; BENSCH, S. Haemosporidian blood parasites in european birds of prey and owls. **The Journal of Parasitology**, v.94, n. 3, p. 709-715, 2008.

LAFERTY, K.D.; MORRIS, K. Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final hosts. **Ecology**, v. 77, p. 1390-1397, 1996.

- 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.
- LAPOINTE D. A., ATKINSON, C. T.; SAMUEL, M. D. Ecology and conservation biology of avian malária. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1249, p. 211-226, 2012.
- LEITE, Y. F. C.; PINHEIRO, R. P.; BRAGA, E. M. Prevalência de Hemosporídeos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. **Ornithologia**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.
- LI, J.; WITZ, R. A.; McCONKEY, G. A.; SATTABONGKOT, J.; WATER, A. P.; ROGERS, M. J.; McCUTCHAN, T. F. *Plasmodium*: genus-conserved primers for species identification and quantification. **Experimental Parasitology**, v. 81, p. 182-190, 1995.
- LIVELY, C.M.; DYBDAHL, M.F. Parasite adaptation to locally common host genotypes. **Nature**, v. 405, p. 679-681, 2000.
- LIMA, M. R.; SIMPSON, L.; FECCHIO, A.; KYAW, C. M. Low prevalence of haemosporidian parasites in the introduced house sparrow (*Passer domesticus*) in Brazil. **Acta Parasitology**, v. 55, p. 297-303, 2010.
- LOGIUDICE, K.; OSTFELD, R.S.; SCHMIDT, K.A.; KEESING, F. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **PNAS**, v. 100, n. 2, p. 567-571.
- LUCENA, D. Avian malaria, *Plasmodium lutzii* n. sp. Parasites *Aramides cajaneus cajaneus*, Müller (Malaria Aviaria, *Plasmodium lutzii* n. sp. Parasita da saracura *Aramides cajaneus cajaneus*, Müller). **Biological Bulletin**, v. 4: p. 27–31, 1939.
- MANTILLA, J.S.; MATTA, N.E.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; GONZÁLEZ, A.D.; MONCADA, L.I. Identification of *Plasmodium (Haemamoeba) lutzii* (Lucena, 1939) from *Turdus fuscater* (Great Thrush) in Colombia. **The Journal of Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 662-668, 2013.

- MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Bird Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, n. 3, p. 665-671, 2005.
- MANWELL, R. D.; HERMAN, C. The occurrence of the avian malarias in nature. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 15, p. 661-673, 1935.
- MARGOLIS, L.; ESCH, G. W.; HOLMES, J. C.; KURIS, A. M.; SCHAD, G. A. The use of ecological terms in parasitology (reports of an ad hoc committee of American Society of Parasitologists). **Journal of Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 131-133, 1982.
- MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Bird Conservation in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, n. 3, p. 665-671, 2005.
- MARZAL, A.; DE LOPE, F.; NAVARRO, C.; MØLLER, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. **Oecologia**, v. 142, p. 541-545, 2005.
- MASSAD, E.; COUTINHO, F. A. B.; LOPEZ, L. F.; DA SILVA, D. R. Modeling the impact of global warming on vectorborne infections. **Physics of Life Reviews**, v. 8, p. 169-199, 2011.
- 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.; 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 Evolution**, v. 47, p. 261-273, 2008.
- MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J.; HERRERO, J.; DEL CERRO, S.; LOBATO, E.; RIVERO-DE AGUILAR, J.; VÁSQUEZ, R. A.; MERINO, S. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the

inefficiency of general primers for detection of mixed infections. **Parasitology**, v. 136, p. 713-722, 2009.

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 of London B: Biological Sciences**, v. 267, p. 2507-2510, 2000.

MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R. A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONS Á LVEZ, I.; ESTADES, C. F.; IPPI, S.; SABAT, P.; ROZZI, R.; MCGEHEE, S. Hematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Emu-Austral Ecology**, v. 33, p. 329-340, 2008.

MCCALLUM, H.; DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. **Tree**, v. 10, p.190-194, 1995.

MIJARES, A.; ROSALES, R.; SILVA-ITURRIZA, A. Hemosporidian Parasites in Forest Birds from Venezuela: Genetic Lineage Analyses. **Avian Diseases**, v. 56, n. 3, p. 583-588, 2012.

MØLLER, A.P. Flightdistanceandblood parasites in birds. **BehavioralEcology**, v.19, p.1305-1313, 2008.

NILSSON, J.-Å. Fitness consequences of timing of reproduction. In: ADAMS, N. J.; SLOTOW, R. H. (eds.), Proc. 22 Int. Ornithol. Congr. p. 234-247. **BirdLife South Africa Durban**, Johannesburg, 1999.

OGAKI, M. Bird malaria parasites found in Malay peninsula. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, p. 459-462, 1949.

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



- PÉREZ-TRIS, J.; BENSCH, S. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. **Parasitology**, v. 131, p. 15-23, 2005.
- PÉREZ-TRIS, J.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENE, A. et al. Within-host speciation of malaria parasites. **PLoS One**, v. 2, p.1–7, 2007.
- PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malaria parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 972-978, 2002.
- PHALEN, D. N.; TAYLOR, C.; PHALEN, S. W.; BENNETT, G. F. Hemograms and hematozoa of sharp-shinned (*Accipiter striatus*) and Cooper's hawks (*Accipiter cooperii*) captured during spring migration in northern New York. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 216-222, 1995.
- PEIRCE, M. A. Infectious disease - Hemoparasites. In: SAMOUR, J. Avian Medicine. **Elsevier**, 2008, p. 337-342.
- PIVETTA, M. Asas da Mata Atlantica. **Revista Pesquisa Fapesp**, 2014.
- 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.
- RENJIFO, S., C. J. SANMARTIN, AND J. A. DE ZULETA. A survey of the blood parasites of vertebrates in eastern Colombia. **Acta Tropica**, v. 9, p. 121–169, 1952.
- RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C.; MARINI, M. A.; VAGO, A. R.; BRAGA, E.M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, v. 130, p. 261-267, 2005.
- RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. **The Journal of Parasitology**, v. 88, p. 819-822, 2002.

- 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.
- RICKLEFS, R. E.; OUTLAW, D. C. A molecular clock for malaria parasites. **Science**, v. 9, p. 226-229, 2010.
- RODRÍGUEZ, O. A.; MATTA, N. E. Blood Parasites in Some Birds from Eastern Plains of Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 1173-1176, 2001.
- SAMUEL, M.D.; HOBBELEN, P.H.F.; DECASTRO, F. The dynamics, transmission, and population impacts of avian malaria in native Hawaiian birds a modeling approach. **Ecology Applied**, v. 21, p. 2960–2973, 2011.
- SAVAGE, A.F.; ROBERT, V.; GOODMAN, S.M.; RAHARIMANGA, V.; RAHERILALAO, M.J.; ANDRIANARIMISA, A.; ARIEY, F.; GREINER, E.C. Blood Parasites In Birds From Madagascar. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 907-920, 2009.
- SEBAIO, F. **Hemoparasitos em aves de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais**. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- 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.
- SEHGAL, R.N.M.; JONES, H.I.; SMITH, T.B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2319-2327, 2001.

- SEHGAL, R. N.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Blood parasites of some West African rainforest birds. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 67, p. 295-301, 2005.
- SEHGAL, R. N. M. Deforestation and avian infectious diseases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 955-960, 2010.
- SHURULINKOV, P.; GOLEMANSKY, V. Haemoproteids (Haemosporida: Haemoproteidae) of wild birds in Bulgaria. **Acta Protozoologica**, v. 41, p. 359-374, 2002.
- SICK, H. Ornitologia Brasileira. Rio de Janeiro. **Editora Nova Fronteira**. 1997.
- SILVA, L.G. **Determinação da prevalência de infecção, por meio da identificação por microscopia óptica, das espécies do gênero *Plasmodium* em araras caniné (*Arararauna*) mantidas em cativeiro no Estado do Rio de Janeiro e seus achados no hemograma e bioquímicas séricas**. 2011. 110 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária - Clínica e Reprodução Animal). Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2011.
- SOL, D.; JOVANI, R.; TORRES, J. Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. **Ecography**, v. 23, p. 307-314, 2000.
- STABLER, R. M.; BRAUN, C. L.; BECK, T. D. Hematozoa in sage grouse from Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 13, p. 414-417, 1977.
- STACEY, L. M.; COUVILLION, C. E.; SIEFKER, C.; HURST, G. A. Occurrence and seasonal transmission of hematozoa in wild turkeys. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, n. 4, p. 442-446, 1990.
- SVENSSON, E. Avian reproductive timing: when should parents be prudent? **Animal Behaviour**, v. 49, p. 1569–1575, 1995.
- TABACHNICK, W. J. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 946-954, 2010.

- TAKKEN, W.; DEKKER, T.; WIJNHOLDS, Y. G. 1997. Odor-mediated flight behavior of *Anopheles gambiae* giles Sensu Stricto and *An. stephensi* liston in response to CO<sub>2</sub>, Acetone, and 1-Octen-3-ol (Diptera: Culicidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 10, p. 395-407, 1997.
- TELLA, J. L. The evolutionary transition to coloniality promotes higher blood parasitism in birds. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, p. 32-41, 2002.
- TEMPLE, SA. Do predators always capture substandard individuals disproportionately from prey populations? **Ecology**, v. 68, p. 669-674, 1986.
- TOSTES, R. **Malária em aves silvestres da Mata Atlântica de Minas Gerais mantidas em cativeiro: diagnóstico parasitológico e molecular, e caracterização bioquímica e histopatológica.** Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, 101 p. 2013.
- VALERA, F.; CARRILLO, C.; BARBOSA, A.; MORENO, E. Low prevalence of haematozoa in Trumpeter finches *Bucanetes githagineus* from south-eastern Spain: additional support for a restricted distribution of blood parasites in arid lands. **Journal of Arid Environments**, 55, p. 209-213, 2003.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENĖ, 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.; BROOKS, D. R.; HANELT, B.; BRANT, S. V.; SUTHERLIN, M. E.; CAUSEY, D. Additional Observations on Blood Parasites of Birds in Costa Rica. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 3, p. 555-561, 2004.
- VALKIŪNAS, G. Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. USA: **CRC Press**, 2005.
- VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENĖ, A.; HELLGREN, O.; BOLSHAKOV, C. V. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics

underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. **The Journal of Parasitology**, 92, p. 418-422, 2006.

VALKIÜNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENĖ, 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.

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

VAN RIPER III, C.; ATKINSON, C. T.; SEED, T. M. Plasmodia of birds. In: KREIER, J. P.; SAN DIEGO, C. A. (eds.), Parasitic protozoa. **Academic Press**, 1994, p. 73–140.

VOTÝPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M.; LUKES, J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology**, v. 125, p. 253-263, 2002.

VOTYPKA, J.; SIMEK, J.; TRYJANOWSKI, P. Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). **Ann. Zool. Fennici**, v. 40, p. 431-439, 2003.

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S.; HASSELQUIST, D.; OTTOSSON, U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1545-1554, 2002.

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D.; OSTMAN, O. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 191-194, 2004.

WEISS, R. A.; MCMICHAEL, A. J. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. **Nature Medicine**, v. 10, p.70-76, 2004.

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.