

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MORGANA MAIRA HENNIG

HEMOSPORÍDEOS EM AVES ATENDIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO, CUIABÁ, MT

MORGANA MAIRA HENNIG

HEMOSPORÍDEOS EM AVES ATENDIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MATO GROSSO, CUIABÁ, MT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGVET) da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICHARD DE CAMPOS PACHECO

CUIABÁ - MT, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

H516h Hennig, Morgana Maira.

Hemosporídeos em aves atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT [recurso eletrônico] / Morgana Maira Hennig. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 66 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientador: Richard de Campos Pacheco.

Coorientadora: Rosa Helena dos Santos Ferraz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Sanidade animal. 2. Malária aviária. 3. Hemoparasitas. 4. Animais silvestres. 5. Plasmodium. I. Pacheco, Richard de Campos, *orientador*. II. Ferraz, Rosa Helena dos Santos, *coorientador*. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: HEMOSPORÍDEOS EM AVES ATENDIDAS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO, CUIABÁ, MT

AUTORA: Mestrando(a) Morgana Maira Hennig

Dissertação defendida e aprovada em 24 de julho de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Doutor Richard de Campos Pacheco (Presidente Banca/Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutor Francisco Carlos Ferreira Junior (Examinador Externo)

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Doutor Luciano Nakazato (Examinador Interno)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Valéria Dutra (Examinadora Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Cuiabá, 24 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **RICHARD DE CAMPOS PACHECO**, **Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 31/07/2024, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANO NAKAZATO**, **Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 31/07/2024, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0,
informando o código verificador **7032820** e o código CRC **914EA3B1**.

Referência: Processo nº 23108.047527/2024-81

SEI nº 7032820



Documento assinado digitalmente
FRANCISCO CARLOS FERREIRA JUNIOR
Data: 02/08/2024 18:58:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa oportunidade de qualificação profissional e por poder seguir trabalhando na área que tanto amo, a de animais silvestres.

Agradeço a toda minha família por acreditar em mim, me apoiar e incentivar a ir atrás dos meus sonhos. Muitas vezes a distância física fazia a saudade apertar, batia a vontade de estar junto, mas mesmo nesses momentos, nunca tive dúvidas desse apoio. Em especial à minha mãe, que sempre foi exemplo de persistência e coragem para enfrentar as adversidades da vida e às minhas irmãs, Tais e Vanessa, nas quais sempre me espelhei desde pequeninha e com quem aprendi a importância em se dedicar aos estudos.

Ao meu orientador, professor Richard, por me aceitar como aluna e confiar em mim para desempenhar esta pesquisa e demais oportunidades que tive através do Laboratório de Parasitologia da UFMT. Todas estas oportunidades contribuíram muito para meu aprendizado e fez despertar em mim o amor pela pesquisa e vida acadêmica.

À Victória, que foi a primeira pessoa a me apresentar ao mundo da biologia molecular e que me ajudou em diversas atividades. Ao Marco, por estar sempre disponível para tirar as dúvidas que surgiam nos PCRs. Aos professores Luciano e Valéria que também sempre estavam à disposição para tirar dúvidas, especialmente no início do mestrado.

À professora Rosa, pela parceria em disponibilizar as amostras das aves de sua rotina do LANCAR e também por estar sempre disponível. Aos parceiros e amigos do Setor de Animais Selvagens, por contribuírem com a rotina de atendimentos de aves e, especialmente à Brenda e à Bruna, minhas eternas R1s que se tornaram grandes amigas e ouviram meus desabafos dos desafios do mestrado.

À professora Érika Braga e ao seu aluno Luiz, por adicionarem sua expertise em Malária Aviária e engrandecerem meu trabalho através da parceria com a UFMG.

Aos colegas de mestrado pela companhia e apoio durante as aulas e conversas. Em especial ao João, colega e amigo de laboratório, além da residente Beatriz, que também sempre acompanhou o desenvolvimento das análises do meu estudo.

À Universidade Federal de Mato Grosso e ao Hospital Veterinário como um todo, docentes, funcionários e a cada animal que ajudou a compor este estudo. Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de estudos durante esse período de mestrado.

RESUMO

Hemosporídeos são protozoários heteroxenos, cosmopolitas, que infectam diferentes grupos animais, incluindo aves, utilizando insetos hematófagos como vetores. O grupo desses protozoários, composto pelos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*, é encontrado infectando aves na natureza, porém os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são os mais estudados. Embora estes agentes geralmente não causem doença, manifestando-se apenas como casos subclínicos, algumas evidências têm demonstrado que estes parasitos podem exercer uma importante pressão seletiva sobre seus hospedeiros, interferindo na sobrevivência, no comportamento reprodutivo e da comunidade das aves. Assim, este estudo teve como objetivo detectar a infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves coletadas de setembro de 2016 a março de 2024 por meio do exame microscópico parasitológico de extensão sanguínea e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) de aves do estado de Mato Grosso, atendidas na rotina hospitalar do Setor de Animais Selvagens do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, seguido da determinação da parasitemia, caracterização morfológica e molecular, por meio do sequenciamento e análise filogenética. A detecção de *Plasmodium* spp. ou *Haemoproteus* spp. ocorreu em 73 das 352 aves (20,74%) através de extensão sanguínea e/ou análise molecular. Este trabalho contribuiu para o conhecimento da frequência e diversidade de hemosporídeos em grupos de aves pouco frequentes nos estudos sobre hemosporídeos aviários do Brasil. Evidenciou a circulação de quinze linhagens diferentes de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. na avifauna do estado, sendo seis delas inéditas, além de realizar a descrição de uma nova espécie de *Haemoproteus* em *Tyto furcata*. Adicionalmente, reforçou a importância em incluir o diagnóstico para hemosporídeos aviários na avaliação de perfil sanitário de aves em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Sanidade animal. Malária aviária. Hemoparasitas. Animais silvestres. *Plasmodium*.

ABSTRACT

Hemosporidae is heteroxenous, cosmopolitan protozoa that infect different groups of animals, including birds, using blood-sucking insects as vectors. The group of these protozoa composed of the genera *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, and *Fallisia* is found infecting birds in nature, but the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* are the most studied. Although these agents generally do not cause disease, manifesting only as subclinical cases, some evidence shows that these parasites can exert selective pressure on their hosts, interfering with survival, reproductive behavior, and the bird community. Therefore, this study aimed to detect infection by *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. in birds collected from September 2016 to March 2024, through blood extension parasitological microscope examination and Polymerase Chain Reaction (PCR) examination of blood samples from birds in the state of Mato Grosso, treated in the hospital routine of the wild animal sector of the Veterinary Hospital of the Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, MT, followed by determination of parasitemia, morphological and molecular characterization, through sequencing and phylogenetic analysis. The detection of *Plasmodium* spp. and/or *Haemoproteus* spp. occurred in 73 of the 352 birds (20.74%) through blood extension and/or molecular analysis. This work contributed to the knowledge of the prevalence and diversity of haemosporidae in groups of birds that are uncommon in studies of avian haemosporidae in Brazil. It showed the circulation of fifteen different lineages of *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. in the state's avifauna, six of which are new, in addition to describing a new species of *Haemoproteus* in *Tyto furcata*. Furthermore, it reinforced the importance of including the diagnosis of avian haemosporidae in assessing the health profile of birds in a hospital environment.

Keywords: Animal health. Avian malaria. Hemoparasites. Wild animals. *Plasmodium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida dos hemosporídeos aviários.....16

Figura 2 - Mapa do estado de Mato Grosso com a distribuição pela origem das 352 aves testadas para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Selvagens (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), no período de setembro de 2016 a março de 2024. O número de aves de cada município está indicado entre parênteses.....33

Figura 3 - Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. A filogenia bayesiana foi baseada em sequências do gene *cytb*, utilizando como grupo externo a espécie *Leucocytozoon fringillinarum*. As sequências de *Plasmodium* spp. encontradas neste trabalho estão destacadas nos retângulos de cor vermelha e as sequências de *Haemoproteus* spp. estão destacadas nos retângulos na cor verde.....40

Figura 4 - Formas sanguíneas de *Haemoproteus* sp. em *Tyto furcata*. Gametócitos jovens (a - d). Macrogametócitos (e - h). Microgametócitos (i - l). As setas preenchidas pretas indicam o núcleo das formas parasitárias. As setas pretas sem preenchimento indicam os grânulos de pigmento malárico. Núcleos das hemácias estão indicados pela seta preenchida vermelha. Setas vermelhas sem preenchimento mostram os vacúolos no citoplasma dos parasitos. Barra de escala de 10µm.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos genes-alvo, iniciadores e condições em termociclador utilizados no diagnóstico molecular de *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp. a partir de amostras de sangue de aves oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Silvestres (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), Cuiabá, MT, no período de setembro de 2016 a março de 2024.....27

Tabela 2 - Diversidade de espécies, testes diagnósticos empregados para cada animal e origem das 352 aves oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Silvestres (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), Cuiabá, MT, no período de setembro de 2016 a março de 2024, submetidas ao diagnóstico morfológico e/ou molecular de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.....30

Tabela 3 - Aves com diagnóstico positivo para *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp. oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Silvestres (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), por meio da avaliação parasitológica da extensão sanguínea em lâmina, reação em cadeia pela polimerase convencional (cPCR) e nested PCR (nPCR), no período de setembro de 2016 a março de 2024.....35

Tabela 4 - Dados morfométricos de *Haemoproteus* sp. infectando *Tyto furcata* do presente estudo, comparados com morfometria de *H. plataleae*, *H. syrnii* e *H. noctuae* (Valkiūnas, 2005). O número de formas avaliadas (n) para cada espécie de parasito está indicado na própria tabela. Todas as medidas estão em µm.....42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 Avifauna.....	12
2.2 Hemosporídeos aviários.....	14
2.3 Ciclo de vida dos hemosporídeos aviários.....	15
2.4 <i>Plasmodium</i> spp.....	18
2.5 <i>Haemoprotes</i> spp.....	18
2.6 Diagnóstico de hemosporídeos aviários.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Procedimentos éticos.....	22
4.2 Coleção de amostras.....	22
4.3 Pesquisa hematológica e caracterização morfológica.....	24
4.4 Extração de DNA.....	24
4.5 Diagnóstico de <i>Plasmodium</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp.....	25
4.6 Análise filogenética.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Perfil das aves amostradas.....	29
5.2 Perfil das aves positivas, frequência e diversidade de hemosporídeos.....	33
5.3 Caracterização de <i>Haemoproteus</i> spp. na avifauna amostrada.....	39
5.4 Caracterização molecular e análise filogenética de <i>Plasmodium</i> spp. na avifauna amostrada.....	43
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro abriga uma rica biodiversidade, sendo estimado que 15 a 20% das espécies de animais descritas em todo planeta são do Brasil (PAGLIA et al., 2012). A avifauna brasileira também é uma das mais diversas do mundo, tendo no total, 1.971 espécies de aves, além de ser o terceiro país do mundo em número de espécies endêmicas, ou seja, que só ocorrem no Brasil (PACHECO et al., 2021).

As aves são encontradas em todos os biomas do país e são o segundo grupo de vertebrados mais diverso, perdendo apenas para os peixes, embora 236 espécies (11,9%) estejam ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2018).

O Mato Grosso é composto por três biomas: Amazônia, Cerrado e Pantanal, fazendo com que o estado tenha uma abundante biodiversidade, o que inclui a fauna aviária (MORENO et al., 2005). Este fato também o torna um importante local para a conservação das espécies (MITTERMEIER et al., 2005), porém, sabe-se que as ameaças à conservação da fauna crescem constantemente (FONSECA et al., 2021).

No que se refere ao grupo das aves, segundo o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO, 2018) as principais ameaças são o desmatamento e a fragmentação de habitat, especialmente aquelas relacionadas às atividades agropecuárias e a expansão urbana, além das queimadas e a captura de animais, com intuito de consumo ou, ainda, para o comércio ilegal para servirem como animais de estimação.

Desta forma, a descrição da ocorrência de patógenos na população aviária, que podem contribuir para seu risco de extinção, como as parasitoses, se mostra de grande importância. Sabe-se que os parasitos são considerados uma força seletiva, influenciando todos os aspectos da vida de seus hospedeiros e sua presença no sangue afeta a debilidade física da ave, comprometendo diversos fatores, como sua imunocompetência e perpetuação da espécie (ZINKL, 1986). Dentro deste cenário, inclui-se os hemosporídeos, que em aves pode causar a doença designada com o termo genérico malária aviária (PÉREZ-TRIS et al., 2005).

Os hemosporídeos aviários pertencem ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Coccidea e ordem Haemosporida, sendo que as espécies filogeneticamente

mais próximas e de importância na medicina veterinária são os piroplasmídeos ordem Piroplasmorida (ex. *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*) e subordem Adelorina (ex. *Hepatozoon*) com impactos econômicos, veterinários e médicos altamente significativos (VALKIÜNAS, 2005; MODRÝ et al., 2017. JALOVECKA et al., 2018). São protozoários heteroxenos e cosmopolitas, que utilizam insetos hematófagos como vetores (BRAGA et al., 2011).

Há mais de 200 espécies de hemosporídeos que podem infectar aves, os quais são divididos em quatro famílias: Haemoproteiidae, Plasmodiidae, Leucocytozooiidae e Garnidae, cada uma delas contendo apenas um gênero, sendo *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*, respectivamente. Estes hemoparasitas estão em constante rearranjo taxonômico, além de novas espécies serem descritas com frequência (VALKIÜNAS, 2005). Não há relatos de hemosporídeos aviários transmitidos a espécies não aviárias, ou seja, esses parasitos não apresentam risco zoonótico (VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Apesar disso, os hemosporídeos aviários foram muito importantes para estudos da malária humana, quando na tentativa de entender melhor a doença, utilizou-se as aves como modelos, podendo comprovar a ocorrência de sinais clínicos como anemia aguda, hepato e esplenomegalia, bem como o acúmulo de pigmentos nos órgãos afetados, além de possibilitar perceberem que a presença dos parasitos no sangue era sazonal, durante os meses de verão (SÁ, 2011).

Além disso, descobertas importantes foram feitas a partir dos hemosporídeos aviários, como por exemplo, a transmissão através de vetores invertebrados da família Culicidae, comprovada a partir de modelos aviários, experimentalmente, infectados com *Plasmodium* spp. (ROSS, 1898).

Até o momento, estima-se que a ocorrência de hemosporídeos já tenha sido investigada em metade das espécies de aves existentes no mundo (VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON, 2008; HELLGREN, 2009). A síntese mais recente a nível global sobre a prevalência de hemosporídeos mostra variações de prevalência para *Haemoproteus* spp. (7,1–38,4%), *Plasmodium* spp. (5,8–28,6%) e *Leucocytozoon* spp. (0–30,1%) em regiões zoogeográficas (FECCHIO et al., 2021).

Fallisia possui apenas uma espécie afetando aves (GABALDON, 1985), sendo considerada um achado raro, com apenas uma descrição na Venezuela, acometendo Ciconiiformes e Columbiformes (VALKIÜNAS, 2005) e, por isso, não será abordado neste trabalho. *Leucocytozoon* sp. historicamente era ignorado nos

estudos do Brasil. Porém, estudos recentes detectaram sua presença em diversas espécies de aves em diferentes biomas (BENNET; LOPES, 1980; FECCHIO et al., 2018; FECCHIO et al., 2020; ANJOS, et al., 2021; VIEIRA et al., 2023), demonstrando que a ocorrência deste gênero no país pode ser mais frequente do que se imaginava, desta forma, passou a ser importante avaliar as aves do Brasil também quanto à presença de *Leucocytozoon* sp. Os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são os hemosporídeos aviários mais investigados atualmente, devido à sua ampla distribuição no mundo (VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON; LAPOINT, 2009;), os quais são o foco deste estudo.

Além disso, a maior parte dos dados existentes, se referem a Passeriformes, que representam 87% dos registros do Avian Malaria Initiative – MalAvi (um banco de dados público de parasitas hemosporídeos de aves), deixando lacunas na compreensão do parasitismo em muitos hospedeiros aviários (DURRANT, 2006; FECCHIO et al., 2020). Isso se deve à maior facilidade de amostragem de passeriformes, feito através de redes de neblina, método mais empregado para captura de aves de vida livre, com isso, porém, a amostragem não é ampla e representativa da avifauna, visto que as taxas de captura variam muito entre espécies de diferentes tamanhos e de acordo com os padrões de distribuição espaciais e temporais das mesmas (CLARK et al., 2014; HEIMERDINGER; LEBERMAN, 1966; MACARTHUR; MACARTHUR, 1974).

Portanto, estudos que englobam diferentes ordens de aves, além de passeriformes - como Cariamiformes, Psittaciformes, Strigiformes, dentre outros - são necessários para gerar um panorama completo sobre os hemosporídeos aviários, visando hospedeiros incomuns (POULIN, 2021; CARLSON et al., 2020). Nesse sentido, os Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) e outras instituições como o Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET/UFMT), que recebem aves de vida livre, portanto, se tornam uma importante oportunidade de aprofundamento e descobertas na área de hemosporídeos aviários.

Assim, este trabalho objetivou a detecção da infecção por *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp., por meio do exame microscópico parasitológico de extensão sanguínea e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em aves silvestres atendidas na rotina hospitalar do setor de animais selvagens (SAS) do HOVET/UFMT, campus Cuiabá, MT, bem como a caracterização morfológica e

molecular, por meio do sequenciamento e análise filogenética, das amostras positivas na PCR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Avifauna

A avifauna possui a maior diversidade de espécies dentre os vertebrados terrestres, além de apresentarem importantes papéis ecológicos, atuando na dispersão de sementes, na polinização, no controle de pragas, na ciclagem de nutrientes, dentre muitos outros papéis (ICMBIO, 2018; WHELAN et al., 2015). Porém, devido ao seu comportamento de vida, podem favorecer a distribuição de parasitos, através, por exemplo, da migração, que pode levar patógenos para novas áreas e hospedeiros e, com isso, favorecer o contato entre diferentes linhagens da mesma espécie de parasito e, conseqüentemente, levar a troca de material genético entre estes, o que gera aumento de riqueza de espécies e diversificação genética desses parasitos (BENSCH et al., 2004; POULIN; DE ANGELI, 2021).

O Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO) é responsável por manter atualizada a lista de espécies de aves que ocorrem no Brasil, incluindo os subtotais de espécies residentes, visitantes regulares e acidentais. De acordo com sua última edição, publicada em 2021, o país possui 1971 espécies de aves, 4,3% a mais do que na lista da edição anterior, publicada em 2015 (PACHECO et al., 2021), demonstrando a riqueza da avifauna brasileira.

O site WikiAves (<https://www.wikiaves.com.br/>) é a maior base de dados sobre aves do Brasil na Internet e fornece gratuitamente ferramentas avançadas para controle de registros fotográficos e sonoros, textos, identificação de espécies e muitas outras informações. Segundo esta fonte, o estado do Mato Grosso possui 918 espécies de aves registradas em 2024 (acesso em 05/05/2024), entre elas, aves emblemáticas, como a arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), espécie ameaçada de extinção, o tuiuiú (*Jabiru mycteria*), ave símbolo do Pantanal e, o tachã (*Chauna torquata*), considerada a ave-símbolo do estado de Mato Grosso segundo Oliveira (2003), espécies as quais estão representadas nas amostras incluídas no presente estudo.

Atualmente, o ambiente cativo, como os zoológicos, representa uma grande contribuição para a conservação da vida selvagem, incluindo as aves, por meio da pesquisa científica, educação ambiental, melhorias em manejo e bem-estar animal, servem como reserva genética de muitas espécies ameaçadas, e não é mais somente um espaço voltado para o lazer e entretenimento da população (GUSSET; DICK, 2010; FELIPPE; ADANIA, 2014). Porém, este ambiente pode favorecer a ocorrência de doenças parasitárias, como a hemosporidiose aviária, seja pela alta densidade populacional, quanto pela convivência de espécies de diferentes regiões geográficas, possibilitando a exposição a parasitos com os quais não coevoluíram, podendo ter como resultado, doenças parasitárias graves e até mesmo letais (RODRIGUES; PRIMARCK, 2001; PANAYOTOVA-PENCHEVA, 2013; POULIN; DE ANGELI, 2021).

Dentre as aves, pinguins da ordem Sphenisciformes e algumas aves nativas do Havaí, popularmente conhecidas como *honeycreepers*, passeriformes da família Drepanidinae, são altamente susceptíveis e, acredita-se que essa susceptibilidade se deve ao fato dessas aves não terem convivido evolutivamente com hemosporídeos e, por este motivo, não teriam desenvolvido as respostas imunológicas apropriadas para lidar com estes parasitos (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008). Estudos no Brasil já evidenciaram a infecção de hemosporídeos em pinguins em reabilitação, levando-os à óbito, inclusive na forma de surto (SILVEIRA et al., 2013; VANSTREELS, et al., 2014), alertando sobre o risco de mortalidade e impactos na conservação destas aves.

Outro cenário importante a ser considerado são regiões de interface entre áreas naturais e áreas sob alterações antrópicas, locais onde aves silvestres e domésticas coabitam, tornando-se importantes pontos para o surgimento de novas interações patógeno-hospedeiro (SANTIAGO-ALARCON, 2012; SMITH et al., 2009). Ferreira-Junior et al. (2018), detectaram *Plasmodium juxtannucleare*, um parasito normalmente encontrado em aves domésticas, infectando naturalmente sete passeriformes (dois espécimes de *Hemitriccus margaritaceiventer* e de *Turdus subalaris* e, em um dos seguintes espécimes: *Coryphospingus cucullatus*, *Myiarchus ferox*, *Elaenia cristata*) de vida livre do município de Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil, demonstrando que essas novas associações parasita-hospedeiro podem representar uma ameaça à avifauna no Brasil.

2.2 Hemosporídeos aviários

Os hemosporídeos aviários são um grupo de protozoários obrigatoriamente heteroxênicos, tendo em seu ciclo a participação de um hospedeiro vertebrado (ave) e um invertebrado (dípteros hematófagos culicídeos, hipoboscídeos, simulídeos ou ceratopogonídeos) (VALKIÜNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014). Mais de 260 espécies e aproximadamente 4600 linhagens genéticas de hemosporídeos aviários são conhecidas em todo o mundo (FECCHIO et al., 2021).

A patogenicidade destes protozoários nas aves varia de acordo com fatores ligados ao hospedeiro, como imunidade, fase da vida, sexo e suscetibilidade (ATKINSON et al., 1995), bem como de acordo com as condições ambientais e fatores relacionados ao parasito, como fase da infecção e virulência (VALKIÜNAS, 2005).

A hemospordiose aviária é primariamente uma doença de células sanguíneas e do sistema reticuloendotelial, sendo que o progresso da sintomatologia clínica está relacionado ao aumento do número de parasitas na circulação sanguínea, de modo que os sinais clínicos são associados à fase aguda da infecção (WILLIAMS, 2005; ATKINSON, 2008). Nas aves silvestres, em geral, os hemosporídeos causam infecção subclínica e crônica, porém pode se manifestar como infecções agudas, podendo levar os animais a óbito, embora sejam considerados de baixa patogenicidade (GARCÍA-DEL-RÍO et al., 2021). Entretanto, alguns casos clínicos graves e surtos são relatados esporadicamente em aves (VANSTREELS; PARSONS, 2014). Em condições de estresse ou na presença de infecções secundárias, as aves infectadas podem apresentar letargia, inanição, sinais de dor, penas eriçadas, cabeça decaída, olhos fechados e, ainda, em casos mais severos, podem apresentar mucosas hipocoradas, dispneia, inapetência, êmese e até levar a morte (ATKINSON et al., 1995).

Embora a hemospordiose aviária geralmente ocorra de forma subclínica como citado anteriormente, algumas evidências têm demonstrado que estes parasitos podem exercer uma importante pressão seletiva sobre seus hospedeiros, por meio de efeitos sobre a sobrevivência, sobre o comportamento reprodutivo e da comunidade das aves (VAN RIPER III et al., 1986; DUNN et al., 2011). Asghar et al. (2015) demonstraram que a infecção crônica pode causar uma série de pequenos efeitos adversos que se acumulam e, eventualmente, prejudicam a

qualidade fenotípica e a aptidão das aves e concluíram, apoiado por infecção experimental de aves em cativeiro, que a infecção crônica reduziu a expectativa de vida, bem como o número e a qualidade da prole em aves, efeitos mediados pela degradação dos telômeros. As infecções crônicas provavelmente persistem por toda a vida das aves infectadas (VALKIÜNAS, 2005).

2.3 Ciclo de vida dos hemosporídeos aviários

Em hemosporídeos, os díptero hematófagos (por exemplo, mosquitos do gênero *Culex*, principais transmissores de hemosporídeos do gênero *Plasmodium* e, *Culicoides* para *Haemoproteus*) são considerado o hospedeiro definitivo, onde ocorre a reprodução sexuada do parasito, enquanto a ave é o hospedeiro intermediário, essencial ao desenvolvimento do parasito, porém no qual não há reprodução sexuada (VALKIÜNAS, 2005).

O ciclo de vida de *Plasmodium* spp. (Figura 1) e *Haemoproteus* spp. é semelhante, porém existem algumas diferenças que serão abordadas ao final deste tópico. De maneira geral, o ciclo se inicia quando o invertebrado infectado faz o repasto sanguíneo na ave, inoculando as formas infectantes na mesma, ou seja, os esporozoítos. Por sua vez, os esporozoítos invadem células endoteliais e mononucleares fagocíticas de vários tecidos (em um primeiro momento, principalmente do baço e da pele) e originam criptozoítos, que se desenvolvem por reprodução assexuada, se rompem e liberam grandes quantidades de merozoítos. Este ciclo é denominado merogonia exoeritrocítica primária (VALKIÜNAS, 2005).

A partir daí, os merozoítos ganham a corrente sanguínea e atingem novas células endoteliais e mononucleares fagocíticas (agora em pulmão, baço, fígado e medula óssea), nas quais formam metacriptozoítos (também chamados merontes ou esquizontes teciduais), que se desenvolvem por reprodução assexuada e se rompem, liberando uma grande quantidade de merozoítos. Este ciclo é denominado merogonia exoeritrocítica secundária. (VALKIÜNAS, 2005).

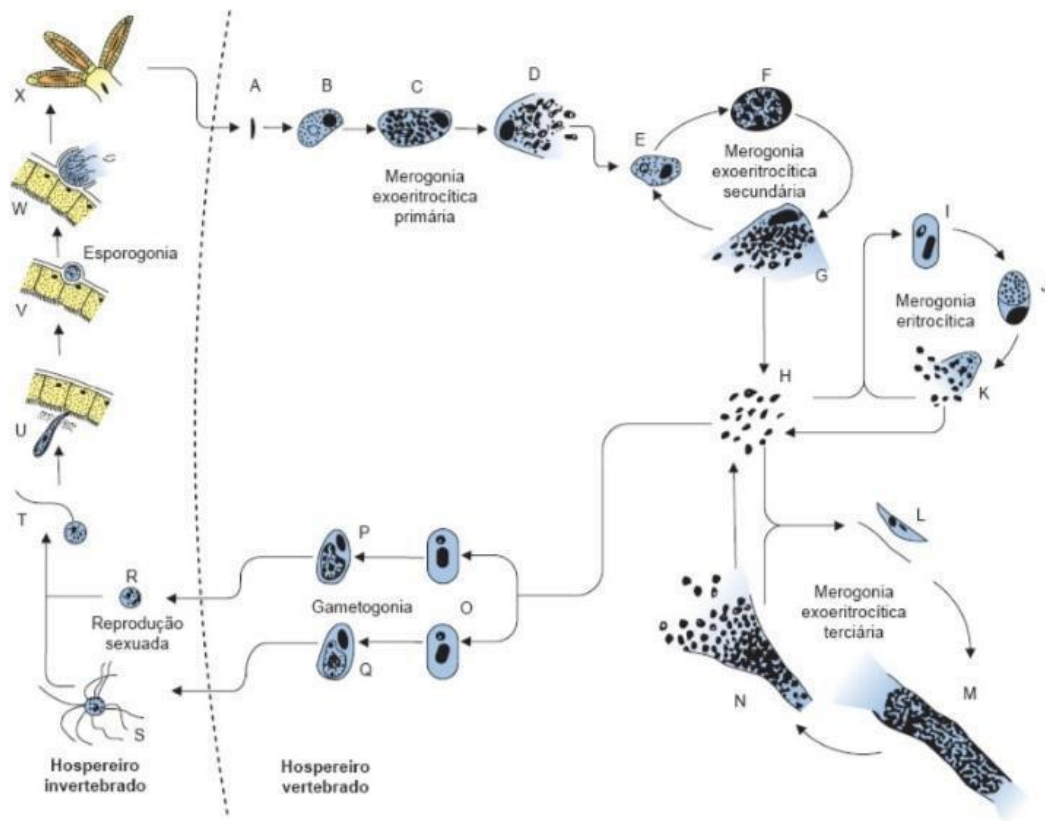


Figura 1 - Ciclo de vida dos hemosporídeos aviários.

Fonte: VANSTREELS, R. E. T.; PEARSONS, N. J. *Malária Aviária e outros Hemosporídeos Aviários*. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Org.). *Tratado de Animais Selvagens*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 2 v, cap. 73.

Os merozoítos resultantes dessa etapa poderão seguir quatro destinos diferentes, dependendo de fatores endógenos e das condições do hospedeiro: 1) podem retornar ao ciclo de merogonia exoeritrocítica secundária; 2) podem invadir células sanguíneas, tipicamente eritrócitos, desenvolvendo-se em trofozoítos, que por reprodução assexuada se transformam em merontes/esquizontes eritrocíticos, os quais se rompem, liberando moderadas quantidades de merozoítos, sendo este ciclo denominado merogonia eritrocítica; 3) os merozoítos podem invadir células endoteliais e mononucleares fagocíticas (desta vez, em uma variedade de tecidos) e desenvolver-se por reprodução assexuada em fanerozoítos (também denominados merontes ou esquizontes teciduais) e, assim, podem permanecer por períodos prolongados, até que finalmente se rompem e liberam quantidades muito grandes de merozoítos. Esse ciclo secundário de reprodução assexuada é denominado merogonia exoeritrocítica terciária; 4) finalmente, uma última opção de destino dos merozoítos é invadir células sanguíneas (tipicamente eritrócitos) e desenvolver-se em trofozoítos, que posteriormente se desenvolvem nas formas sexuais do parasito, macrogametócitos

e microgametócitos. Essa fase de desenvolvimento é denominada gametogonia (VALKIŪNAS, 2005).

Os gametócitos permanecem nos eritrócitos circulantes por períodos prolongados, mas não se desenvolvem até serem ingeridos pelo vetor durante o repasto sanguíneo na ave. Após a ingestão pelo inseto hematófago, os gametócitos serão liberados dos eritrócitos e se transformarão em macro e microgametas. Por ação da baixa temperatura e de fatores químicos, ocorrerá a exflagelação dos microgametas, que desenvolvem mobilidade própria e buscam os macrogametas, para que juntos originem um zigoto, sendo esta a única fase do ciclo em que ocorre a reprodução sexuada (VALKIŪNAS, 2005).

Neste momento, o zigoto desenvolve-se em um oocineto móvel, que se desloca ativamente pelo trato digestório do inseto e invade a lâmina própria da mucosa intestinal, instalando-se na forma de um oocisto, que então produz uma grande quantidade de esporozoítos por meio de reprodução assexuada. Essa etapa do ciclo é denominada esporogonia. Após sua maturação, o oocisto rompe-se e libera os esporozoítos na cavidade celomática do vetor. Os esporozoítos penetram ativamente as glândulas salivares, nas quais permanecem por várias semanas até serem inoculados em uma ave, reiniciando o ciclo (VALKIŪNAS, 2005).

Em relação ao ciclo do gênero *Haemoproteus*, a diferença mais relevante é que não há merogonia eritrocítica, ou seja, a reprodução assexuada ocorre exclusivamente nas células endoteliais e mononucleares fagocíticas e não nos eritrócitos. Desta forma, as únicas formas parasitárias circulantes encontradas nas infecções por *Haemoproteus* são os gametócitos. Isto significa que diante da presença de merontes eritrocíticos (esquizontes), a infecção se trata de hemosporídeos do gênero *Plasmodium*. Além disso, durante a merogonia extraeritrocitária, *Haemoproteus* pode alternativamente gerar uma forma especial de merontes teciduais, os megalomerontes (VALKIŪNAS, 2005).

Os megalomerontes são formados pela invasão de células endoteliais e miofibroblastos pelos merozoítos (principalmente em musculatura estriada), com a formação de merontes teciduais excepcionalmente grandes, que levam 15 a 20 dias para se desenvolver completamente, cada um com dezenas de milhares de merozoítos. Estes merozoítos passam à gametogonia e resultam em grandes quantidades de gametócitos, servindo como um mecanismo para potencializar a

transmissão aos hospedeiros invertebrados durante o período sazonal favorável (VALKIÜNAS, 2005).

Desta forma, o ciclo nas aves pode ser dividido em quatro fases: 1) pré-patente, que corresponde à fase exclusivamente exoeritrocítica do ciclo; 2) aguda, quando as primeiras formas eritrocíticas começam a aparecer e há um grande número de células infectadas, ou seja, a fase de parasitemia; 3) crônica, quando a infecção já é suficientemente duradoura e o pico de parasitemia já se findou; e 4) latente, quando a parasitemia já está baixa o suficiente para ser combatida e eliminada pelo sistema imune do hospedeiro (VALKIÜNAS, 2005).

2.4 *Plasmodium* spp.

O gênero *Plasmodium* apresenta uma diversidade moderada, com 55 espécies conhecidas por meio de critérios morfológicos (VALKIÜNAS; IEZHOVA, 2018), sendo conhecido pela grande flexibilidade em alternar espécies de hospedeiro, moderada a grave patogenicidade e, geralmente, baixa prevalência (VALKIÜNAS, 2005; LANDAU et al., 2010). Segundo Valkiünas (2005), existem cinco subgêneros: *Haemamoeba* com dez espécies conhecidas; *Giovannolaia* com quinze; *Novyella* com nove; *Bennettinia* com apenas uma; e *Huffia*, com três espécies. A morfologia das formas parasitárias no hospedeiro vertebrado é distinta entre os subgêneros, porém, as diferenças epidemiológicas ou patológicas são muito mais sutis (VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON, 2008; HELLGREN, 2009).

Seus vetores são mosquitos da família Culicidae, especialmente o gênero *Culex*, mas também *Mansonia*, *Culiseta* e *Aedeomyia*. Além disso, em condições laboratoriais foi demonstrado que *Aedes*, *Anopheles* e *Armigeres* podem ser hospedeiros competentes (VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON, 2008).

2.5 *Haemoproteus* spp.

O gênero *Haemoproteus* possui uma grande diversidade, com 177 espécies conhecidas que podem ser identificadas por meio de características morfológicas (VALKIÜNAS; IEZHOVA, 2022), porém com limitada flexibilidade em alternar espécies de hospedeiro, baixa patogenicidade e alta prevalência (VALKIÜNAS, 2005). Apesar de a patogenicidade de *Haemoproteus* spp. ser considerada menor, estudos mais

recentes sugerem que hemosporídeos em geral são mais virulentos do que se acreditava anteriormente, sendo que os estágios exoeritrocitários podem causar doença grave, especialmente em hospedeiros aviários não adaptados, sugerindo a existência de um grupo de infecções malignas subestimadas (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2017).

Segundo Valkiūnas (2005), existem dois subgêneros: *Haemoproteus*, com seis espécies conhecidas que acometem apenas aves das ordens Columbiformes (pombos e rolinhas) e algumas aves marinhas das ilhas Galápagos (Famílias Fregatidae e Laridae); e *Parahaemoproteus*, com 126 espécies descritas, as quais acometem uma grande variedade de aves. De modo geral, os parasitos do gênero *Haemoproteus* são mais específicos, com alguma flexibilidade para alternar entre aves da mesma família taxonômica, porém, são raros os casos de alternância entre ordens taxonômicas de hospedeiro (VALKIŪNAS, 2005; HELLGREN, 2009; ATKINSON, 2008).

Os vetores do subgênero *Parahaemoproteus* são dípteros da família Ceratopogonidae, mais especificamente do gênero *Culicoides*; enquanto o subgênero *Haemoproteus* é veiculado por moscas da família Hippoboscidae, do gênero *Pseudolynchia*, mas também *Ornithomyia*, *Stilbometopa*, *Lynchia* e *Microlynchia* (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008).

Percebe-se que uma espécie de hemosporídeo pode ser flexível e ter vários hospedeiros invertebrados competentes, adaptando-se de modo oportunista à disponibilidade desses insetos, conforme a região e a época do ano. À exemplo, *Plasmodium relictum*, uma espécie cosmopolita e extensivamente estudada, que já teve pelo menos 26 espécies de mosquitos identificados como potenciais hospedeiros (VALKIŪNAS, 2005; HELLGREN, 2009; ATKINSON, 2008).

2.6 Diagnóstico de hemosporídeos aviários

A análise das extensões ou esfregaços sanguíneos foi o método pioneiro no diagnóstico dos hemosporídeos aviários, o qual permite a identificação morfológica destes parasitos. Esta identificação é altamente específica, porém é complexa e requer treinamento, pois *Plasmodium* spp. e *Haemosproteus* spp. possuem muitas semelhanças morfológicas (VALKIŪNAS, 2005). Uma característica particular desses dois gêneros, é a presença em suas formas eritrocíticas adultas, ou seja, nos

merontes eritrocíticos e nos gametócitos, de acúmulo intracelular de pigmento malárico, denominado hemozoína, o qual é produto da degradação da hemoglobina. Além disso, o diagnóstico morfológico é dificultado devido à baixa parasitemia, comum nas infecções crônicas e também nos casos de infecções mistas, as quais não são incomuns (VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON, 2008; LANDAU et al, 2010).

Além do pigmento malárico - inclusive quanto à sua quantidade, formato e distribuição - outros critérios são utilizados para realizar a identificação de hemosporídeos, como por exemplo: a presença de um ou mais parasitos infectando uma mesma célula sanguínea; o posicionamento do parasito em relação ao núcleo das células do hospedeiro e a ocorrência de deslocamento dessa estrutura; presença ou ausência de vacúolo; tamanho e aspecto do parasito, entre outros (VALKIÜNAS, 2005).

Com o avanço dos métodos de biologia molecular, em especial a PCR, houve um grande avanço na identificação dos hemosporídeos. Estes métodos podem fornecer o diagnóstico rápido e confiável, mesmo quando o hospedeiro mostra baixos níveis de parasitismo (RICHARD et al., 2002), podendo melhorar a sensibilidade do diagnóstico, além de possibilitar a detecção em material congelado de bancos de amostras (PINHEIROB et al., 1993; RICHARD et al., 2002; VALKIÜNAS et al., 2008). Além disso, permite detectar linhagens diferentes de parasitos, através da amplificação de uma sequência genômica específica (HELLGREN et al., 2004; VALKIÜNAS et al., 2008), adicionando assim, informações importantes no conhecimento a respeito da filogenia e especificidade da relação hemosporídeo-hospedeiro (RICKLEFS et al., 2004; BENSCH et al., 2007).

Já a histopatologia, viabiliza o diagnóstico pós-morte da hemosporidiose em aves e baseia-se no exame microscópico de secções histológicas de tecidos fixadas em formalina. O diagnóstico se confirma através da visualização de merontes teciduais ou megalomerontes em macrófagos, miofibroblastos e células endoteliais de órgãos (baço, fígado, medula óssea, pulmão, coração, rim, dentre outros). (LUNA, 1992; VALKIÜNAS, 2005; ATKINSON et al., 2001). Porém, a visualização dos estágios exoeritrocíticos pode ser desafiadora, pois é um achado raro e difícil de evidenciar, mesmo quando há lesões teciduais difusas e graves. Desta forma, a técnica de hibridização *in situ* cromogênica pode contribuir para um diagnóstico adequado. Esta técnica utiliza sondas moleculares específicas para a identificação e

discriminação de *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp., em cortes histológicos (HIMMEL et al., 2019).

Existem ainda outras possibilidades diagnósticas para a hemosporidiose aviária, como decalques teciduais, inoculação experimental em filhotes de patos ou pintinhos, detecção de anticorpos, por meio do teste imunoenzimático indireto (ELISA), desenvolvido com sucesso para o diagnóstico sorológico de *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp. em canários e pinguins para fins experimentais (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON et al., 2008; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Apesar dos numerosos estudos sobre a hemosporidiose aviária, um número crescente de sequências é depositado sem dados morfológicos e/ou identificados apenas ao nível de gênero, sendo que apenas 20% das linhagens desses parasitos estão associadas a descrições morfológicas (CLARK et al., 2015). Portanto, idealmente, o diagnóstico deve se basear na taxonomia integrativa, utilizando várias metodologias para a identificação e caracterização de espécies, combinando o uso de dados morfológicos e moleculares, que trarão informações complementares (VALKIŪNAS et al., 2008; BRAGA et al., 2011; CLARK et al., 2015; PALINAUSKAS et al., 2015; HÉRNANDES-LARA et al., 2018). Dessa forma, evita-se possíveis confusões de classificação, em que espécies dadas como sinônimas podem ser, na verdade, crípticas (organismos que não apresentam caracteres morfológicos distinguíveis, mas são geneticamente distintos, ou vice-versa) (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2023; PERKINS, 2000; PACHECO; ESCALANTE, 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Detectar a infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., por meio do exame microscópico parasitológico de extensão sanguínea e Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em aves do estado de Mato Grosso.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a parasitemia e realizar a caracterização morfológica de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em exame microscópio parasitológico, a partir de extensão sanguínea das aves positivas;

Realizar a caracterização molecular, por meio do sequenciamento e análise filogenética, das amostras positivas na PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedimentos éticos

Os procedimentos de coleta de amostras biológicas para os pacientes atendidos no HOVET/UFMT, *campus* Cuiabá, deste estudo, foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT (protocolo CEUA nº 23108.035844/2021-10) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença ICMBio nº 79317-1).

4.2 Coleção de amostras

Foram utilizadas amostras biológicas de sangue de aves de vida livre, resgatadas pelos órgãos ambientais competentes (como a Secretaria de Estado de Meio Ambiente de Mato Grosso - SEMA) e aves de cativeiro, oriundas do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Mato Grosso (CEMPAS-UFMT), do Batalhão de Polícia Militar Ambiental de Várzea Grande (BPM AVG/MT) e da comunidade em geral (aves mantidas como animais de estimação). Todas estas aves, tanto as de cativeiro quanto as de vida livre, foram atendidas no período de setembro de 2016 a março de 2024 no Setor de Animais Selvagens (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET/UFMT), *campus* Cuiabá. Desta forma, parte das amostras que compõem este estudo foram cedidas diretamente pelo SAS (banco de amostras de sangue), enquanto outras amostras de sangue e extensão sanguínea são provenientes de aves atendidas no SAS, mas que foram encaminhadas para exames hematológicos no Laboratório de Análises Clínicas de Aves e Répteis (LANCAR), da mesma instituição.

Quando um animal é entregue pelos órgãos ambientais ao SAS, um Termo de Resgate e Recebimento de Animais Silvestres é preenchido por este órgão, sendo

este documento anexado ao prontuário do animal. Neste documento deve constar as informações de cada ave, como a identificação da espécie, o local de origem ou de resgate, data e o histórico clínico quando existir. Posteriormente, as aves passam por avaliação clínica, realizam exames e coleta de amostras biológicas de acordo com a necessidade individual.

Apesar da avaliação clínica ter sido realizada pela equipe do SAS, a mesma não foi direcionada para a avaliação quanto aos efeitos que a infecção de hemospórideos pode gerar na saúde geral das aves. A avaliação segue um protocolo pré-estabelecido dentro deste setor, voltado inicialmente para o atendimento emergencial e estabilização do paciente e, posteriormente, tratamento clínico individualizado de acordo com o quadro clínico de cada animal. A maioria dos casos envolve politraumatismos, como fraturas de patas, de asas, TCE (traumatismo cranioencefálico), dentre outros. Devido a complexidade dos atendimentos, múltiplas lesões e causas de debilitação destas aves, a determinação da causa de sinais clínicos como anemia, alterações de enzimas hepáticas, renais e outras, que poderiam ser associadas a alterações hematológicas e/ou lesões teciduais causadas pela infecção de hemospórideos, fica comprometida, sendo difícil a determinação da causa e efeito nesses pacientes.

As amostras de sangue coletadas para avaliações hematológicas realizadas no LANCAR, foram obtidas da veia jugular e, por vezes, das veias metatársica medial ou ulnar, sendo utilizadas agulhas e seringas estéreis de dimensões variáveis de acordo com o tamanho do vaso e do peso/tamanho do animal e armazenadas em tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), desde que o volume máximo coletado não ultrapassasse 1% do peso vivo da ave (CLARK et al., 2009). No LANCAR, procedeu-se com a confecção de lâminas de extensão sanguínea e, após finalizadas as análises hematológicas, o sangue foi acondicionado a -20 °C para posterior extração de DNA e análises moleculares.

As lâminas de extensão sanguínea foram secas ao ar, fixadas em metanol absoluto e coradas com coloração de Rosenfeld, uma combinação dos corantes May-Grunwald e Giemsa (ROSENFELD, 1974), e ainda, nos casos em que se tinha disponível lâmina em duplicata, foi realizada a coloração de Giemsa 10%, a qual é considerado o método mais adequado de coloração para avaliação de hemospórideos.

4.3 Pesquisa hematológica e caracterização morfológica

A leitura das extensões sanguíneas de todas as aves foi realizada na UFMT em aumento de 100x, sendo avaliada toda a extensão da lâmina, através de Microscópio óptico Leica DM 500 com Sistema de captura de imagem Leica DMC4500om e, com o auxílio do software ImageJ, foi realizada a captura das imagens.

Posteriormente, as lâminas sabidamente com a presença de hemosporídeos e lâminas de aves com diagnóstico molecular positivo foram encaminhadas ao Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foi realizada a caracterização morfológica. Na UFMG, os hemosporídeos foram fotografados utilizando-se um Microscópio de luz Olympus CX31 equipado com o Sistema de imagem Q-Color5 (Olympus, Tóquio, Japão) e software de imagem QCapture Pro7 (QImaging, Surrey, Canadá). As microfotografias foram utilizadas para a caracterização morfológica das formas observadas: com auxílio do software ImageJ, os parasitos e suas estruturas ou posicionamento dentro das células hospedeiras foram mensurados a fim de se identificar as possíveis espécies (VALKIÜNAS; IEZHOVA, 2018; VALKIÜNAS; IEZHOVA, 2022).

A parasitemia foi estimada pela análise de 200 campos microscópicos em aumento de 1000x, analisando apenas as regiões da lâmina sem sobreposição de hemácias, campos que continham aproximadamente 100 células cada. Desta forma, a intensidade da infecção foi determinada pela contagem do número de hemácias parasitadas por 20.000 células totais.

4.4 Extração de DNA

Para o diagnóstico molecular de hemosporídeos, foi realizada a extração de DNA através do método fenol-clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Foi utilizado 20 µL de sangue de cada ave, sendo acondicionado em um microtubo de 1,5 mL, devidamente identificado. Neste microtubo foi adicionado 247,5 µL de solução de lise (50mM de NaCl; 50mM de Tris-HCl pH = 7,4; 10mM de EDTA; 1% (v/v) de Triton X-100) e 2,5 µL de Proteinase-K [20mg/mL] e o material foi mantido em banho-maria à temperatura de 60 °C por 18

a 24 horas. Em seguida, as amostras foram agitadas rapidamente em vórtex e centrifugadas por 20 segundos a 3306g.

Após esta etapa, foi adicionado 125 µL de fenol tamponado (Sigma-Aldrich®) e 125 µL de clorofórmio, (Sigma-Aldrich®). As amostras foram homogeneizadas manualmente e centrifugadas por 5 minutos a 15339g, para a separação do sobrenadante. Desta forma, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo devidamente identificado, onde foram acrescentados 300 µL de solução de clorofórmio álcool-isoamílico (Sigma-Aldrich®) (em proporção de 24:1), para nova centrifugação, conforme descrito acima.

A próxima etapa consistiu em coletar cuidadosamente a porção inferior da solução e descartá-la e, aos microtubos foram adicionados 300 µL de clorofórmio e, após, nova centrifugação por 5 min a 15339g. Novamente, a fase inferior foi descartada e em seguida, 600 µL de isopropanol foram adicionados para posterior centrifugação por 20 min a 15339g.

O produto da centrifugação foi totalmente descartado e o excesso foi dispensado em papel toalha, para então, a cada amostra ser adicionado 600 µL de etanol 70% seguindo-se centrifugação por 20 min. a 15339g. Ao final desse processo, descartou-se o etanol 70% e os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente, até evaporação total do álcool. O precipitado foi eluído utilizando 50 µL de Tris-EDTA (TE) e as amostras foram conservadas em freezer a -20 °C.

4.5 Diagnóstico de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.

Todas as amostras extraídas foram submetidas a uma PCR convencional (cPCR) para detectar a presença de hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp., a qual amplifica um fragmento de 154 pares de bases (pb) de uma região altamente conservada do gene 18S rRNA SSU mitocondrial (Fallon et al., 2003).

Para esta reação foram utilizados 2 µL do DNA extraído do sangue das aves, aplicado em 13 µL de reação contendo: 1X de solução tampão com magnésio I0X (Sigma®); 3,5 mM de MgCl₂ (Sigma®); 0,25 mM dNTP (Ludwig®); 1 U Taq DNA polimerase (Platinum Invitrogen®); 0,2 µM de cada iniciador e água ultrapura estéril em quantidade suficiente para o volume final de 15 µL. Os iniciadores e fragmentos, as condições do programa da amplificação em termociclador e demais informações

se encontram na Tabela 1. Como controle positivo utilizou-se uma amostra de *Plasmodium gallinaceum* e como controle negativo, utilizou-se água ultrapura estéril.

Os resultados dos ensaios de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com o GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®) e visualizado em sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad®).

Além disso, todas as amostras foram submetidas a uma Nested-PCR (nPCR) para amplificação de um fragmento de 478 pb que abrange parte do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade b (*cytb*) (HELLGREN et al., 2004). Este protocolo permite a detecção de *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp., porém, no presente estudo utilizou-se apenas os oligonucleotídeos que amplificam os fragmentos de DNA dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, descritos na segunda reação da nPCR. Para a primeira reação de PCR foram utilizados 3 µL de DNA, em um volume total de 25 µL do mix de reação contendo: 1X de solução tampão IOX (Sigma®); 3 mM MgCl₂ (Sigma®); 0,5 mM dNTP (Ludwig®); 0,5 U Taq DNA polimerase (Sigma®); 0,6 mM de cada iniciador e água ultrapura estéril em quantidade suficiente para o volume final de 25 µL.

Para a segunda reação, 1 µL do produto amplificado foi adicionado a 24 µL do mix de reagentes em concentrações idênticas às descritas para a primeira reação. Informações complementares se encontram na Tabela 1. A utilização dos controles positivos e negativos seguiu os mesmos critérios da cPCR, assim como a revelação do material amplificado.

As amostras que foram positivas em cPCR e nPCR passaram por uma nova nPCR no Laboratório de Malária e Genômica de Parasitos da UFMG, seguindo o mesmo protocolo já realizado na UFMT, para proceder a purificação e sequenciamento. Assim, o produto da PCR (2 µl) foi adicionado a uma solução tampão (1,6 µL) contendo azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30% e água e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante em tampão TBE-1x. A eletroforese foi executada por 45 min. a 180 volts e foi aplicado um peso molecular de 1kb (Ludwig®) como marcador da altura dos fragmentos. O gel foi fixado em álcool etílico 10% e ácido acético 0,5% por 10 minutos, corado por nitrato de prata 2,3% durante 15 minutos e revelado em formaldeído 3% e hidróxido de sódio 37,5% (SANGUINETTI et al., 1994).

Tabela 1 - Descrição dos genes-alvo, iniciadores e condições em termociclador utilizados no diagnóstico molecular de *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp. a partir de amostras de sangue de aves oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Silvestres (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), Cuiabá, MT, no período de setembro de 2016 a março de 2024.

Gene-alvo	Iniciadores	Condições em termociclador	Fragmento amplificado	Referência
18S rRNA SSU mitocondrial ^a / <i>Plasmodium</i> spp. e/ou <i>Haemoproteus</i> spp.	343F: 5'-GCTCACGCATCGCTTCT-3' 496R: 5'-GACCGGTCATTTTCTTTG-3'	94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 62 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e 10 s; e extensão final em 72 °C por 3 min.	154 pb ^b	Fallon et al. (2003); Roos et al. (2015)
<i>cytb</i> ^c / <i>Plasmodium</i> spp. e/ou <i>Haemoproteus</i> spp.	HaemNFI: 5'- CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3' HaemNR3: 5'- ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'	1º Reação: 94 °C por 3 min; 20 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 45 seg; e extensão final em 72 °C por 10 min.	478 pb	Hellgren et al. (2004)
<i>cytb/Plasmodium</i> spp. e/ou <i>Haemoproteus</i> spp.	HaemF: 5'- ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3' HaemR2: 5'- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'	2º Reação: 94 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 45 seg; e extensão final em 72 °C por 10 min.		

^aRNA ribossômico de subunidade pequena (do inglês, "small subunit ribosomal RNA")

^bpb: pares de base

^c*cytb*: citocromo B

As amostras com fragmentos positivos em gel de acrilamida foram submetidas ao processo de purificação, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001), com a finalidade de eliminar o excesso de iniciadores, impurezas e bandas inespecíficas. Para isso, 50 µL do amplicon da nPCR foram transferidos para novos tubos, aos quais adicionou-se o mesmo volume de PEG8000 (polietilenoglicol 20%), sendo o material mantido a 37 °C por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas para a remoção e descarte do sobrenadante, seguindo-se de duas lavagens com etanol 80% (5 minutos a 31304g) e, ao final da purificação, o DNA foi diluído em água ultrapura.

O produto foi sequenciado pelo método de dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977) em sequenciador automático capilar ABI 3730 DNA Analyser, sendo obtido uma sequência para cada um dos iniciadores. O produto da purificação com concentrações entre 3 e 10 ng/µL foram sequenciados utilizando-se a plataforma do Instituto de Pesquisa Rene Rachou – Belo Horizonte, MG. Utilizou-se 1 µL de cada amostra purificada, 5,5 µL de água ultrapura, 2,5 µL BygDyeTerminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™), juntamente com 1 µL dos iniciadores internos descritos na nPCR, totalizando 10 µL de volume final. A reação de sequenciamento apresentou as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C antes da reação cíclica, a qual é constituída de 35 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 15 segundos a 50 °C e 4 minutos a 60 °C. Por fim, as corridas foram feitas em capilares de 50 cm utilizando o polímero POP7 e as sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.4 utilizando o Base Caller KB.

4.6 Análise filogenética

A qualidade e edição das sequências de hemosporídeos obtidas foi avaliada utilizando o software ChromasPro (Technelysium Pty Ltd). As sequências obtidas foram comparadas àquelas depositadas em bancos de dados de livre acesso como o Genbank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>) e o MalAvi (BENSCH et al., 2009) (<http://mbioserv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>). Para a reconstrução filogenética dos hemosporídeos, as sequências foram alinhadas utilizando-se o software MEGA11 (TAMURA et al., 2021), sendo considerado a divergência em um ou mais nucleotídeos suficientes para a descrição de linhagens distintas do *cytb* (BENSCH et al., 2004).

Para as inferências filogenéticas por análise bayesiana foi utilizado o software Mr. Bayes 3.2.7. (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), aplicando-se o modelo de evolução de nucleotídeos GTR+G+I definido de acordo com o software jModeltest2 (DARRIBA et al., 2012), sendo utilizado o menor critério de informação Akaike para escolha do melhor modelo. Foram executadas duas cadeias Markov simultaneamente por 5.000.000 gerações, amostradas a cada 1000 gerações. As primeiras 1.250 (25%) árvores foram descartadas e as árvores remanescentes foram utilizadas para o cálculo das probabilidades posteriores. Como grupo externo foi utilizado o parasito *Leucocytozoon fringilinarum* (VIEIRA et al., 2023).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil das aves amostradas

Entre setembro de 2016 a março de 2024 foram coletadas amostras de sangue de 352 aves de 61 espécies diferentes, pertencentes a 17 ordens (Tabela 2). As ordens Accipitriformes, Falconiformes, Psittaciformes e Strigiformes foram as mais abundantes, correspondendo, juntas, a 81,25% dos indivíduos.

Das espécies amostradas, algumas se destacaram em maior número de indivíduos. Duas delas foram as mais representativas: *Ara ararauna* com 95 indivíduos (26,99%) e *Rupornis magnirostris* com 32 indivíduos (9,09%). Outras espécies com maior número de indivíduos foram: *Amazona amazonica* (17), *Nymphicus hollandicus* (15), *Tyto furcata* (14), *Cariama cristata* (12), *Caracara plancus* (12) e *Ramphastos toco* (11). Todas as outras espécies contaram com 10 ou menos indivíduos.

Tabela 2 - Diversidade de espécies, testes diagnósticos empregados para cada animal e origem das 352 aves oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Silvestres (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), Cuiabá, MT, no período de setembro de 2016 a março de 2024, submetidas ao diagnóstico morfológico e/ou molecular de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp..

ORDEM (nº de aves) Espécie (nº de aves)	Nome popular (grau de ameaça ^a)	Nº de aves testadas em lâmina	Nº de aves testadas em cPCR	Nº de aves testadas em nPCR	Origem ^b (nº aves)	Localidade ^c (nº aves)
ACCIPITRIFORMES (41)						
<i>Gampsonyx swainsonii</i> (1)	Gaviãozinho (LC)	1	na ^d	na	VL	6
<i>Harpia harpja</i> (1)	Gavião-real/Harpia (NT)	1	na	na	VL	7
<i>Heterospizias meridionalis</i> (2)	Gavião-caboclo (LC)	1	2	2	VL	3
<i>Ictinia plumbea</i> (3)	Sovi (LC)	3	na	na	VL	6 (2), 13 (1)
<i>Pandion haliaetus</i> (1)	Águia-pescadora (LC)	1	na	na	VL	6
<i>Rupornis magnirostris</i> (32)	Gavião-carijó (LC)	31	14	14	VL (18), C (14)	1 (1), 4 (1), 6 (28), 15 (2)
<i>Urubitinga urubitinga</i> (1)	Gavião-preto, Urubitinga (LC)	1	na	na	VL	6
ANSERIFORMES (6)						
<i>Anser cygnoides</i> (1)	Ganso-africano (EN)	1	1	1	C	6
<i>Cairina moschata</i> (3)	Pato-do-mato (LC)	na	3	3	C	6
<i>Chauna torquata</i> (2)	Tachã (LC)	na	2	2	C	6
CARIAMIFORMES (12)						
<i>Cariama cristata</i> (12)	Seriema (LC)	5	11	11	VL (10), C (2)	3 (1), 6 (9), 8 (1), 11 (1)
CATHARTIFORMES (1)						
<i>Coragyps atratus</i> (1)	Urubu-preto (LC)	1	1	1	VL	6
CICONIIFORMES (5)						
<i>Jabiru mycteria</i> (4)	Tuiuiú (LC)	1	4	4	VL	6
<i>Mycteria americana</i> (1)	Cabeça-seca (LC)	1	1	1	VL	10
COLUMBIFORMES (3)						
<i>Columba livia</i> (1)	Pomba-doméstica (LC)	na	1	1	VL	6
<i>Geotrygon montana</i> (1)	Pariri (LC)	na	1	1	VL	6
<i>Patagioenas picazuro</i> (1)	Pomba-asa-branca (LC)	1	1	1	VL	14
CUCULIFORMES (1)						
<i>Playa cayana</i> (1)	Alma-de-gato (LC)	1	1	1	VL	6
FALCONIFORMES (18)						
<i>Caracara Plancus</i> (12)	Carcará (LC)	12	3	3	VL (5), C (7)	6
<i>Falco femoralis</i> (2)	Falcão-de-coleira (LC)	1	1	1	C	6
<i>Falco sparverius</i> (1)	Quiriquiri (LC)	1	na	na	C	6

<i>Herpetotheres cachinnans</i> (1)	Acauã (LC)	1	1	1	VL	6
<i>Milvago chimachima</i> (1)	Gavião-carrapateiro (LC)	1	1	1	VL	6
<i>Micrastur semitorquatus</i> (1)	Falcão-relógio (LC)	1	1	1	VL	3
GALIFORMES (10)						
<i>Gallus gallus</i> (7)	Galinha/galo (LC)	7	4	4	C	6
<i>Ortalis conicollis</i> (1)	Aracuã-do-pantanal (LC)	1	1	1	VL	15
<i>Pavo cristatus</i> (2)	Pavão-comum (LC)	2	2	2	C	6
GRUIFORMES (3)						
<i>Mustelirallus albicollis</i> (1)	Sanã-carijó (LC)	1	1	1	VL	6
<i>Porphyrio martinica</i> (2)	Frango-d'água-azul (LC)	1	2	2	VL	6
NYCTIBIIFORMES (5)						
<i>Nyctibius grandis</i> (1)	Urutau-grande (LC)	1	1	1	VL	6
<i>Nyctibius griseus</i> (4)	Urutau-comum (LC)	4	4	4	VL	6
PASSERIFORMES (1)						
<i>Passer domesticus</i> (1)	Pardal (LC)	na	1	1	VL	6
PELECANIFORMES (3)						
<i>Bulbucus ibis</i> (1)	Garça-vaqueira (LC)	1	1	1	VL	6
<i>Egretta thula</i> (1)	Garça-branca-pequena (LC)	1	1	1	VL	6
<i>Nycticorax nycticorax</i> (1)	Socó-dorminhoco (LC)	1	1	1	VL	6
PICIFORMES (13)						
<i>Pteroglossus castanotis</i> (1)	Araçari-castanho (LC)	1	na	na	VL	5
<i>Ramphastos toco</i> (11)	Tucano-toco (LC)	na	11	11	VL (3), C (8)	6
<i>Veniliornis affinis</i> (1)	Pica-pau-vermelhado (LC)	1	1	1	VL	6
PSITTACIFORMES (187)						
<i>Agapornis roseicollis</i> (2)	Agapornis (LC)	na	2	2	C	6
<i>Alipiopsitta xanthops</i> (3)	Papagaio-galego (NT)	1	3	3	VL (1), C (2)	6
<i>Amazona aestiva</i> (9)	Papagaio-verdadeiro (LC)	4	8	8	VL (4), C (5)	6
<i>Amazona amazonica</i> (17)	Papagaio-do-mangue (LC)	5	16	16	VL (4), C (13)	6
<i>Amazona ochrocephala</i> (2)	Papagaio-campeiro (LC)	1	1	1	VL (1), C (1)	6
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (3)	Arara-azul (VU)	1	3	3	VL	4 (1), 6 (2)
<i>Ara ararauna</i> (95)	Arara-canindé (LC)	73	55	55	VL (86), C (9)	3 (2), 4 (4), 5 (1), 6 (82), 11(3), 14 (1), 15 (2)
<i>Ara chloropterus</i> (9)	Arara-vermelha (LC)	4	9	9	VL (6), C (3)	2 (1), 6 (5), 15 (3)
<i>Ara macao</i> (2)	Aracanga (LC)	na	2	2	VL	6
<i>Ara severus</i> (1)	Maracanã-guaçu (LC)	1	1	1	C	6

<i>Brotogeris chiriri</i> (8)	Periquito-do-encontro-amarelo (LC)	4	7	7	VL (7), C (1)	6 (7), 15 (1)
<i>Diopsittaca nobilis</i> (5)	Maracanã-nobre (LC)	2	4	4	VL	6 (3), 15 (2)
<i>Eupsittula aurea</i> (9)	Periquito-rei (LC)	4	8	8	VL (7), C (2)	5 (1), 6 (8)
<i>Nymphicus hollandicus</i> (15)	Calopsita (LC)	14	15	15	C	6 (14), 15 (1)
<i>Primolius auricolis</i> (2)	Maracanã-de-colar (LC)	1	2	2	VL (1), C (1)	6
<i>Primolius maracana</i> (2)	Maracanã (NT)	1	1	1	VL (1), C (1)	6
<i>Psittacara leucophtalmus</i> (2)	Periquitão (LC)	2	2	2	VL (1), C (1)	6
RHEIFORMES (3)						
<i>Rhea americana</i> (3)	Ema (NT)	na	3	3	VL (1), C (2)	6
STRIGIFORMES (40)						
<i>Asio clamator</i> (5)	Coruja-orelhuda (LC)	4	3	3	VL (2), C (3)	6
<i>Athene cunicularia</i> (10)	Coruja-buraqueira (LC)	9	6	6	VL (6), C (4)	6 (8), 12 (2)
<i>Glaucidium brasilianum</i> (4)	Caburé (LC)	4	1	1	VL (1), C (3)	6 (2), 14 (2)
<i>Megascops choliba</i> (7)	Corujinha-do-mato (LC)	7	4	4	VL (2), C (5)	2 (1), 6 (5), 12 (1)
<i>Tyto furcata</i> (14)	Suindara/Coruja-da-igreja (LC)	13	9	9	VL (4), C (10)	3 (1), 6 (11), 9 (1), 15 (1)
Total (%)		244	246	246		

^aGrau de ameaça segundo a Lista Vermelha da The International Union for Conservation of Nature's (IUCN) (<https://www.iucnredlist.org/en>): NE: não avaliado; DD: dados insuficientes; LC: menor preocupação; NT: quase ameaçado; VU: vulnerável; EN: em perigo; CR: criticamente em perigo; EW: extinto na natureza; EX: extinto.

^bOrigem: vida livre (VL), cativo (C).

^cLocalidade: 1. Barão do Melgaço, 2. Barra dos Bugres, 3. Cáceres, 4. Campo Verde, 5. Chapada dos Guimarães, 6. Cuiabá, 7. Juína, 8. Nossa Senhora do Livramento, 9. Nova Mutum, 10. Nova Olímpia, 11. Rondonópolis, 12. Santo Antônio do Leverger, 13. São José do Rio Claro, 14. Tangará da Serra, 15. Várzea Grande.

^dna: não avaliada pela ausência da amostra (lâmina ou sangue).

Todas as aves foram provenientes dos municípios do estado de Mato Grosso (Figura 2). Elas estavam distribuídas em 15 municípios, sendo que o com maior número de aves foi Cuiabá, com 86,36% das aves amostradas.

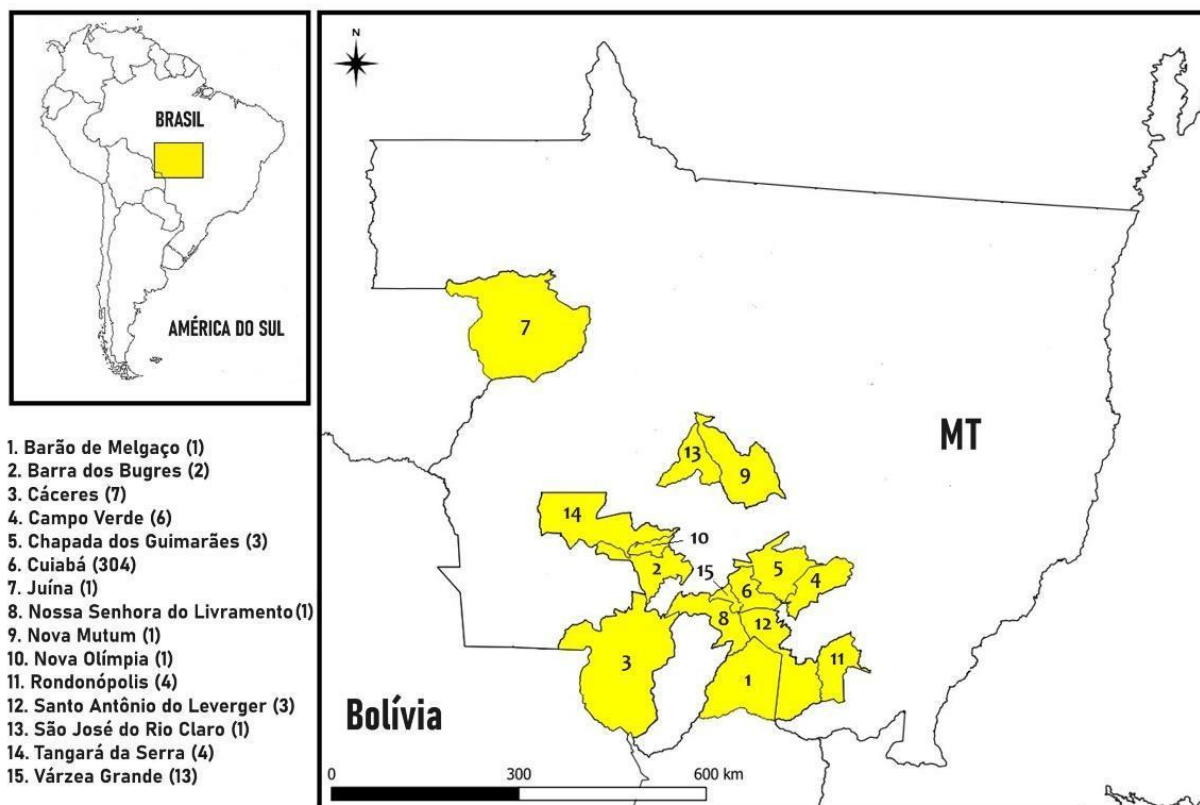


Figura 2 - Mapa do estado de Mato Grosso com a localidade de origem das 352 aves testadas para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., oriundas do atendimento da rotina hospitalar do Setor de Animais Silvestres (SAS) do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (HOVET-UFMT), no período de setembro de 2016 a março de 2024. O número de aves de cada município está indicado entre parênteses.

Quanto à origem, 219 das aves amostradas (62,22%) foram de vida livre, enquanto 133 (37,78%) foram de cativeiro. As aves de rapina (ordens Accipitriformes, Falconiformes, Cathartiformes e Strigiformes) agrupadas totalizaram 100 indivíduos, dos quais 51% eram de vida livre e 49% de cativeiro. Os psitacídeos (ordem Psittaciformes) contou com 187 aves das quais 69,52% eram de vida livre e 30,48% de cativeiro. As demais ordens de aves contam com um menor número de indivíduos cada e, quando agrupadas, somam 65 aves, sendo destas, 58,46% de vida livre e 41,54% de cativeiro.

5.2 Perfil das aves positivas, frequência e diversidade de hemopsporídeos

Após a realização do diagnóstico morfológico e/ou detecção molecular, foi verificado que 12 das 17 ordens (70,59%) de aves amostradas neste estudo estavam infectadas com *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp., 30 das 61 espécies (49,18%) e 73 das 352 aves (20,74%) foram positivas em pelo menos uma das técnicas diagnósticas empregadas neste estudo (Tabela 3). Nem todas as aves do estudo possuíam amostras de sangue e lâmina de extensão sanguínea para realização de todas as técnicas diagnósticas disponíveis, conforme apresentado na tabela 3. Diante disso, se avaliarmos os resultados isoladamente por técnica diagnóstica, 11,7% (27/244) das aves foram positivas na extensão sanguínea, 23,98% (59/246) na cPCR e 14,63% (36/246) na nPCR.

Das 352 aves, 132 possuíam tanto sangue quanto lâmina, ou seja, onde foi possível o diagnóstico pelas 3 técnicas, nas quais obtivemos o seguinte resultado: 12 (9,09%) positivas no exame parasitológico direto da extensão sanguínea; 33 (25%) na cPCR; e 20 (15,15%) na nPCR. Todas as 12 aves positivas em lâmina tiveram resultado positivo também na cPCR e nPCR. Porém, 18 aves positivas na cPCR e/ou na nPCR foram negativas no exame parasitológico direto da extensão sanguínea (destas 18 e sete aves eram positivas tanto na cPCR quanto na nPCR e, 11 positivas somente na cPCR). Destas 132 aves, das quais obtivemos amostras submetidas para as 3 técnicas diagnósticas, foi possível o sequenciamento de 16 aves.

No entanto, a caracterização morfológica não foi possível de ser realizada, com exceção de um espécime de *T. furcata* em que foi detectada uma possível nova espécie de *Haemoproteus*. Apesar de algumas aves possuírem lâminas de extensão sanguínea, observou-se uma baixa parasitemia ou as formas parasitárias encontradas não foram suficientes para determinar a respectiva espécie de hemosporídeo. Enquanto que em outras aves, apesar de serem observadas formas parasitárias, a coloração das lâminas não apresentou qualidade suficiente para caracterização morfológica detalhada e determinação ao nível de espécie.

Dentre as 35 amostras positivas para hemosporídeos detectadas a partir da nPCR, foram obtidas 24 sequências de um fragmento de 478 pb do gene *cytb*, com qualidade adequada para a determinação de linhagens e/ou espécies de *Plasmodium* spp. e/ou *Haemoproteus* spp. infectando diferentes espécies de aves hospedeiras (Tabela 3).

ORDEM (nº de aves) Espécie (nº de aves)	Nº de aves positivas em lâmina/testadas em lâmina (%) (parasitemia por indivíduo %)	Nº de aves positivas na cPCR/testadas em cPCR (%)	Nº de aves positivas na nPCR/ testadas em nPCR (%)	Nº de sequências obtidas	% de similaridade de gênero/espécie de hemoprotózoário (código de acesso ao GenBank)/linhagem - por indivíduo)	Origem/localidade das aves com sequências recuperadas ^{ab}
ACCIPITRIFORMES (41)						
<i>Gampsonyx swainsonii</i> (1)	0/1 (0)	na ^c	na	na		
<i>Harpia harpija</i> (1)	0/1 (0)	na	na	na		
<i>Heterospizias meridionalis</i> (2)	0/1 (0)	1/2 (50,0)	0/2 (0)	0		
<i>Ictinia plumbea</i> (3)	0/3 (0)	na	na	na		
<i>Pandion haliaetus</i> (1)	0/1 (0)	na	na	na		
<i>Rupornis magnirostris</i> (32)	2/31 (6,4) (0,005; 0,015)	5/14 (35,7)	3/14 (21,4)	2	100% <i>Plasmodium paranucleophilum</i> (KX159495.1)/CPCT57 ^d	VL/6; VL/6
<i>Urubitinga urubitinga</i> (1)	0/1 (0)	na	na	na		
ANSERIFORMES (6)						
<i>Anser cygnoides</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Cairina moschata</i> (3)	na	0/3 (0)	0/3 (0)	0		
<i>Chauna torquata</i> (2)	na	0/2 (0)	0/2 (0)	0		
CARIAMIFORMES (12)						
<i>Cariama cristata</i> (12)	2/5 (40,0) (0,150; 0,120)	5/11 (45,4)	5/11 (45,4)	3	100% <i>Plasmodium huffi</i> (MZ475935.1)/RTCE206; 99,58 e 99,78% <i>Plasmodium huffi</i> (MZ475935.1)/RTCE206 ^d	VL/3; VL/6; VL/6
CATHARTIFORMES (1)						
<i>Coragyps atratus</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
CICONIIFORMES (5)						
<i>Jabiru mycteria</i> (4)	0/1 (0)	2/4 (50,0)	2/4 (50,0)	0		
<i>Mycteria americana</i> (1)	1/1 (100) (0,160)	1/1 (100)	1/1 (100)	1	100% <i>Haemoproteus</i> sp. (MH177853.1)/BULIBH1 e 97,42% <i>Haemoproteus catharti</i> (MH177853.1)/TUVU29	VL/10
COLUMBIFORMES (3)						

<i>Columba livia</i> (1)	na	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Geotrygon montana</i> (1)	na	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Patagioenas picazuro</i> (1)	1/1 (100) (0,120)	1/1 (0)	1/1 (100)	1	98,54% <i>Haemoproteus columbae</i> (MN065207.1)/cliv027_c3 NL ^e	VL/14
CUCULIFORMES (1)						
<i>Piaya cayana</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
FALCONIFORMES (18)						
<i>Caracara Plancus</i> (12)	3/12 (25,0) (0,005; 0,085; 0,150)	1/3 (33,3)	0/3 (0)	0		
<i>Falco femoralis</i> (2)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Falco sparverius</i> (1)	0/1 (0)	na	na	na		
<i>Herpetotheres cachinnans</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Milvago chimachima</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Micrastur semitorquatus</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
GALIFORMES (10)						
<i>Gallus gallus</i> (7)	1/7 (14,3) (0,005)	1/4 (25,0)	1/4 (25,0)	1	100% <i>Plasmodium juxtannucleare</i> (MG598399.1)/Pj221	C/6
<i>Ortalis conicollis</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Pavo cristatus</i> (2)	1/2 (50,0)	2/2 (100)	2/2 (100)	2	100% <i>Plasmodium huffi</i> (MZ475934.1)/PACE173; 99,79% <i>Plasmodium nucleophilum</i> (KX159489.1)/RVCT27 NL ^e	C/6; C/6
GRUIFORMES (3)						
<i>Mustelirallus albicollis</i> (1)	1/1 (100) (0,02)	1/1 (100)	1/1 (100)	1	100% <i>Plasmodium elongatum</i> (MK652238.1)/MF101820	VL/6
<i>Porphyrio martinica</i> (2)	1/1 (100) (0,005)	1/2 (50,0)	1/2 (50,0)	1	99,78% <i>Plasmodium huffi</i> (MZ475935.1)/RTCE206	VL/6
NYCTIBIIFORMES (5)						
<i>Nyctibius grandis</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Nyctibius griseus</i> (4)	0/4 (0)	0/4 (0)	0/4 (0)	0		
PASSERIFORMES (1)						
<i>Passer domesticus</i> (1)	na	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
PELECANIFORMES (3)						
<i>Bulbucus ibis</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Egretta thula</i> (1)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0		
<i>Nycticorax nycticorax</i> (1)	1/1 (100) (0,120)	1/1 (100)	1/1 (100)	1	100% <i>Plasmodium</i> sp. (KJ577732.1)/CETASFLO-R0263	VL/6

<i>Asio clamator</i> (5)	4/4 (100) (0,525; 0,270; 0,180; 0,085)	2/3 (66,7)	2/3 (66,7)	2	99,16% e 98,33% <i>Haemoproteus syrnii</i> (KJ575554.1)/R65 ^d NL ^e	VL/6; C/6
<i>Athene cunicularia</i> (10)	1/9 (11,1) (0,015)	4/6 (66,7)	1/6 (16,7)	1	99,58% <i>Haemoproteus noctuae</i> (MF095647.1)/SSCsubmarHaem1 NL ^e	VL/6
<i>Glaucidium brasilianum</i> (4)	0/4 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)	0		
<i>Megascops choliba</i> (7)	4/7 (57,1) (0,010; 0,105; 0,140; 0,105)	0/4 (0)	0/4 (0)	0		
<i>Tyto furcata</i> (14)	3/13 (23,1) (0,200; 0,125; 0,360)	3/9 (33,3)	1/9 (11,1)	1	98,12% <i>Haemoproteus plataleae</i> (MF536976.2)/13-2738 NL ^e	VL/9
Total (%)	27/244 (11,07)	59/246 (23,98)	36/246 (14,63)	24		

^aOrigem: vida livre (VL), cativo (C).

^bLocalidade: 1. Barão do Melgaço, 2. Barra dos Bugres, 3. Cáceres, 4. Campo Verde, 5. Chapada dos Guimarães, 6. Cuiabá, 7. Juína, 8. Nossa Senhora do Livramento, 9. Nova Mutum, 10. Nova Olímpia, 11. Rondonópolis, 12. Santo Antônio do Leverger, 13. São José do Rio Claro, 14. Tangará da Serra, 15. Várzea Grande.

^cna: não avaliada pela ausência da amostra.

^dlinhagens idênticas encontradas em dois indivíduos da espécie de ave

^eNL: nova linhagem

5.3 Caracterização de *Haemoproteus* spp. na avifauna amostrada

Infecções por parasitos do gênero *Haemoproteus* foram detectadas em 6 aves. Seis linhagens foram recuperadas, sendo 5 destas ainda não descritas (Tabela 3). A análise das relações filogenéticas será detalhada a seguir e podem ser vistas na figura 3.

A análise das sequências indica prováveis novas linhagens de *H. syrnii* encontrada em dois espécimes de *A. clamator* (IDs S-1682 e 1350047) com as sequências apresentando 99,16% (474/478 pb) e 98,33% (471/478 pb) de similaridade com *H. syrnii* (KJ575554.1) detectado em *Megascops choliba* no Brasil. Estas sequências estão agrupadas em um clado único com 100% de suporte e se relacionam com outras de linhagens de *H. syrnii* com 98% de suporte de clado.

Provavelmente uma nova linhagem de *H. noctuae* foi identificada em *Athene cunicularia* (ID S-1386) com 99,58% (476/478 pb) de identidade com *H. noctuae* (MF095647.1) identificado em *Culicoides submaritimus* (Diptera: Ceratopogonidae) na Turquia. Esta linhagem se agrupou em um clado com *H. noctuae* com 100% de suporte.

Também foi identificada uma provável linhagem nova de *H. columbae* infectando *Patagioenas picazuro* (ID 1061328) e apresentando uma sequência com 98,54% (471/478 pb) de similaridade com *H. columbae* (MN065207.1) de *Columba livia* da África do Sul, que se agrupou ao clado formado por outras linhagens de *H. columbae* com 100% de suporte.

Além disso, uma linhagem conhecida (BULIBH1) de *Haemoproteus* infectando *M. americana* (ID S-1685) foi detectada com 100% (477/477 pb) de identidade com *Haemoproteus* sp. descrito em *Bubulcus ibis* (garça-vaqueira) no Brasil. Esta linhagem se agrupou em um clado juntamente com *H. catarthi* e um clado com *H. pulcher* com 98% de suporte, no entanto, esse clado se relaciona com um clado maior, filogeneticamente próximo as linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemocystidium* spp.

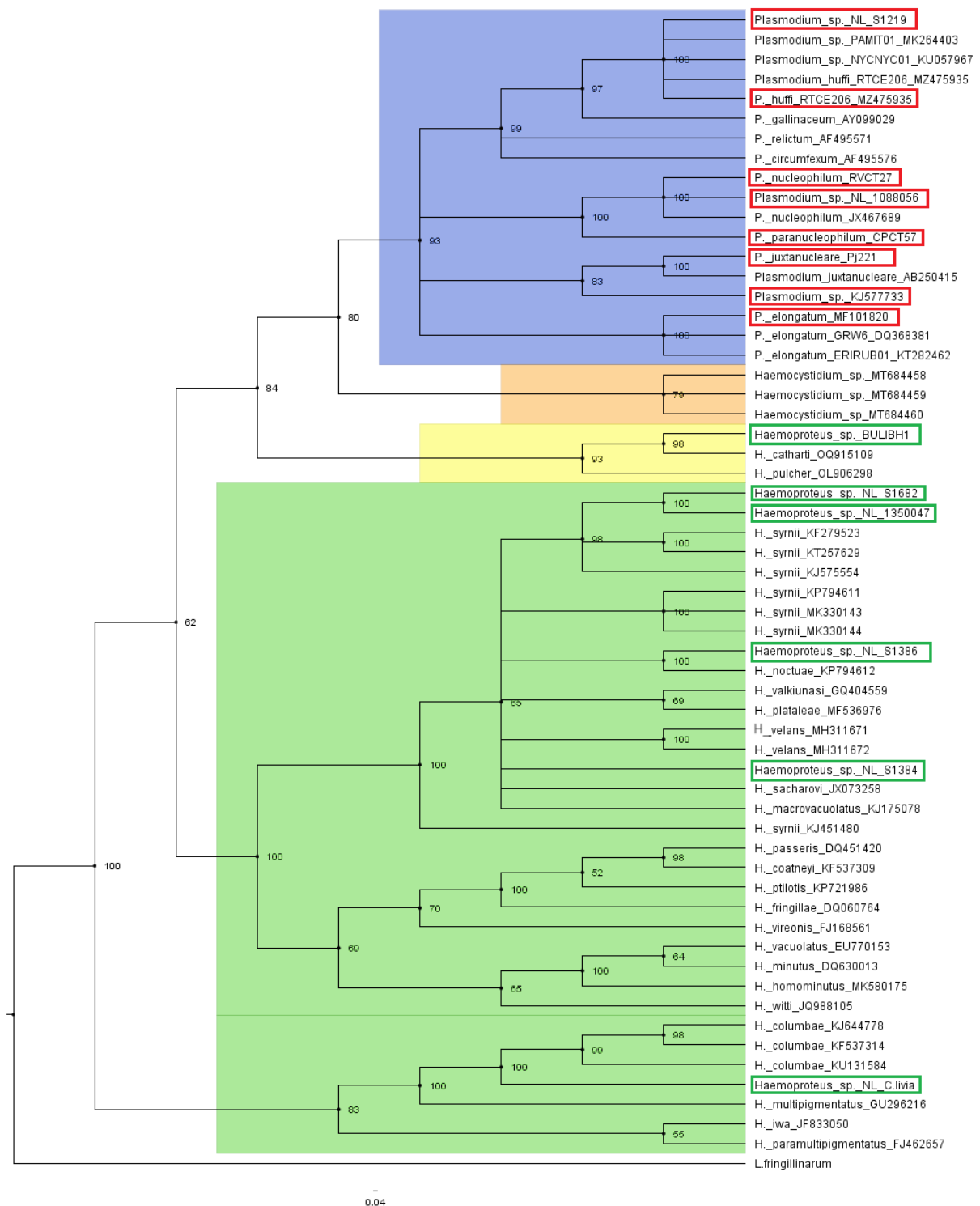


Figura 3. Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de *Haemoproteus* spp. e *Plasmodium* spp.. A filogenia bayesiana foi baseada em sequências do gene *cytb*, utilizando como grupo externo a espécie *Leucocytozoon fringillinarum*. As sequências de *Plasmodium* spp. encontradas neste trabalho estão destacadas nos retângulos de cor vermelha e as sequências de *Haemoproteus* spp. estão destacadas nos retângulos na cor verde.

Em um espécime de *T. furcata* (ID S-1384) foi detectada uma sequência com 98,12% (469/478 pb) de similaridade com *H. plataleae*, linhagem 13-2738

(MF536976.2), descrita em *Eudocimus albus* nos Estados Unidos. Esta sequência se agrupou com duas espécies, *H. sacharavi* (JX073258.1) detectado em *Zenaida macroura* nos Estados Unidos e *H. macrovacuolatus* (KJ175078.1) caracterizado em *Dendrocygna autumnalis* na Colômbia. No entanto, foi realizada uma avaliação morfológica e comparativa de *Haemoproteus* sp. de *T. furcata* (S-1384) (Tabela 4) com outras espécies de *Haemoproteus*, que revelou dissimilaridade com as características de *H. plataleae* descritas originalmente por Mello (1935) e, também, de *H. syrnii* e *H. noctue*, espécies comuns de Strigiformes (VALKIÜNAS, 2005), bem como de qualquer outra espécie deste gênero. Além disso, com base nos resultados filogenéticos, também foram comparados os dados com outros *Haemoproteus* spp. que se agruparam no mesmo clado deste parasito, como *H. macrovacuolatus*, *H. sacharovi*, *H. velans*, *H. plataleae* e *H. valkiunasi*, de modo que *Haemoproteus* sp. identificado em *T. furcata* (S-1384) apresenta características que permitem diferenciar essa espécie das outras filogeneticamente agrupadas no mesmo clado.

Morfologicamente, no *Haemoproteus* identificado em *T. furcata* (ID S-1384), os gametócitos jovens (Fig. 4a, b) frequentemente são observados em posição lateral e subpolar nas hemácias; não se aderem fortemente ao núcleo e nem à membrana da célula hospedeira; não apresentam pigmento malárico; seu núcleo é bem definido e se encontra na extremidade do parasito. Gametócitos em desenvolvimento se aderem à parte lateral do núcleo da célula hospedeira; não ocupam a área polar das hemácias. Os gametócitos observados estão sempre em uma posição lateral ao núcleo da hemácia, englobando-a parcialmente, crescem ao redor de seu núcleo e, por vezes, os preenchem até seus pólos, deslocando o núcleo lateralmente. O citoplasma é granular, há presença de alguns vacúolos que são fracamente delimitados. Os macrogametócitos (Fig. 4e-h) possuem núcleo mais compacto, bem definido e corado do que dos microgametócitos e, que encontra-se na parte central geralmente próximo à membrana celular do hospedeiro. No entanto, o núcleo de alguns gametócitos (Fig. 4f) encontram-se próximos ao núcleo da célula hospedeira. Possuem grande número de pigmentos de hemozoína, variando de 8 a 17, que, por vezes, se concentram nos pólos dos parasitos. Possuem grânulos de volutina relativamente opacos que formam grumos distribuídos por todo o citoplasma do parasito. Os microgametócitos (Fig. 4i-l) possuem de 6 a 15 grânulos de pigmento e suas características gerais são semelhantes aos dos macrogametócitos.

Tabela 4 - Dados morfométricos de *Haemoproteus* sp. infectando *Tyto furcata* do presente estudo, comparados com morfometria de *H. plataleae*, *H. syrniai* e *H. noctuae* (Valkiunas, 2005). O número (n) de formas avaliadas para cada espécie de parasito está indicado na própria tabela. Todas as medidas estão em micrômetro (μm).

Estrutura avaliada	<i>Haemoproteus</i> sp.			<i>H. plataleae</i>			<i>H. syrniai</i>			<i>H. noctuae</i>		
	n	Medidas	Média	n	Medidas	Média	n	Medidas	Média	n	Medidas	Média
Hemácias pp* macrogametócito	16			15			24			35		
Comprimento		11,5-16,4	15,3		12,8-15,8	14,8		11,9-16,0	14,0		12,7-16,6	14,4
Largura		7,2-11,0	8,5		6,6-9,1	7,8		6,4-8,8	7,3		6,3-8,8	7,0
Comprimento do núcleo		5,9-8,3	7,1		5,2-7,2	6,1		3,0-6,1	4,4		3,8-6,9	4,7
Largura do núcleo		2,1-4,6	2,6		1,7-3,0	2,6		2,0-3,4	2,2		1,6-2,4	1,9
Hemácias pp* microgametócito	12			14			17			37		
Comprimento		14,3-19,1	15,8		12,2-16,2	14,8		11,9-16,4	14,2		11,9-16,2	14,0
Largura		7,6-9,5	8,4		6,4-8,8	7,7		6,4-9,0	6,9		6,2-8,6	6,8
Comprimento do núcleo		2,4-9,0	7,0		5,4-7,0	6,0		4,0-6,4	5,0		3,9-6,5	4,8
Largura do núcleo		2,0-6,4	2,7		1,8-3,2	2,7		1,4-2,6	2,0		1,5-2,7	2,0
Macrogametócitos	16			15			24			34		
Comprimento		12,2 – 16,8	14,7		15,0-17,4	16,3		12,4-18,8	15,0		14,8-23,9	18,1
Largura		3,2 – 5,8	4,1		3,2-5,8	4,6		2,7-4,8	3,8		2,1-3,3	2,8
Comprimento do núcleo		2,3-5,7	3,7		1,8-4,3	3,2		2,1-4,1	3,3		1,9-3,8	3,0
Largura do núcleo		0,5-3,6	2,0		1,5-2,6	2,1		1,0-3,0	2,0		1,4-2,5	1,9
Nº de grânulos de pigmento		8-17	12		20-41	36,1		13-26	18,6		15-39	29,0
Microgametócitos	12			14			17			33		
Comprimento		12,0 – 16,9	14,4		14,8-17,3	16,6		12,0-16,9	13,8		12,8-22,9	18,0
Largura		3,0 – 5,4	4,0		2,8-5,3	4,7		2,7-4,6	3,7		1,8-3,0	2,2
Nº de grânulos de pigmento		6-15	10		12-28	16,9		11-22	15,1		11-30	21,0

*pp: parasitadas por.

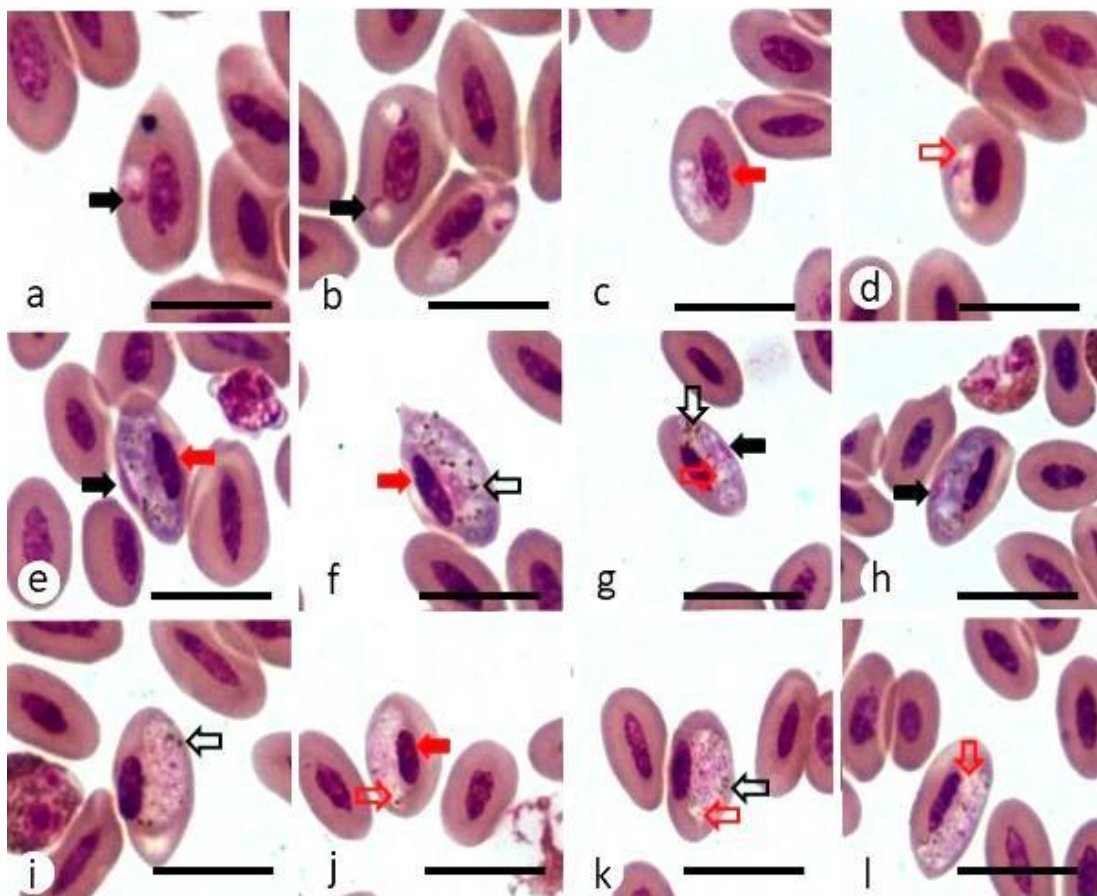


Figura 4 - Formas sanguíneas de *Haemoproteus* sp. em *Tyto furcata*. Gametócitos jovens (a - d). Macrogametócitos (e - h). Microgametócitos (i - l). As setas preenchidas pretas indicam o núcleo das formas parasitárias. As setas pretas sem preenchimento indicam os grânulos de pigmento malárico. Núcleos das hemácias estão indicados pela seta preenchida vermelha. Setas vermelhas sem preenchimento mostram os vacúolos no citoplasma dos parasitos. Barra de escala de 10µm.

5.4 Caracterização molecular e análise filogenética de *Plasmodium* spp. na avifauna amostrada

Infecções por protozoários do gênero *Plasmodium* foram detectadas em 18 aves, das quais 9 linhagens foram recuperadas, sendo uma linhagem ainda não descrita. A análise das relações filogenéticas está detalhada a seguir e também se encontram na Figura 3.

Foram recuperadas sequências com alta porcentagem (>99%) de similaridade a *P. nucleophilum* em quatro aves. Em um indivíduo de *Ara chloropterus* (ID S-1657), *Psittacara leucophthalmus* (C-30) e em um *P. cristatus* (ID 1088056) foram recuperadas sequências com 99,37% (476/479 pb), 100% (478/478 pb) e 99,79% (477/478 pb) respectivamente, de similaridade com a linhagem RVCT27 (KX159489.1) de *P.*

nucleophilum detectada em *R. vitellinus* no Brasil. A sequência citada de *P. cristatus* será depositada como uma nova linhagem. Em um espécime de *R. toco* (ID C-62) foi recuperada uma sequência com 100% de similaridade à linhagem GAL-2012 de *Plasmodium* sp. (JX021476.1) detectada em *Basileuterus flaveolus* no Brasil e 98,58% (476/478 pb) de similaridade à linhagem RTCT23 de *P. nucleophilum* (KX159488.1) detectada em *R. toco* no Brasil. Destas, foi incluído na análise filogenética a linhagem encontrada em *P. cristatus* (1088056) e em *P. leucophthalmus* (C-30), as quais se agruparam em um clado com outra linhagem de *P. nucleophilum* com 100% de suporte e que se relaciona com outro clado com 100% de suporte com a linhagem de *P. paranucleophilum* (CPCT57) que infectou dois espécimes de *R. magnirostris* (IDs S-1328 e S-1335) com 100% (478/478 pb) de identidade com *P. paranucleophilum* detectado em *Caracara plancus* no Brasil.

Sequências com similaridade de 99,5 a 100% a *P. huffi* foram detectadas em 7 aves. Em um espécime de *C. cristata* (ID S-1727) e em um *P. cristatus* (ID 1061432) foram recuperadas sequências com 100% (478/478 pb) de similaridade às linhagem RTCE206 (MZ475935.1) e PACE173 (MZ475934.1) de *P. huffi* detectadas, em *R. toco* e *Pteroglossus aracari*, respectivamente, no Brasil. Em *Rhea americana* (ID S-1219) foi recuperada uma linhagem com 99,79% (477/478 pb) de similaridade com a linhagem RTCE206, já descrita acima de *P. huffi*, e 100% (478/478 pb) de similaridade com *Plasmodium* spp. (JX029862.1), linhagem PESA01, detectada em *Phaeomyias murina* no Brasil. Em *Porphyrio martinica* (ID 1059552) e em outros dois espécimes de *C. cristata* (IDs 6159 e S-1012) foram recuperadas sequências com 99,58 (478/480 pb) a 99,78% (477/478 pb) de similaridade com *P. huffi*. Portanto, considerando a alta identidade (> 99,5%) com linhagens conhecidas de *P. huffi*, pode-se inferir que essas aves, também estavam infectadas por *P. huffi*. E finalmente, em um *R. toco* deste estudo foi recuperada uma sequência com 98,12% (469/478 pb) de similaridade com a linhagem já citada RTCE206 de *P. huffi* e 98,33% (470/478 pb) de similaridade com a linhagem PESA01 (JX029862.1) de *Plasmodium* sp. detectada em *Phaeomyias murina* no Brasil. Foi incluída na análise filogenética as linhagens encontradas em *R. americana* (ID S-1219) e *C. cristata* (ID S-1727) deste estudo, as quais ficaram agrupadas em um clado único com 100% de suporte com linhagens de *P. huffi*.

A linhagem Pj221 foi encontrada em um indivíduo de *Gallus gallus* deste estudo com 100% (479/479 pb) de identidade com *P. juxtannucleare* detectado em *Myiarchus ferox* no Brasil, a qual, na análise filogenética, se agrupou em um clado com 100% de

suporte com outro *P. juxtannucleare* e se relacionou com um clado com 83% de suporte formado pela linhagem CETASFLO-R0263 (KJ577733.1) de *Plasmodium* sp. detectado em *Nycticorax nycticorax* também deste estudo (ID 1061208) com 100% (478/478 pb) de similaridade com a linhagem de *Plasmodium* sp. detectado em *Spheniscus magellanicus* no Brasil.

E finalmente, a linhagem MF101820 foi encontrada em um *Mustelirallus albicollis* (ID S-1696) com 100% (478/478 pb) de identidade com *P. elongatum* detectado em *Acrocephalus schoenobaenus* na Turquia, a qual se agrupou em um clado único com 100% de suporte com outras linhagens de *P. elongatum*.

6. DISCUSSÃO

A maioria dos estudos sobre hemosporídeos aviários no Brasil são em Passeriformes, os quais podem ser facilmente amostrados através de métodos relativamente simples, como redes de neblina (CLARK et al., 2014; MUKHIN, 2016). Desta forma, são poucos os estudos que conseguem abranger uma grande diversidade de ordens e espécies de aves, como por exemplo, no estudo conduzido por Chagas et al. (2017), que foi um marco importante no Brasil, evidenciando a diversidade de hemosporídeos em aves não passeriformes cativas do estado de São Paulo.

Neste estudo, foi realizado o diagnóstico a partir da utilização de diferentes métodos de PCR, em conjunto com a análise de lâminas de extensão sanguíneo de 352 aves, onde 73 foram positivas para *Plasmodium* spp. ou *Haemoproteus* spp., representando 20,74%. Estudos com populações de aves de centros de reabilitação e, portanto, com um perfil de aves semelhante ao do presente estudo, tiveram diferentes prevalências: dois estudos de Portugal, o primeiro tendo avaliado 89 aves, verificou a infecção em 30,3% da população (CRUZ et al., 2024) e, o segundo, detectou uma prevalência ainda maior, de 48,6% dentre 70 aves avaliadas (GOMES et al., 2023); já um estudo com aves do Japão verificou 21,1% de positivas dentre 475 aves (INUMARU et al., 2017).

A prevalência de hemosporídeos varia consideravelmente entre os diferentes grupos de aves, sendo a infecção bastante comum em alguns, enquanto em outros, é rara. Psittaciformes está dentre as ordens que são frequentemente pouco infectadas (MASELLO et al., 2018; RICKLEFS, 1992). Este fato vai de encontro com os

resultados do presente estudo, que verificou 12,3% de positivos dentre esta ordem. A razão para esta baixa prevalência ainda é desconhecida, mas estudos sugerem uma suposta imunidade inata às infecções por estes parasitas (CELY et al., 2015; RICKLEFS, 2002). Apesar disso, alguns estudos com psitacídeos cativos do Brasil, encontraram uma prevalência significativa, a exemplo, 36% dentre 127 aves dos estados de Minas Gerais e Ceará (BELO et al., 2009), enquanto outros com prevalências bem menores como 5,9% em aves de São Paulo (CHAGAS, 2016).

Já os rapinantes são um grupo de aves que costuma ser frequentemente infectados, embora a prevalência também varie entre os diferentes grupos taxonômicos e dentre os fatores responsáveis por essa variabilidade estão locais de nidificação, densidade de hospedeiros e abundância vetorial (MARTÍNEZ-ABRAÍN, 2004; MERINO et al., 2008). No presente estudo, 29% dos rapinantes foram positivos em pelo menos uma técnica diagnóstica. Outros estudos envolvendo rapinantes encontraram 36% de positivos em 62 aves do Irã (NOURANI et al., 2022); 6,57% de 198 rapinantes da Tailândia (PORNPANON et al., 2021); 27% dentre 206 rapinantes do Rio Grande do Sul (MOREL et al., 2021) e 78,18% dentre 55 aves de Minas Gerais, Brasil (BLANCO, 2016).

O presente estudo descreve, com base em análises moleculares e filogenéticas, novos registros de hospedeiros para *P. huffi* infectando aves de vida livre, incluindo dois indivíduos de *C. cristata*, um *P. martinica* e um *R. americana*, além de um *P. cristatus* de cativeiro, ampliando a distribuição geográfica e a associação com outras ordens aviárias, como Cariamiformes, Gruiformes e Rheiformes como hospedeiros potenciais desta espécie de protozoário aviário.

Apesar da importância da relação entre os parasitas hemosporidianos e as aves, a investigação sobre parasitas aviários centrou-se principalmente nos Passeriformes, e não noutros grupos de aves. Além disso, os estudos que descrevem a infecção por *P. huffi* em aves foram limitados a duas publicações (MUNIZ et al., 1951; CEDROLA et al., 2021).

Em 1950, *P. huffi* foi inicialmente descrito em um espécime de *R. toco* capturado no estado de Goiás, Centro-Oeste do Brasil (MUNIZ et al., 1951). Até 2021, esta espécie nunca mais havia sido encontrada em *R. toco* ou em qualquer outra espécie de ave (CEDROLA et al., 2021). Por esse motivo, *P. huffi* foi considerado limitado a ranfastídeos e com distribuição geográfica específica, estritamente confinada ao Brasil (VALKIÜNAS, 2005).

Recentemente, *P. huffi* foi detectado em dois espécimes de ranfastídeos, um *R. toco* e um *Pteroglossus aracari*, coletados em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, permitindo sua redescrição, com base em achados morfológicos e moleculares (CEDROLA et al., 2021). Nesse estudo, os autores propuseram a expansão da distribuição geográfica de *P. huffi* comparando as sequências obtidas com sequências já depositadas nos bancos de dados públicos de sequências usando análise filogenética. Além disso, propuseram a associação de linhagens de *P. huffi* com sete ordens aviárias (Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Pelecaniformes, Piciformes e Passeriformes), além das ordens Cariamiformes, Gruiformes e Rheiformes descritas no presente estudo.

A linhagem NYCNYC01 (KU057967) que está agrupada com outras linhagens relacionadas a *P. huffi* no estudo de Cedrola et al. (2021), foi detectada em 16 aves no estudo realizado por Chagas et al. (2017). Nestas 16 aves, além das ordens já associadas às linhagens de *P. huffi*, também foi detectada nas ordens Accipitriformes, Psittaciformes e Struthioniformes, o que indica uma provável associação com um número ainda maior de ordens de aves.

No presente estudo, as extensões sanguíneas de *C. cristata*, *P. martinica*, *R. americana* e *P. cristatus* não estavam adequadamente coradas, portanto, não foi possível fornecer uma descrição morfológica de novos hospedeiros aviários. Sendo assim, os resultados devem ser interpretados com cautela. Conclusões concretas em muitos campos da investigação sobre hemosporídeos é um desafio quando se baseia apenas em ferramentas como a PCR, devido aos complexos ciclos de vida destes parasitos, que podem estar ligados a uma infecção abortiva (VALKIÜNAS et al., 2013).

Cariamiformes era uma ordem que até recentemente não constava nas chaves de identificação de hemosporídeos. No entanto, Vanstreels et al. (2022) descreveram pela primeira vez um novo hemosporídeo em *C. cristata* no sudeste do Brasil, baseado em exames microscópicos e ensaios moleculares, com a descrição de *H. pulcher*. Além disso, uma espécie de *Leucocytozoon* não identificado foi detectado em três indivíduos desta mesma espécie no Centro-Oeste do Brasil, conforme descrito por Carvalho et al. (2022), que foi posteriormente nomeado como *Leucocytozoon cariamae* (VIEIRA et al., 2023). Consequentemente, aqui descrevemos a primeira ocorrência molecular de uma espécie de *Plasmodium* associado à ordem Cariamiformes.

Diferentemente da pesquisa realizada por Chagas et al. (2017), onde o DNA de hemosporídeos não foi detectado em amostras de sangue de *R. americana* em cativeiro usando o mesmo protocolo molecular do presente estudo, aqui apresentamos, a primeira descrição molecular da infecção por *P. huffi* nesta espécie de ave. Segundo Valkiūnas (2005), os grupos de aves mais primitivos, que incluem a ordem Rheiformes, ou não possuem hemosporídeos ou têm presença limitada desses parasitos, sugerindo uma origem secundária para os hemosporídeos. Há uma escassez de estudos que descrevem a presença de hemosporídeos em grupos de aves primitivas (BENNETT et al., 1992; CHAGAS et al., 2017; LOTTA-ARÉVALO et al., 2023; SGARIONI et al., 2024).

Embora o gênero *Plasmodium* seja comumente encontrado infectando aves das ordens Galliformes e Gruiformes, com pelo menos 17 e oito espécies previamente descritas (VALKIÜNAS, 2005), respectivamente, o presente estudo representa a primeira descrição molecular e filogenética de *P. huffi* em *P. martinica* (ordem Gruiformes) e em *P. cristatus* (ordem Galliformes). Cedrola et al. (2021) propuseram anteriormente que *P. huffi* ocorre na ordem Galliformes, corroborando com a uma análise filogenética que demonstra que a linhagem PAMIT01, detectada em *Mitu mitu* (mutum-do-nordeste) no Brasil, está relacionada a outras linhagens conhecidas de *P. huffi*.

Segundo Vanstreels et al. (2022), uma contribuição importante gerada com a descrição de *H. pulcher* foi que, apesar da linhagem encontrada possuir características que a classificam como parte do gênero *Haemoproteus* (presença de grânulos de hemozoína e ausência de merogonia eritrocítica), análises moleculares do gene *cytb* mostraram seu posicionamento em um clado evolutivamente mais próximo dos gêneros *Plasmodium* e *Haemocystidium* - gênero de parasitos de répteis (TELFORD, 2009). Esse clado é composto por *H. pulcher* (o qual possui *C. cristata* como hospedeiro), *H. catharti* (tendo como hospedeiro *Cathartes aura* - urubu-de-cebeça-vermelha), e as linhagens PSOOCH01 (encontrada em *Psophia leucoptera* - jacamim-de-costas-brancas) e MYCAME08 (encontrada em *Mycteria americana*). Este fato, ou seja, o posicionamento de *H. pulcher* mais próximo de outro clado que não dos demais *Haemoproteus*, demonstra as lacunas taxonômicas que ainda existem na classificação dos Haemosporida, que reflete no fato de que apenas recentemente houve a inclusão da ordem Cariamiformes na chave de identificação de hemosporídeos aviários estabelecida por Valkiūnas (2005).

De forma similar, um espécime de *M. americana* também apresentou na construção filogenética deste estudo, um agrupamento desta linhagem com o clado formado por *H. pulcher*, *H. catharti* e linhagens PSOOCH01 e MYCAME08, possibilitando, corroborar com a proposta de que este clado é mais próximo de *Haemocystidium* e *Plasmodium* do que do clado formado por outros *Haemoproteus*.

Isso reforça a necessidade de busca por outros parasitos classificados como *Haemoproteus* spp. e suas linhagens, para que possibilitem um melhor entendimento da história evolutiva desses parasitos, assim como dos ancestrais em comum de *Haemocystidium*. Pretende-se proceder com o sequenciamento do gene mitocondrial total, para tentar auxiliar no entendimento da filogenia desses parasitos, juntamente com a análise morfológica e morfométrica, que poderá auxiliar na identificação dessa morfoespécie.

Um espécime de *G. gallus* do presente estudo, apresentou infecção por uma linhagem de *P. juxtannucleare*. Esta espécie de parasito é amplamente distribuída no Brasil em criações de galinhas de fundo de quintal (PARAENSE, 1949; KRETTLI, 1972; PREZOTO et al., 2001) e, apesar de acreditar-se que não ocorria naturalmente em aves silvestres, foram observadas infecções em pinguins em reabilitação na África do Sul (GRIM et al., 2003) e em um faisão (*Crossoptilon crossoptilon*) de cativeiro no Japão, resultando na morte de ambos hospedeiros (MURATA et al., 2008).

Mais recentemente, esta espécie foi detectada em Passeriformes de vida livre no Brasil (FERREIRA-JUNIOR et al., 2018). Além da presença de *P. juxtannucleare* em cinco espécies de passeriformes, este estudo também detectou a infecção em uma galinha proveniente de um quintal próximo à área onde os passeriformes infectados foram capturados, o que indicou a provável troca de hospedeiros (*spillover*). Esta situação chama a atenção para a ameaça à avifauna que os hemosporídeos podem representar (SIJBRANDRA et al., 2017), especialmente para espécies de aves que não compartilham uma história evolutiva com determinada espécie de parasito, já que provavelmente apresentaria uma resposta imunológica inadequada contra essa infecção, como ocorre com os pinguins (GRIM et al., 2003; MURATA et al., 2008), resultando na morte dos hospedeiros, o que representa uma grande ameaça especialmente para espécies de aves que já estão sob risco de extinção.

Dentre as espécies detectadas neste estudo também está o *P. elongatum*, identificado em *M. albicollis*. Este parasita conta com numerosas espécies de hospedeiros documentados entre ordens como Anseriformes, Falconiformes,

Columbiformes, Sphenisciformes, Strigiformes, mas particularmente de Passeriformes (com mais de sessenta espécies no total). O nome deste parasito faz referência à forma alongada de seus gametócitos (VALKIÜNAS, 2005).

Outro achado no presente trabalho, dentro do gênero *Plasmodium* e, que corrobora com sua conhecida elevada capacidade em alterar hospedeiros vertebrados, é a detecção de *P. nucleophilum* em *Psittacara leucophthalmus* e *P. cristatus*. Assim como a última espécie de *Plasmodium* citada, *P. nucleophilum* também possui ampla gama de hospedeiros conhecidos, mas o maior número encontra-se na ordem Passeriformes (VALKIÜNAS, 2005). O nome desta espécie faz referência a um caráter importante para sua identificação, que é apresentar merontes eritrocíticos e gametócitos muito próximos aos núcleos dos eritrócitos infectados (nucleofílicos), sendo que este contato não é interrompido com o desenvolvimento dos parasitos. Outra característica apresentada pela espécie é ter os gametócitos pequenos (menores que 10µm) e merontes menores que o núcleo do eritrócito, podendo deslocá-lo lateralmente (VALKIÜNAS, 2005).

Os rapinantes ou aves de rapina são um grupo de aves carnívoras diurnas e noturnas que possuem bicos e garras fortes, e incluem quatro ordens: Accipitriformes, Falconiformes, Cathartiformes e Strigiformes (ICMBIO, 2008). Estas ordens, com exceção dos Cathartiformes, foram bastante representativas no presente trabalho, tanto por número de aves testadas quanto pelo número de positivas para hemosporídeos.

Segundo Valkiūnas (2005) e Peirce (2005), os Strigiformes, ordem representada pelas corujas, são comumente infectados por duas espécies do gênero *Haemoproteus* (*H. noctuae* e *H. syrnii*) e cinco do gênero *Plasmodium*, sendo elas: *P. subpraecox*, *P. fallax*, *P. gundersi*, *P. hexamerium* e *P. elongatum*.

No presente estudo, 42,5% (17/40) corujas foram positivas em pelo menos uma das técnicas diagnósticas (42,5%) com pelo menos duas espécies de *Haemoproteus* (*H. syrnii* e *H. noctuae*), número inferior ao encontrado por Blanco (2016) que detectou 85,71% (18/21) das corujas infectadas por hemosporídeos em Minas Gerais, Brasil. Apesar das espécies descritas serem similares ao observado na literatura para esta ordem de hospedeiros (BISHOP; BENNETT; 1989; VALKIÜNAS, 2005), a descrição de uma nova linhagem deixa claro que, mesmo dentre as espécies em que há conhecimento em relação a especificidade parasita-hospedeiro, continuam sendo encontrados indícios da diversidade genética ainda desconhecida de muitos

hemosporídeos aviários. Além disso, Barino et al. (2021) sugerem com base no conceito filogenético de espécie, a ocorrência de espécies crípticas potenciais ao analisar as linhagens de *H. syrnii*, indicando a possibilidade deste parasito ser na verdade um complexo de espécies ou linhagens.

Haemoproteus noctuae é um achado típico em corujas (VALKIÜNAS, 2005), tendo sido relatado em Strigiformes das Américas do Norte e Central (GUTIÉRREZ, 1989), Europa (KRONE et al., 2008), Ásia (PAPERNA et al., 2008; SALAKIJ et al., 2018) e África (EARLÉ et al., 1991). Evidências têm demonstrado que esta espécie circula também no Brasil, pois Morel et al. (2021), detectaram linhagens em duas corujas (*A. clamator* e *M. choliba*) que apresentaram 99% de identidade com a linhagem CIRCUM01 de *H. noctuae*., sendo depositada como uma nova linhagem de *Haemoproteus* sp., chamada ASCLA01 (acesso ao GenBank MT919270), pois na análise filogenética, ASCLA01 ficou agrupada com a linhagem CIRCUM01).

Além disso, Sgarione et al. (2024) detectaram uma linhagem com 98,5% de similaridade com *H. noctuae* em uma ave migratória, um albatroz-de-sobrancelha (*Thalassarche melanophris*) de um centro de reabilitação de Santa Catarina, Brasil. Portanto, chama-se atenção para o papel das aves migratórias como possíveis responsáveis pela introdução de *H. noctuae* e outras espécies de hemosporídeos na avifauna do Brasil.

Ainda em relação ao Strigiformes, em um espécime de *T. furcata* (S-1384) deste estudo foi detectada uma espécie de *Haemoproteus* ainda não descrita, uma vez que ela é morfológicamente distinta de *H. syrnii* e *H. noctuae*, comuns em Strigiformes (VALKIÜNAS, 2005), bem como de *H. plataleae* como evidenciado pelos dados morfométricos (Tabela 4) e, também de qualquer outro *Haemoproteus* sp.. Uma característica morfológica notável de *H. noctuae* é de seus gametócitos maduros envolverem completamente ou quase completamente o núcleo da célula hospedeira, o que é comum de ser visto também em *H. syrnii* (VALKIÜNAS; IEZHOVA, 2022), diferentemente do observado em *Haemoproteus* sp. em *T. furcata* (S-1384). Em relação aos grânulos de pigmento, em *H. syrnii* estas estruturas são compactas, arredondadas ou circulares e tendem a se agruparem nas extremidades dos gametócitos, enquanto em *H. noctuae*, os quais estão mais dispersos no citoplasma e não são visíveis em gametócitos maduros (VALKIÜNAS; IEZHOVA, 2022). Em *T. furcata* (S-1384) os grânulos em alguns gametócitos estão mais dispersos, e, por vezes, se concentram nos pólos e, estão presentes em grande número (média de 12

em macrogametócitos e 10 em microgametócitos), mas não são superiores aos números médios observados em *H. syrniai* e *H. noctuae* (18 e 15; 29 e 21, respectivamente) (VALKIÜNAS, 2005).

Molecularmente a sequência recuperada de *T. furcata* diverge em 2,94% de *H. syrniai* (MK330143), 2,52% de *H. noctuae* (KP794612) e 1,88% de *H. plataleae* (MF536976). Além disso, diverge morfológicamente e molecularmente de *H. macruvacuolatus* (KJ175078) e *H. sacharovi* (JX073258) em 5,47% e 2,38%, respectivamente. Portanto, o conjunto de dados morfológicos e moleculares, permitem afirmar que *Haemoproteus* sp. de *T. furcata* (S-1384) difere das outras espécies deste gênero.

Dentre os hemosporídeos mais comuns da ordem Accipitriformes estão *H. elani*, *H. buteonis*, *H. janovyi*, *H. nisi*, *P. circumflexum*, *P. elongatum*, *P. fallax*, *P. lophurae*, *P. relictum* e *P. vaghani* (PEIRCE, 2005; VALKIÜNAS, 2005). No entanto, em *R. magnirostris* deste estudo foi observada a ocorrência de *P. paranucleophilum*, um parasito que tem como hospedeiro vertebrado-tipo, ou seja, hospedeiro no qual foi feita a primeira descrição da espécie, um passeriforme do gênero *Tachyfonus* (VALKIÜNAS, 2005). Porém, já há registro desta espécie infectando *R. magnirostris* (Tostes et al., 2017).

Estas duas aves ficaram internadas por um período concomitante e tiveram o sangue coletado para realização de exames hematológicos na mesma data, portanto não se sabe se os dois indivíduos chegaram ao Hospital Veterinário já infectados com *P. paranucleophilum*, ou se possivelmente, um indivíduo tenha sido fonte de transmissão para o outro durante o período de internação, pois além de estarem parasitados com a mesma espécie, trata-se da mesma linhagem do parasito. Existem mais de 35 espécies de dípteros hematófagos da família Culicidae que são conhecidos pela transmissão de hemosporídeos do gênero *Plasmodium*, dentre eles, cinco do gênero *Aedes* e quinze do gênero *Culex* (VALKIÜNAS, 2005), portanto a diversidade de vetores é grande e os mesmos ocorrem em Cuiabá (CRUZ et al., 2020), local onde as aves citadas estiveram internadas e de onde foram resgatadas antes de serem encaminhadas para atendimento veterinário.

Instituições como os CETAS e o SAS-HOVET/UFMT são responsáveis pelo tratamento e cuidados temporários de animais de vida livre feridos ou doentes com a subsequente liberação e reintrodução dos mesmos nos habitats naturais, após terem sua saúde reestabelecida, ou quando não for possível sua reintrodução na natureza,

realizar a destinação adequada à fauna (IBAMA, 2021). Porém, este ambiente pode acabar sendo estressante para os animais, incluindo as aves, pois as mesmas já estão sob estresse devido ao ferimento/doença que os fez serem encaminhados a esse local, e ainda precisam lidar com a nova situação de cativeiro temporário, na presença de humanos, outros animais, situações que não estão acostumados a conviver, dentre diversos outros fatores estressores. Todos esses fatos podem comprometer a imunidade, tornando essas aves mais propensas a infecções, incluindo por hemospórideos, sendo um agravante para os quadros clínicos e podendo contribuir com a morte de alguns indivíduos (PANAYOTOVA-PENCHEVA, 2013; BENNETT et al., 1993).

Além disso, muitos hemospórideos são capazes de ficar latentes por períodos prolongados na ave, na forma de infecção crônica, onde a parasitemia persistirá baixa (por vezes indetectável), mas que pode passar por episódios esporádicos de recaída, com a reativação da infecção em resposta a estímulos hormonais (especialmente pela liberação de corticoides), alterações de fotoperíodo ou condições de estresse ou desafios imunológicos (HELLGREN et al., 2009; CRANFIELD et al., 1994).

Como citado anteriormente, nos casos de infecção crônica, com a diminuição da parasitemia, a infecção pode atingir níveis indetectáveis, e que por isso, pode passar despercebida. Diante disso, em ambientes como os CETAS, os hemospórideos aviários também merecem atenção e devem estar incluídos na avaliação de perfil sanitário destas aves. Além da possibilidade de as aves serem fonte de infecção para as demais no ambiente de internação e agravando seu quadro geral de saúde, deve-se considerar que ao realizar a reintrodução desta ave no meio natural, ela pode representar uma ameaça às demais aves residentes do local.

7. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da frequência e diversidade de hemosporídeos em grupos de aves pouco frequentes nos estudos sobre hemosporídeos aviários do Brasil. Evidenciou a circulação de 15 linhagens diferentes de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. na avifauna do estado de Mato Grosso, sendo seis delas provavelmente novas linhagens. Possibilitou a descrição de uma possível nova espécie de *Haemoproteus* em *T. furcata*.

Além disso, embora na maioria dos casos as aves não desenvolvam sintomatologia clínica característica, a infecção ocorre principalmente em sua forma crônica ou latente, podendo representar uma ameaça à avifauna em ambiente de internação para cuidados médicos veterinários ou no momento de reintrodução ao habitat natural. Diante disso, se reforça a importância em incluir o diagnóstico para hemosporídeos aviários na avaliação de perfil sanitário de aves em ambiente hospitalar e avaliação da necessidade de tratamento e prevenção.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, C. C.; Chagas, C. R.; Fecchio, A.; Schunck, F.; Costa-Nascimento, M. J.; Monteiro, E. F.; MATHIS, B. S.; BELL, J. A.; GUIMARÃES, L. O.; KOMICHE, K. J. M.; VALKIÜNAS, G.; Kirchgatter, K. **Avian malaria and related parasites from resident and migratory birds in the Brazilian Atlantic Forest, with description of a new Haemoproteus species.** Pathogens, v. 10, n. 2, p. 103, 2021.
- ASGHAR, M., HASSELQUIST, D., HANSSON, B., ZEHTINDJIEV, P., WESTERDAHL, H., BENSCH, S.. Hidden costs of infection: chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. Science, v. 347, n. 6220, p. 436-438, 2015.
- ATKINSON, C. T. **Avian Malaria.** In: ATKINSON, C. T., THOMAS, N. J., HUNTER, D. B. Parasitic Diseases of Wild Birds. Ames: Wiley-Blackwell; 2008. p. 35-53.
- ATKINSON, C.; DUSEK, R. J.; WOODS, K. L.; IKO, W. M. **Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi.** Journal of wildlife diseases, v. 36, n. 2, p. 197-201, 2000.
- ATKINSON, C. T.; LAPOINTE, D. A. **Introduced avian diseases, climate change, and the future of Hawaiian honeycreepers.** Journal of Avian Medicine and Surgery, v. 23, n. 1, p. 53-63, 2009.
- ATKINSON, C. T.; LEASE, J. K.; DRAKE, B. M.; SHEMA, M. P. **Pathogenicity, serological responses, and diagnosis of experimental and natural malarial infections in native Hawaiian thrushes.** The Condor, v. 103, n. 2, p. 209-218, 2001.
- ATKINSON, C.T.; WOODS, K. L.; DUSEK, R.J.; SILEO, L. S.; IKO, W.M. **Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected liwi (*Vestiaria coccinea*).** Parasitology, v. 111, n. S1, p. S59-S69, 1995.
- BARINO, G. T. M., ROSSI, M. F., DE OLIVEIRA, L., REIS JUNIOR, J. L., D'AGOSTO, M., DIAS, R. J. P. **Haemoproteus syrnii** (Haemosporida: Haemoproteidae) in owls from Brazil: morphological and molecular characterization, potential cryptic species, and exo-erythrocytic stages. Parasitology Research, v. 120, p. 243-255, 2021.
- 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, n. 3, p. 220-224, 2009.
- BENNETT, G. F.; LOPES, O. de S.. **Blood parasites of some birds from São Paulo State, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 75, p. 117-134, 1980.
- BENNETT, G. F.; PEIRCE, M. A.; ASHFORD, R. W. **Avian haematozoa: mortality and pathogenicity.** Journal of Natural History, v. 27, n. 5, p. 993-1001, 1993.

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, n. 7, p. 1617-1621, 2004.

BISHOP, M. A.; BENNETT, G. F. **The haemoproteids of the avian order Strigiformes**. *Canadian Journal of Zoology*, v. 67, n. 11, p. 2676-2684, 1989.

BLANCO, L. F. V. D. O. (2016). **Hemoparasitos em aves de rapina da mesorregião do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG**, 2016.

BRAGA, E. M.; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; VALKIÜNAS, G. **Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 106, p. 3-11, 2011.

BUENO, M. G.; LOPEZ, R. P. G.; DE MENEZES, R. M. T.; NASCIMENTO, M. J. C.; 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, n. 1-2, p. 123-127, 2010.

CARLSON, C. J.; DALLAS, T. A.; ALEXANDER, L. W.; PHELAN, A. L.; PHILLIPS, A. J.. **What would it take to describe the global diversity of parasites?** *Proceedings of the Royal Society B*, v. 287, n. 1939, p. 20201841, 2020.

CARVALHO, A. M.; FERREIRA, F. C.; ARAÚJO, A. C.; HIRANO, L. Q. L.; PALUDO, G. R.; BRAGA, E. M. **Molecular detection of *Leucocytozoon* in red-legged seriemas (*Cariama cristata*), a non-migratory bird species in the Brazilian Cerrado**. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 31, p. 100652, 2022.

CEDROLA, F.; MARTINELE, I.; SENRA, M. V. X.; FURTADO, E. J. D. O.; D'AGOSTO, M.; DIAS, R. J. P. **Rediscovery of *Plasmodium (Huffia) huffi* (Apicomplexa, Haemosporida): a lost lineage from toucans**. *Parasitology Research*, v. 120, n. 9, p. 3287-3296, 2021.

CELY, G. E. E.; ROMERO, F. C.; URIZA, C. A. M. **Identificación y tratamiento de hemoparásitos en loros en cautiverio en el hogar de paso para fauna silvestre de la universidad de la amazonia**. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias-FAGROPEC*, v. 7, n. 1, p. 32-35, 2015.

CHAGAS, C. R. F. ***Plasmodium* spp. em aves silvestres da Fundação Parque Zoológico de São Paulo: identificação de espécies por microscopia e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHAGAS, C. R. F.; VALKIÜNAS, G.; DE OLIVEIRA GUIMARÃES, L.; MONTEIRO, E. F.; GUIDA, F. J. V.; SIMÕES, R. F.; RODRIGUES, P. T.; LUNA ALBUQUERQUE, E. J.; KIRCHGATTER, K. **Diversity and distribution of avian malaria and related**

haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. **Malaria journal**, v. 16, p. 1-20, 2017.

CLARK P.; BOARDMAN W.; RAIDAL S. **Atlas of clinical avian hematology**. Ames: Wiley-Blackwell Publishing. 2009.

CLARK, N. J.; CLEGG, S. M.; LIMA, M. R. **A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data**. International journal for parasitology, v. 44, n. 5, p. 329-338, 2014.

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

COOK, C. A.; SMIT, N. J.; DAVIES, A. J.; **A redescription of *Haemogregarina fitzsimonsi*, Dias, 1953 and some comments on *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) from Southern African tortoises (Cryptodira: Testudinidae), with new host data and distribution records**. Folia Parasitologica, v. 56, n. 3, p. 173-179, 2009

CRANFIELD, M. R.; GRACZIK, T. K.; BEALL, F. B.; IALEGGIO, D. M.; SHAW, M. L.; SKJOLDAGER, M. L. **Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence**. Journal of Wildlife Diseases, v. 30, n. 3, p. 372-376, 1994.

CRUZ, J. T.; CARVALHO, L. M.; FERREIRA, M. R.; NUNES, C.; CASERO, M.; MARZAL, A. **Avian Haemosporidian Infection in Wildlife Rehabilitation Centres of Portugal: Causes, Consequences, and Genetic Diversity**. Animals, v. 14, n. 8, p. 1216, 2024.

CRUZ, L. C. D. T. A. D.; GUIMARÃES, A. G. F.; SOUZA, E. M. D.; FERREIRA, R. D. S.; GOMES, R. D. S. R.; SLHESSARENKO, R. D.; ATANAKA, M. **Influence of climatic variables on the *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations in Mato Grosso, Brazil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 53, p. e20190185, 2020.

DARLINGTON JUNIOR, P. J. **Zoogeography: the geographical distribution of animals**. In: Zoogeography: the geographical distribution of animals. 1957. p. 675-675.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D.. **jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing**. Nature methods, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DE AGUILAR, J. R.; CASTILLO, F.; MORENO, A.; PEÑAFIEL, N.; BROWNE, L.; WALTER, S. T.; KARUBIAN, J.; BONACCORSO, E. **Patterns of avian**

haemosporidian infections vary with time, but not habitat, in a fragmented Neotropical landscape. PLoS ONE, v. 13, n. 10, p. e0206493, 2018.

DE OLIVEIRA, R. G. **As aves-símbolos dos estados Brasileiros.** Editora AGE Ltda, 2003.

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, C. A.; MILENSKY, C. M.; SCHMIDT, B. K.; GEBHARD, C.; FLEISCHER, R. C. **Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones.** Ornithological Monographs, p. 98-111, 2006.

FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E.; SWANSON, E. B. **Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic.** Journal of Parasitology, v. 89, p. 1044–1047, 2003.

FECCHIO, A.; Bell, J. A.; Bosholn, M.; Vaughan, J. A.; Tkach, V. V.; Lutz, H. L.; ... & Clark, N. J.. **An inverse latitudinal gradient in infection probability and phylogenetic diversity for Leucocytozoon blood parasites in New World birds.** Journal of Animal Ecology, v. 89, n. 2, p. 423-435, 2020.

FECCHIO, A.; CHAGAS, C. R.; BELL, J. A.; KIRCHGATTER, K. **Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites.** Acta Tropica, v. 204, p. 105364, 2020.

FECCHIO, A.; CLARK, N. J., BELL, J. A., SKEEN, H. R., LUTZ, H. L., DE LA TORRE, G. M., ... & WELLS, K.. **Global drivers of avian haemosporidian infections vary across zoogeographical regions.** Global Ecology and Biogeography, v. 30, n. 12, p. 2393-2406, 2021.

FECCHIO, A.; SILVEIRA, P.; WECKSTEIN, J. D.; DISPOTO, J. H.; ANCIÃES, M.; BOSHOLN, M.; TKASH, V. V.; BELL, J. A. **First record of Leucocytozoon (Haemosporida: Leucocytozoidae) in Amazonia: evidence for rarity in Neotropical lowlands or lack of sampling for this parasite genus?.** The Journal of parasitology, v. 104, n. 2, p. 168-172, 2018.

FELIPPE, P. A. N.; ADANIA, C. H. **Conservação e bem-estar animal.** In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Org.). Tratado de Animais Selvagens. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 1 v, cap. 1.

FERREIRA-JUNIOR, F. C.; DUTRA, D. A.; SILVEIRA, P.; PACHECO, R. C.; WITTER, R.; RAMOS, D. G. S.; PACHECO, M. A.; ESCALANTE, A. A.; BRAGA, É. M. **A new pathogen spillover from domestic to wild animals: *Plasmodium juxtannucleare* infects free-living passerines in Brazil.** Parasitology, v. 145, n. 14, p. 1949-1958, 2018.

FONSECA, A.; AMORIM, L.; RIBEIRO, J.; FERREIRA, R.; MONTEIRO, A.; SANTOS, B.; ANDRADE, S.; SOUZA J.R.C.; VERÍSSIMO, A. 2021. **Boletim do desmatamento da Amazônia Legal SAD**, p. 1, 2021.

GABALDON, A.; ULLOA, G.; ZERPA, N. ***Fallisia (Plasmodioides) neotropicalis* subgen. nov. sp. nov. from Venezuela**. Parasitology, v. 90, n. 2, p. 217-225, 1985.

GARCÍA-DEL-RÍO, M.; SANCHO, R.; MARTINEZ, J.; MERINO, S. **Blood parasite infections in Strigiformes and Psittaciformes species in captivity with a new record of potential fatal blood parasite transmission to Parrots**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 51, n. 4, p. 799-813, 2021.

GOMES, J.; LEITÃO, M.; LOURO, M. C.; BRANDÃO, R.; MATEUS, T. L. **Avian Malaria in wild birds from a wildlife rehabilitation center in Central Portugal**. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, v. 43, p. 100904, 2023.

GRIM, K. C.; VAN DER MERWE, E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; MCCUTHAN, T. F.; CRANFIELD, M. ***Plasmodium juxtanucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 34, n. 3, p. 250-255, 2003.

GUSSET, M.; DICK, G. **'Building a Future for Wildlife'? Evaluating the contribution of the world zoo and aquarium community to in situ conservation**. International Zoo Yearbook, v. 44, n. 1, p. 183-191, 2010.

GUTIÉRREZ, R. J. **Hematozoa from the spotted owl**. Journal of Wildlife Diseases, v. 25, n. 4, p. 614-618, 1989.

HEIMERDINGER, M. A.; LEBERMAN, R. C. 1966. **The comparative efficiency of 30 and 36 mm. mesh in mist nets**. Journal of Field Ornithology, v. 37, n. 4, p. 280-285, 1966.

HELLGREN, O.; PÉREZTRIS, J.; BENSCH, S. **A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites**. Ecology, v. 90, p. 2840-2849, 2009.

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

HIMMEL, T., HARL, J., KÜBBER-HEISS, A., KONICEK, C., FERNÁNDEZ, N., JUAN-SALLÉS, C., ILGÜNAS, M., VALKIÜNAS, G., WEISSENBOCK, H. **Molecular probes for the identification of avian *Haemoproteus* and *Leucocytozoon* parasites in tissue sections by chromogenic in situ hybridization**. Parasites & vectors, v. 12, p. 1-10, 2019.

EARLÉ, R. A.; BENNETT, G. F., DU TOIT, H., DE SWARDT, D. H., & HERHOLDT, J. J.. **Regional and seasonal distribution of avian blood parasites from northern South Africa**. South African Journal of Wildlife Research-24-month delayed open access, v. 21, n. 2, p. 47-53, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Centros de Triagem de Animais Silvestres (Cetas)**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/aceso-a-informacao/institucional/o-que-sao-os-cetas>>. Acesso em: 18/05/2024.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**: Volume III – Aves / 1. ed. Brasília: ICMBio/MMA, 2018.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Plano de ação nacional para a conservação de aves de rapina**. 2008. Disponível em: <<https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/pan/pan-aves-de-rapina/1-ciclo/pan-aves-de-rapina-livro-v3.pdf>>. Acesso em: 18/05/2024.

INUMARU, M.; MURATA, K.; SATO, Y. **Prevalence of avian haemosporidia among injured wild birds in Tokyo and environs, Japan**. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 6, n. 3, p. 299-309, 2017.

JALOVECKA, M.; HAJDUSEK, O.; SOJKA, D.; KOPACEK, P.; MALANDRIN, L. **The complexity of piroplasms life cycles**. Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 8, p. 248, 2018.

KRETTLI, A. U. **Plasmodium juxtanucleare in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 14, n. 4, p. 235-451, 1972.

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**. Journal of Parasitology, v. 94, n. 3, p. 709-715, 2008.

LANDAU, I.; CHAVATTE, J. M.; PETERS, W.; CHABAUD, A. **The sub-genera of avian Plasmodium**. Parasite, v. 17, n. 1, p. 3-7, 2010.

LUNA, L. G. **Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. American Histolabs, 1992.

MACARTHUR, R.; MACARTHUR, A. J. **On the use of mist nets for population studies of birds**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 71, n. 8, p. 3230-3233, 1974.

MASELLO, J. F. et al. **Can the intake of antiparasitic secondary metabolites explain the low prevalence of hemoparasites among wild Psittaciformes?**. Parasites & vectors, v. 11, p. 1-15, 2018.

MANWELL, R. D.; SESSLER, G. J. **Plasmodium paranucleophilum n. sp. from a South American tanager**. The Journal of Protozoology, v. 18, n. 4, p. 629-632, 1971.

- MARTÍNEZ-ABRAÍN, A.; ESPARZA, B.; ORO, D.. **Lack of blood parasites in bird species: does absence of blood parasite vectors explain it all.** *Ardeola*, v. 51, n. 1, p. 225-232, 2004.
- MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; RYLES, A. B.; BREON, K.. **A brief history of biodiversity conservation in Brazil.** *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 601-611, 2005.
- MELLO, I. F.. **New haemoproteids of some Indian birds.** In: *Proceedings/Indian Academy of Sciences*. New Delhi: Springer India, 1935, p. 469-475.
- MERINO, S.; MORENO, J.; VÁSQUEZ, R. A.; MARTÍNEZ, J.; SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ, I.; ESTADES, C. F.; IPPI, S.; SABAT, P.; ROZZI, R.; MICGEHEE, S. **Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness.** *Austral Ecology*, v. 33, n. 3, p. 329-340, 2008.
- MODRÝ, D.; BECK, R.; HRAZDILOVÁ, K.; BANETH, G.. **A review of methods for detection of *Hepatozoon* infection in carnivores and arthropod vectors.** *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 17, n. 1, p. 66-72, 2017.
- MOREL, A. P.; WEBSTER A.; PRUSH F.; ANICET M.; MARSICANO G.; TRAININI G.; STOKER J.; GIANI J.; BANDARRA P. M.; ROCHA M. I. S.; ZITELLI L. C.; UMEMO K. A.; SOUZA U. A.; DALL'AGNOL B.; RECK J. **Molecular detection and phylogenetic relationship of Haemosporida parasites in free-ranging wild raptors from Brazil.** *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 23, p. 100521, 2021
- MORENO, G.; HIGA, T. C. S.; MAITELLI, G. T.; OLIVEIRA, A. U.; VILARINHO NETO, C. S.; LEITE, C. M. C.; MAITELLI, G. T.; ROSS, J.; SCHWENK, L. M.; ARAÚJO NETO, M. D.; CASTRO JÚNIOR, P. R.; VASCONCELOS, T. N. N. **Geografia de Mato Grosso.** Cuiabá: Entrelinhas Editora, 2005. 252-268.
- MUKHIN, A.; PALINAUSKAS, V.; PLATONOVA, E.; KOBYLKOV, D.; VAKOLIUK, I.; VALKIÜNAS, G. **The strategy to survive primary malaria infection: an experimental study on behavioral changes in parasitized birds.** *PLoS One*, v. 11, n. 7, p. e0159216, 2016.
- MUNIZ, J.; SCARES, R.; BATISTA, S. **On a New Species of *Plasmodium* parasite of the *Ramphastos toco* Müller 1776.** *Revista Brasileira Malanologia*, Vol. 3, No. 2, 345-62, 1951.
- MURATA, K.; NII, R.; SASAKI, M.; ISHIKAWA, S.; SATO, Y.; SAWABE, K.; TSUDA, Y.; MATSUMOTO, R.; SUDA, A.; UEDA, M. ***Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* infection in a captive white eared-pheasant (*Crossoptilon crossoptilon*) at a Japanese zoo.** *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 70, n. 2, p. 203-205, 2008.
- NOURANI, L.; ALIABADIAN, M.; MIRSHAMSI, O.; DJADID, N. D. **Prevalence of co-infection and genetic diversity of avian haemosporidian parasites in two**

rehabilitation facilities in Iran: implications for the conservation of captive raptors. BMC Ecology and Evolution, v. 22, n. 1, p. 114, 2022.

PACHECO, J. F.; SILVEIRA, L. F.; ALEIXO, A.; AGNE, C. E.; BENCKE, G. A.; BRAVO, G. A.; BRITO, G. R. R.; COHN-HAFT, M.; MAURÍCIO, G. N.; NAKA, L. N.; OLMOS, F.; POSSO, S.; LEES, A. C.; FIGUEIREDO, L. F. A.; CARRANO, E.; GUEDES, R. C.; CESARI, E.; FRANZ, I.; SCHUNCK, F., PIACENTINI, V. Q. **Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee – second edition.** Ornithology Research, v. 29, n. 2, p. 94-105, 2021.

PACHECO, M. A.; ESCALANTE, A. A. **Origin and diversity of malaria parasites and other Haemosporida.** Trends in Parasitology, 2023.

PAGLIA, A. P.; DA FONSECA, A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIR, R. A.; PATTON, J. L. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil.** 2. ed. Belo Horizonte: Conservação Internacional do Brasil, 76 p., 2012.

PALINAUSKAS, V.; ZIEGYTE, R.; ILGÜNAS, M.; IEZHOVA, T. A.; BERNOTIENE, R.; BOLSHAKOV, C.; VALKIÜNAS, G. **Description of the first cryptic avian malaria parasite, *Plasmodium homocircumflexum* n. sp., with experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes.** International Journal for Parasitology, v. 45, n. 1, p. 51-62, 2015.

PANAYOTOVA-PENCHEVA, M. S. **Parasites in captive animals: a review of studies in some European zoos.** Der Zoologische Garten, v. 82, n. 1-2, p. 60-71, 2013.

PAPERNA, I.; KEONG, M. S. C.; MAY, C. Y. A. **Haemosporozoan parasites found in birds in Peninsular Malaysia, Singapore, Sarawak and Java.** Raffles Bulletin of Zoology, v. 56, n. 2, p. 211-243, 2008.

PARAENSE, W. L. **Um inquerito sobre a ocorrência do "*Plasmodium juxtannucleare*" em Bambuí (Estado de Minas Gerais).** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 47, p. 361-365, 1949.

PEIRCE, M. A. **A checklist of the valid avian species of Babesia (Apicomplexa: Piroplasmorida), Haemoproteus, Leucocytozoon (Apicomplexa: Haemosporida), and Hepatozoon (Apicomplexa: Haemogregarinidae).** Journal of Natural History, v. 39, n. 42, p. 3621-3632, 2005.

PÉREZ-TRIS, J.; HASSELQUIST, D.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENE, A.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. **What are malaria parasites?** Trends in Parasitology, v. 21, n. 5, p. 209-211, 2005.

PERKINS, S. L. **Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*.** Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 267, n. 1459, p. 2345-2350, 2000.

PINHEIRO B, V. E.; THAITHONGC, S.; BROWNA, K. N. **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** Mol Biochem Parasitol, v. 61, p. 315-320, 1993.

PORNPANOM, P.; KASORNDORKBUA, C.; LERTWATCHARASARAKUL, P.; SALAKIJ, C. **Prevalence and genetic diversity of *Haemoproteus* and *Plasmodium* in raptors from Thailand: Data from rehabilitation center.** International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 16, p. 75-82, 2021.

POULIN, R., DE ANGELI D., D. **Animal migrations and parasitism: reciprocal effects within a unified framework.** Biological Reviews, 96(4), 1331-1348, 2021.

POULIN, R. **The rise of ecological parasitology: twelve landmark advances that changed its history.** International Journal for Parasitology, v. 51, n. 13-14, p. 1073-1084, 2021.

PREZOTO, H. H. S.; MAIA, M. C.; SIQUEIRA, I. C. V.; D'AGOSTO M. **Aspectos do parasitismo de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L., 1758 em criação rústica no município de Santa Bárbara do Tugúrio-MG.** Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 9, n. 2, 2002.

RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. **A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria.** Journal of Parasitology, v. 88, n. 4, 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, n. 10, p. 4722-4725, 1992.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. **Diversification and host switching in avian malaria parasites.** Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 269, n. 1494, p. 885-892, 2002.

RODRIGUES, E.; PRIMACK, R. B. **Biologia da conservação.** Londrina: E. Rodrigues, v. 10, 2001.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** Bioinformatics, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROSENFELD, G. **Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido.** Mem. Inst. Butantan, v. 20, p. 329-335, 1974.

ROSS, R. I. M. S. **Report on the Cultivation of Proteosoma, Labbé, in Grey Mosquitos.** The Indian Medical Gazette, v. 33, n. 11, p. 401-408, 1898.

ROOS, F. L.; BELO, N. O.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E. M.. **Prevalence and diversity of avian malaria parasites in migratory Black Skimmers (*Rynchops niger*,**

Laridae, Charadriiformes) from the Brazilian Amazon Basin. Parasitology Research, v. 114, p. 3903-3911, 2015.

SALAKIJ, C.; Pornpanom, P.; Lertwatcharasarakul, P.; Kasorndorkbua, C.; Salakij, J. **Haemoproteus in barn and collared scops owls from Thailand.** Journal of Veterinary Science, v. 19, n. 2, p. 280, 2018.

SÁ, M. R. **Os estudos em malária aviária e o Brasil no contexto científico internacional (1907-1945).** História, Ciências, Saúde-Manguinhos, v. 18, p. 499-518, 2011.

SAMBROOK, J. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** New York: CHSL Press. 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R.. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proceedings of the national academy of sciences, 74(12), 5463-5467, 1977.

SANGUINETTI C. J, NETO E. D, SIMPSON A. J. G.. **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** Biotechniques 17: 915-919, 1994.

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H. M. **Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy.** Biological Reviews, v. 87, n. 4, p. 928-964, 2012.

SGARIONI, A. Z.; SERAFINI, P.; PEREIRA, A.; EMMERICH, T.; PONTES, T. P.; MACHADO, D. C.; RIBEIRO, P. R.; AMORIM, D. B.; KLAFKE, G.; RECK, J.. **Molecular Survey of Haemosporidian Parasites in Procellariiformes Sampled in Southern Brazil, 2013–2022.** Journal of Wildlife Diseases, 2024.

SIJBRANDRA, D. C; GARTRELL, B. D.; GRANGE, Z. L.; HOWE, L. **Use of a real-time PCR to explore the intensity of *Plasmodium* spp. infections in native, endemic and introduced New Zealand birds.** Parasitology, v. 144, n. 13, p. 1743-1751, 2017.

SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; LACORTE, G. A.; KOLESNIKOVAS, C. K.; VANSTREELS, R. E.; STEINDEL, M.; CATÃO-DIAS, J. L.; VALKIÜNAS, G.; BRAGA, E. M. **Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South American penguins.** Parasitology international, v. 62, n. 2, p. 165-171, 2013.

SMITH, K. F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A. B. **The role of infectious diseases in biological conservation.** Animal conservation, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2009.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S.. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TELFORD, J. R.. **Hemoparasites of the Reptilia**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2009.

TOSTES, R.; DIAS, R. J. P.; MARTINELE, I.; SENRA, M. V. X.; D'AGOSTO, M.; MASSARD, C. L. **Multidisciplinary re-description of *Plasmodium (Novyella) paranucleophilum* in Brazilian wild birds of the Atlantic Forest kept in captivity**. Parasitology Research, v. 116, p. 1887-1897, 2017.

VALKIÜNAS, G. **Avian malaria parasites and other Haemosporidia**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 947p.

VALKIÜNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. Malaria Journal, v. 16, p. 1-24, 2017.

VALKIÜNAS, G.; IEZHOVA, T. A. **Insights into the biology of *Leucocytozoon* species (Haemosporida, Leucocytozoidae): why is there slow research progress on agents of leucocytozoonosis?**. Microorganisms, v. 11, n. 5, p. 1251, 2023.

VALKIÜNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Keys to the avian Haemoproteus parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). Malaria Journal, v. 21, n. 1, p. 269, 2022.

VALKIÜNAS, G.; IEZHOVA, T. A. **Keys to the avian malaria parasites**. Malaria Journal, v. 17, n. 1, p. 1-24, 2018.

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

VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L.; LAIRD M. **The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian USA land birds**. Ecological Monographs, v. 56, n. 4, p. 327-344, 1986.

VANSTREELS, R. E. T.; ANJOS, C. C.; LEANDRO, H. J.; CARVALHO, A. M.; SANTOS, A. P.; EJERT, L.; HURTADO, R.; CARVALHO, E. C. Q.; BRAGA, E. M.; KIRCHGATTER, K. **A new haemosporidian parasite from the Red-legged *Seriema Cariama cristata* (Cariamiformes, Cariamidae)**. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v. 18, p. 12-19, 2022.

VANSTREELS, R. E. T.; KOLESNIKOVAS, C. K.; SANDRI, S.; SILVEIRA, P., BELO, N. O.; FERREIRA JUNIOR, F. C.; EPIPHANIO S.; STEINDEL, M.; BRAGA, E. M.; CATAO-DIAS, J. L. **Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in magellanic penguins undergoing rehabilitation in southern Brazil**. Plos one, v. 9, n. 4, p. e94994, 2014.

VANSTREELS, R. E. T.; PEARSONS, N. J. **Malária Aviária e outros Hemosporídeos Aviários**. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Org.). Tratado de Animais Selvagens. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. 2 v, cap. 73.

VIEIRA, L. M. C.; PEREIRA, P. H. O.; VILELA, D. A. R.; LANDAU, I.; PACHECO, M. A.; ESCALANTE, A. A.; FERREIRA, F. C.; BRAGA, E. M. ***Leucocytozoon cariamae* n. sp. and *Haemoproteus pulcher* coinfection in *Cariama cristata* (Aves: Cariamiformes): first mitochondrial genome analysis and morphological description of a leucocytozoid in Brazil.** Parasitology, p. 1-11, 2023.

WHELAN, C. J.; ŞEKERCIOĞLU, Ç. H.; WENNY, D. G. **Why birds matter: from economic ornithology to ecosystem services.** Journal of Ornithology, v. 156, p. 227-238, 2015.

WikiAves (2024) **WikiAves**, a Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: <<http://www.wikiaves.com.br/>>. Acesso em: 05/05/2024.

WILLIAMS, R. B. **Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*.** Avian Pathology, v. 34, n. 1, p. 29-47, 2005.

ZINKL, J. G. **Avian hematology.** In: Williams & Wilkins (eds.), Veterinary Hematology. University of California, 1986. 256-273p.