



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS ANIMAIS

STEPHANIE CAROLLINY NUNES FERREIRA

**Ocorrência de hemosporídeos em populações urbanas de aves do
gênero *Turdus* no Distrito Federal**

DISSERTAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Brasília
2024

STEPHANIE CAROLLINY NUNES FERREIRA

Ocorrência de hemosporídeos em populações urbanas de aves do gênero *Turdus* no Distrito Federal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Animais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Animais.

Orientadora: Prof. Dra. Giane Regina Paludo

Aprovada por:

Giane Regina Paludo, Doutora (UNB)
(Orientadora)

Nádia Regina Pereira Almosny, Doutora (UFF)
(Examinadora externa)

Márcio Botelho de Castro, Doutor (UNB)

Brasília
2024

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERREIRA, S. C. N. **Ocorrência de hemosporídeos em populações urbanas de aves do gênero *Turdus* do Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024, 56 p. Dissertação.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

FERREIRA, S. C. N. **Ocorrência de hemosporídeos em populações urbanas de aves do gênero *Turdus* no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2024, 56 p. Dissertação de Mestrado, (Mestrado em ciências animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2024.

1. Protozoários 2. Hemoparasitas 3. Diagnóstico 4. PCR

Ocorrência de hemosporídeos em populações urbanas de aves do gênero *Turdus* no Distrito Federal

Stephanie Carrolliny Nunes Ferreira¹, Giane Regina Paludo²

¹Médica Veterinária/Mestranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

²Médica Veterinária/Doutora – UnB – Brasília/DF

Resumo

Os hemosporídeos, protozoários transmitidos por vetores, representam uma ameaça significativa para a saúde das aves. Os principais gêneros envolvidos são *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. O ciclo de vida desses parasitas envolve um hospedeiro vertebrado (ave) e um vetor (inseto hematófago). As análises moleculares têm sido cruciais para identificar novas espécies e elucidar as relações evolutivas entre os diferentes gêneros. Nesse cenário os objetivos desse trabalho foram investigar a ocorrência e diversidade dos hemosporídeos (gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) em aves do gênero *Turdus* em diferentes regiões urbanas do Distrito Federal. Para este trabalho, foram capturadas em redes de neblina 65 aves do gênero *Turdus spp.* As capturas ocorreram em 20 regiões do Distrito Federal entre abril e setembro de 2022. As aves foram submetidas à coleta de sangue para a confecção de esfregaços sanguíneos e extração de DNA para PCR. As amostras de DNA foram submetidas a PCR convencional para sexagem e a outras duas PCR para detecção de hemosporídeos. A microscopia óptica foi utilizada para a análise dos esfregaços sanguíneos. A espécie *Turdus leucomelas* foi a mais capturada, e a maioria das capturas ocorreu em áreas periurbanas. Os resultados da PCR *multiplex* revelaram uma maior detecção de hemosporídeos em relação à microscopia, reiterando a maior sensibilidade da técnica molecular. Este estudo demonstrou a superioridade da PCR *multiplex* para a detecção de hemosporídeos em aves passeriformes do Cerrado, revelando uma sensibilidade significativamente maior em relação a métodos tradicionais. Esses resultados destacam a importância da aplicação de técnicas moleculares em estudos de parasitologia aviária.

Palavras-chave: Protozoários. Hemoparasitas. Diagnóstico. PCR.

Abstract

Hemosporidians, vector-transmitted protozoa, represent a significant threat to avian health. The main genera involved are *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon*. The life cycle of these parasites involves a vertebrate host (bird) and a vector (blood-feeding insect). Molecular analyses have been crucial for identifying new species and elucidating the evolutionary relationships between different genera. In this context, the objectives of this study were to investigate the prevalence and diversity of hemosporidians (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon* genera) in birds of the genus *Turdus* across different urban regions of the Federal District, Brazil. For this study, 65 birds of the genus *Turdus* spp. were captured using mist nets. The captures took place in 20 regions of the Federal District between April and September 2022. Blood samples were collected for the preparation of blood smears and DNA extraction for PCR. The DNA samples were subjected to conventional PCR for sex determination and two additional PCRs for the detection of hemosporidians. Optical microscopy was used to analyze the blood smears. The species *Turdus leucomelas* was the most frequently captured, with most captures occurring in periurban areas. The results of the multiplex PCR revealed a higher detection rate of hemosporidians compared to microscopy, reiterating the greater sensitivity of the molecular technique. This study demonstrated the superiority of multiplex PCR for the detection of hemosporidians in passerine birds from the Cerrado, showing significantly higher sensitivity compared to traditional methods. These results highlight the importance of applying molecular techniques in avian parasitology studies.

Keywords: Protozoa, Hemoparasites, Diagnosis, PCR.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Árvore filogenética bayesiana de hemosporídeos baseada em genomas mitocondriais completos.	14
Figura 2 – Ciclo biológico do <i>Haemoproteus</i> , <i>Plasmodium</i> e <i>Leucocytozoon</i>	19
Figura 3 – Gametócitos de <i>Haemoproteus majoris</i> (linhagem hPHYBOR04) do sangue de um <i>Turdus pilaris</i>	21
Figura 4- A Principal metodologia para identificar o status de infecção pelos gêneros <i>Plasmodium</i> e <i>Haemoproteus</i> é caracterizar as linhagens de parasitas sanguíneos é a PCR e sequenciamento de DNA do gene <i>cytB</i> de amostras de sangue de ave.	24
Figura5 – Mapa com representação das coletas e amostras positivas por região administrativa do DF.	38
Figura 6 –Macrogametócitos de hemosporídeo em <i>Turdus leucomelas</i>	40

Lista de tabelas

Tabela 1 – Oligonucleotídeos, genes alvos e tamanhos dos produtos de PCR utilizados para detecção de hemospóridios.....	36
Tabela 2 – Locais de capturas e quantidade de aves capturadas por espécie.	39
Tabela 3 – Sexagem das aves capturadas do gênero <i>Turdus</i> separadas por espécie.....	40
Tabela 4 -Total de avs positivas submetidas aos dois tipos de PCRs.....	41
Tabela 5- Número de positivos e negativos para hemospóridios por região do DF	42
Tabela 6- Quantidade de aves positivas submetidas a PCR <i>multiplex</i> para hemospóridios	44
Tabela 7-Total de aves positivas por espécie e sexo.....	45

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	7
1.0 INTRODUÇÃO.....	8
2.0 OBJETIVOS GERAIS	10
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3.0 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 AGENTES ETIOLÓGICOS	11
3.2 TAXONOMIA	11
3.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PREVALÊNCIA	15
3.4 RELAÇÃO PARASITA HOSPEDEIRO.....	18
3.5 CICLO BIOLÓGICO	19
3.5.1 <i>Plasmodium</i> spp.	20
3.5.2 <i>Haemoproteus</i> spp.....	20
3.5.1 <i>Leucocytozoon</i> spp.....	22
3.6 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E SINAIS CLÍNICOS NAS AVES	22
3.7 DIAGNÓSTICO	22
4.0 REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2	29
1.0 INTRODUÇÃO.....	32
2.0 MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 ASPECTOS ÉTICOS	33
2.2 COLETAS DAS AMOSTRAS	33
2.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	33
2.3.1. Avaliação dos esfregaços sanguíneos	33
2.3.2 Ensaio molecular	34
2.3.3 Análise estatística	37
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.0 CONCLUSÕES.....	46
5.0 REFERÊNCIAS.....	48

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

1.0 INTRODUÇÃO

As atividades humanas têm desencadeado alterações profundas e abrangentes em todos os ecossistemas do planeta, impulsionadas por uma série de perturbações antropogênicas, tanto diretas quanto indiretas. A intensidade dessas mudanças é tão significativa que os cientistas cunharam um novo termo para caracterizar essa era marcada pela dominância humana: o Antropoceno (MacGregor-Fors; Carbó-Ramírez; Bonilla-Moheno, 2020). As mudanças ambientais podem afetar a dinâmica das interações parasita e hospedeiro, especialmente nas regiões árticas, onde o clima está mudando a uma taxa alarmante. Com o aquecimento global, espera-se que parasitas e seus vetores se espalhem para regiões polares, tornando-se fundamental monitorar as mudanças nos ecossistemas (Yusupova et al., 2023). A prevalência e a dinâmica de transmissão de hemossporídeos em aves são cruciais para entender a persistência dessas infecções em populações e a dispersão de parasitas entre regiões (Anjos et al., 2021).

As interações hospedeiro e parasita representam uma força seletiva que pode reduzir a vida útil dos hospedeiros, seu sucesso reprodutivo e sua sobrevivência. As condições ambientais podem afetar as comunidades hospedeiro e parasita, levando a padrões distintos de interações com consequências ecológicas e evolutivas divergentes para sua persistência (Lopes et al., 2020). Nas últimas décadas, estudos paralelos foram realizados em todo o mundo, proporcionando grandes oportunidades para explorar a adaptação dos hemossporídios a diferentes hospedeiros e as variações temporal e do espaço, além de investigar ainda mais a história co-evolutiva entre parasitas e seus hospedeiros (Huang, 2021). De acordo com Schumm et al. (2021), aves migratórias têm uma prevalência e diversidade mais altas de hemossporídios do que espécies residentes ou migratórias de curta distância.

A virulência de *Plasmodium* em aves, embora variável entre espécies, representa uma ameaça significativa para a saúde das populações avícolas. Compreender os mecanismos que determinam a gravidade das infecções por malária aviária é fundamental para a conservação de aves silvestres e a saúde de aves em cativeiro (Ilgunas et al., 2019). A relação entre parasitismo e características fenotípicas é complexa. Em *Turdus albicollis*, Torre et al. (2020) encontraram uma associação negativa entre a carga parasitária e a massa corporal, mas uma associação positiva entre a presença de hemossporídeos e o brilho da garganta, sugerindo que a coloração da plumagem pode estar relacionada à tolerância à infecção.

As doenças infecciosas podem desempenhar um papel importante no declínio de diversas espécies. Os hemossporídeos, protozoários transmitidos por vetores, são responsáveis em constituir grave risco para diferentes espécies de aves, como exemplo devido à

malária aviária (Schumm et al., 2021). Parasitas hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são amplamente distribuídos e podem afetar negativamente a aptidão de seus hospedeiros aviários (Hernández-Ospina et al., 2024). Seu ciclo de vida completo depende de dois hospedeiros: um vertebrado e um inseto hematófago (vetor) (Valavičiūtė - Pocienė et al., 2024).

Nos últimos anos, a infecção por protozoários hemosporídeos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, tem sido considerada um dos fatores mais importantes relacionados com a extinção ou declínio da população de várias espécies de aves em todo o mundo. No Brasil, apesar da grande biodiversidade aviária, poucos estudos foram desenvolvidos para detectar a infecção, especialmente entre as aves silvestres mantidas em cativeiro (Tostes et al., 2015).

A diversidade de hemosporídeos e sua distribuição entre diferentes espécies de aves são influenciadas por diversos fatores. Strehmann et al. (2023) demonstraram que a ocorrência e a diversidade de linhagens de hemosporídeos variam significativamente entre famílias de aves, destacando a importância de desvendar os caminhos de infecção em diferentes ecossistemas, ao mesmo tempo que consideram os vetores e fatores ambientais.

2.0 OBJETIVOS GERAIS

Determinar a ocorrência da infecção por hemosporídeos em *Turdus* spp. No Distrito Federal.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a ocorrência da infecção por hemosporídeos por meio da microscopia e da reação em cadeia da polimerase (PCR) em *Turdus* spp.
- Comparar a utilização de duas técnicas de PCR distintas para detecção de hemosporídeos.
- Identificar as regiões do DF com maior número de aves infectadas por hemosporídeos.
- Determinar os gêneros de hemosporídeos com ocorrência em *Turdus* spp.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agentes Etiológicos

Hemosporídios de aves são amplamente distribuídos e diversos, sendo classificados nos gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*, sendo a última de menor ocorrência. Essas espécies são conhecidas por causar infecções que podem impactar a saúde de seus hospedeiros (Ghaemitalab et al., 2021).

A diversidade de hemosporídeos em aves ainda é pouco conhecida, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Valkiūnas et al. (2019) descreveram três novas espécies de *Haemoproteus* em aves, utilizando uma combinação de análises morfológicas e moleculares. Os autores demonstraram a importância de marcadores como o citocromo b (cytb) e o gene do apicoplasto (clpc) para a caracterização e identificação de espécies de *Haemoproteus*, especialmente em aves que invernam em regiões tropicais e subtropicais.

3.2 Taxonomia

A classificação tradicional dos hemosporídeos, baseada na morfologia e ciclo de vida, tem sido revisada com a aplicação de ferramentas moleculares (Perkins, 2014). Nas últimas duas décadas, as análises moleculares de variação do DNA mitocondrial tornaram-se fundamentais nos estudos sobre hemosporídios em aves. Até recentemente, esses métodos eram principalmente utilizados para identificar os parasitas e construir árvores filogenéticas iniciais, permitindo que pesquisadores comparassem dados de diferentes partes do mundo. No entanto, com o avanço do sequenciamento genômico, estudos mais aprofundados sobre a genética e a biologia molecular desses parasitas estão sendo realizados (Bensch; Hellgren, 2020). As análises moleculares têm sido cruciais para elucidar as relações evolutivas entre os gêneros *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Plasmodium*, superando as limitações da morfologia. A filogenia molecular, em particular, tem sido fundamental para resolver questões taxonômicas complexas e para compreender a evolução desses parasitas (Mandal, 2021). Apesar da grande diversidade genética de *Leucocytozoon*, a taxonomia desse gênero permanece desafiadora. Embora mais de 1400 linhagens genéticas tenham sido detectadas, apenas cerca de 45 espécies foram descritas morfológicamente. A falta de dados moleculares associados a muitas dessas espécies dificulta a compreensão da filogenia e evolução do grupo, limitando o progresso em estudos sobre seu ciclo de vida e a patogenicidade (Valkiūnas; Iezhova, 2023).

A diversidade e a distribuição de hemosporídeos em aves da família *Turdidae* são complexas e pouco conhecidas. Harl et al. (2020) realizaram uma análise abrangente de linhagens de hemosporídeos em *Turdus*, utilizando dados de sequências de DNA e redes de haplótipos. O estudo identificou uma grande diversidade de linhagens, muitas delas específicas para determinados grupos de *Turdus*, revelando a necessidade de revisões taxonômicas para esses parasitas.

Valkiūnas e Atkinson (2020) reuniram as classificações taxonômicas dos hemosporídeos aviários da forma a seguir:

- Superfilo Alveolata (Cavalier-Smith, 1991)
- Filo Apicomplexa (Levine, 1970)
- Subfilo Sporozoa (Leuckart, 1879)
- Classe Coccideo (Leuckart, 1879)
- Ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885)
- Família Haemoproteidae (Doflein, 1916)
 - **Gênero *Haemoproteus*** (Kruse, 1890)
 - Subgênero *Parahaemoproteus* (Bennett, Garnham, and Fallis, 1965)
 - Subgênero *Haemoproteus* (Kruse, 1890)
- Família Plasmodiidae (Mesnil, 1903)
 - **Gênero *Plasmodium*** (Marchiafava and Celli, 1885)
 - Subgênero *Haemamoeba* (Grassi and Feletti, 1890)
 - Subgênero *Giovannolaia* (Corradetti, Garnham, and Laird, 1963)
 - Subgênero *Novyella* (Corradetti, Garnham, and Laird, 1963)
 - Subgênero *Bennettinia* (Valkiūnas, 1987)
 - Subgênero *Huffia* (Corradetti, Garnham, and Laird, 1963)
- Família Garniidae (Lainson, Landau, and Shaw, 1971)
 - **Gênero *Fallisia*** (Lainson, Landau, and Shaw, 1974)
 - Subgênero *Plasmodioides* (Gabaldon, Ulloa, and Zerpa, 1985)

- Família Leucocytozoidae (Fallis and Bennett, 1961)

- **Gênero *Leucocytozoon*** (Berestneff, 1904)

- Subgênero *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)

- Subgênero *Akiba* (Bennett, Garnham, and Fallis, 1965)

-

Na figura 1, Pacheco et al. (2018) demonstraram uma árvore filogenética bayesiana de hemosporídeos baseada em genomas mitocondriais completos (114 sequências e 5.125 pb, excluindo lacunas). Os valores são probabilidades posteriores juntamente com valores de *bootstrap* (em negrito), como uma porcentagem obtida para 1.000 pseudoreplicatas de uma árvore de máxima verossimilhança com topologia idêntica. As cores dos ramos indicam a relação espécie hospedeira-vetor do gênero. As pequenas inconsistências entre as árvores bayesiana e ML são indicadas com pontos laranja. Os nomes das espécies são indicados em negrito. O caractere @ representa *Phlebotominae* e “Hipp.” Corresponde ao vetor *Hippoboscidae*.

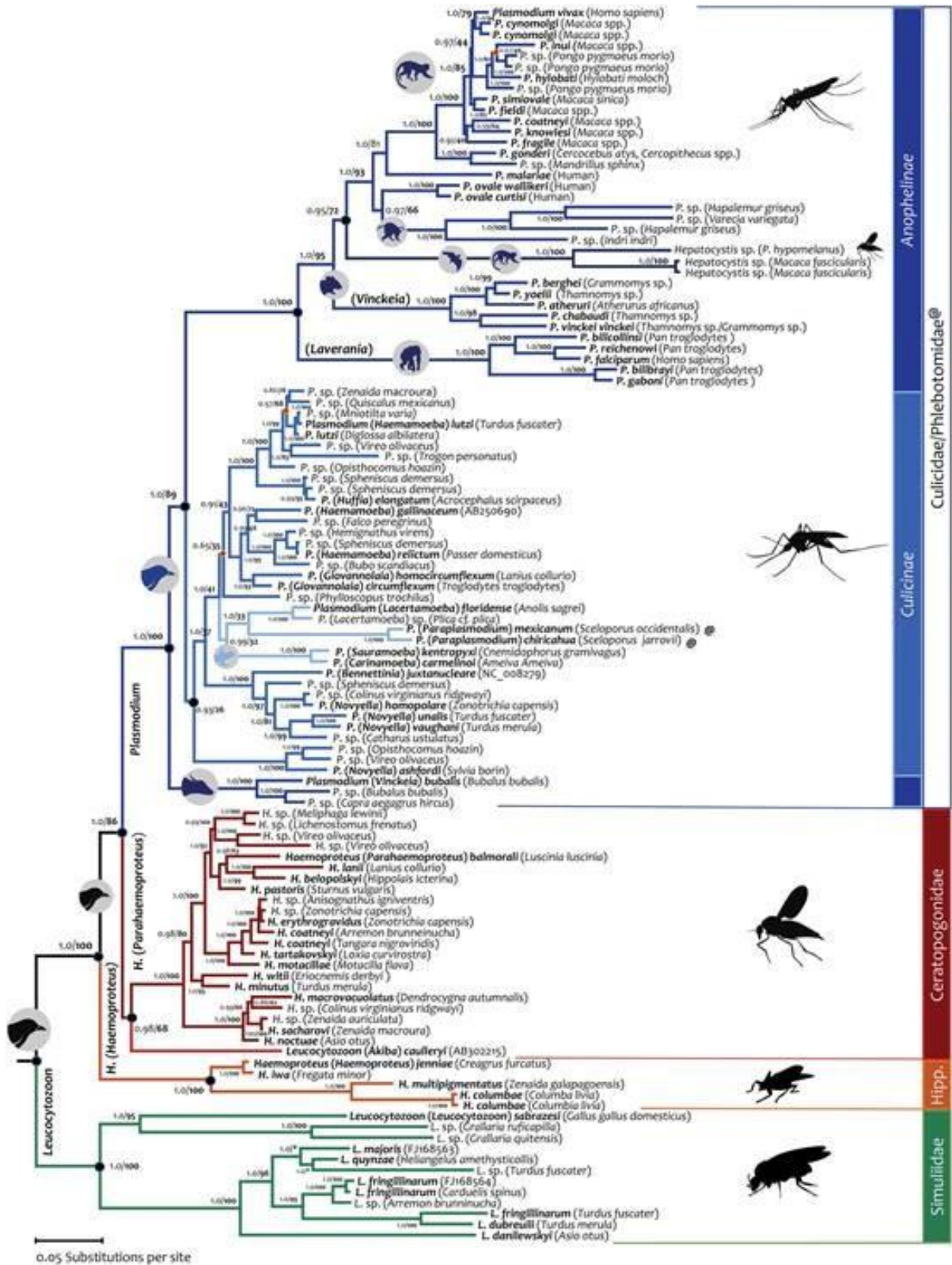


Figura 1 – Árvore filogenética bayesiana de hemosporídeos baseada em genomas mitocondriais completos. As cores dos ramos indicam a relação espécie hospedeira-vetor gênero. (Pacheco et al., 2018)

3.3 Distribuição geográfica e prevalência

A transmissão de patógenos por vetores em animais silvestres é um grave problema de saúde pública, mas o papel das cidades nesse processo ainda não está claro. A crescente urbanização mundial tem causado sérios danos ao meio ambiente. A expansão das cidades gera um impacto direto na biodiversidade, com muitas espécies enfrentando dificuldades para se adaptar às condições urbanas (Figuerola et al., 2024). As mudanças por ações antrópicas podem ter efeitos dramáticos sobre as populações selvagens. Além disso, ao promover o surgimento de doenças transmitidas por vetores em diversos ecossistemas, essas mudanças podem levar à extinção local de espécies nativas (Filion et al., 2022).

Ao afetar as condições corporais e imunológicas dos hospedeiros, a urbanização altera a dinâmica epidemiológica e a diversidade de doenças. Cidades podem atuar como áreas de diluição ou amplificação de patógenos, dependendo se as características urbanas têm efeitos positivos ou negativos sobre vetores e hospedeiros (Caizergues et al., 2024). Distinguir entre áreas de distribuição e transmissão de parasitas é fundamental para monitorar e avaliar os riscos para as aves nativas, pois as áreas onde os parasitas estão presentes podem se tornar áreas de transmissão sob as condições adequadas (Musa et al., 2024).

Ao analisar a relação entre manejo florestal, parasitismo e aves, Hoesel et al. (2020) demonstraram que os efeitos do habitat e do parasitismo variam entre diferentes espécies. A estrutura da floresta emergiu como um fator importante na determinação da probabilidade de infecção por hemosporídeos, sugerindo que as interações hospedeiro-parasita são complexas e dependentes do contexto ecológico.

Três grupos de haplotipos de *Haemoproteus*, encontrados na Ilha Gorgona (Itália), apresentam maior similaridade genética com a espécie *Haemoproteus* encontrada no Pacífico tropical oriental do que os documentados na África, Ásia, Europa e Oceania. Dois dos grupos de haplotipos da ilha são generalistas quanto à infecção de múltiplos hospedeiros e sua ampla distribuição geográfica dentro da região do Pacífico tropical oriental, enquanto um terceiro grupo de haplotipos de *Haemoproteus* parece ser endêmico à Ilha Gorgona, de acordo com os resultados encontrados (Sedano-Cruz; Castillo; Gil-Vargas, 2020). Musa et al. (2024) identificaram áreas de transmissão propostas para nove linhagens de hemosporídios, mostrando três tipos diferentes de área de transmissão, seja com transmissão limitada na Europa ou na África, ou transmissão ativa em ambas as regiões. Utilizando análises morfológicas e moleculares, Hernández-Ospina et al. (2024) identificaram 9,3% de ocorrência de hemosporídeos em 255 aves de diferentes espécies na Colômbia, destacando a importância da combinação de técnicas para o estudo desses parasitas.

Um estudo conduzido por Figuerola et al. (2024) investigou como as cidades têm afetado a prevalência e a diversidade de três tipos de protozoários (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) encontrados na espécie *Turdus merula*. Para isso, foram

comparadas aves de áreas urbanas e florestais, em diferentes regiões da Europa. Foram observados menor prevalência de *Leucocytozoon* em aves urbanas, enquanto a prevalência de *Plasmodium* e *Haemoproteus* não apresentou diferenças significativas. Outro achado importante foi relacionado a diversidade de linhagens de *Plasmodium*, ocorrendo em maior quantidade nas cidades, enquanto a presença de *Leucocytozoon* era menor. Foram encontradas, também, linhagens de *Plasmodium* exclusivas de áreas urbanas e linhagens de *Leucocytozoon* restritas a áreas florestais, sugerindo que esses parasitas podem apresentar adaptações específicas aos diferentes habitats. Os resultados indicaram que as cidades alteram as condições para a transmissão de diferentes patógenos, criando novos cenários de interação entre hospedeiros, vetores e parasitas.

Apesar da rica diversidade de habitats e espécies animais no Irã, poucos estudos se dedicaram a investigar hemosporídios nessa região. Ghaemitalab et al. (2021) conduziram um estudo, realizado no sul e sudeste do Irã durante as temporadas de reprodução das aves em 2017 e 2018, buscando preencher essa lacuna. As infecções parasitárias foram identificadas utilizando um protocolo de *nested* PCR, direcionado a um fragmento de 479 pares de bases do gene mitocondrial do citocromo b (cytb) de *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon*. A prevalência geral de infecções por hemosporídeos foi de 51,1%, e foram identificadas 55 linhagens genéticas diferentes, das quais 15 do gene cytb eram novas para a ciência. As linhagens de *Haemoproteus* predominaram (63,6% de todas as linhagens detectadas), seguidas por *Leucocytozoon* e *Plasmodium*. Foram identificados dezenove novos registros de aves hospedeiras para essas linhagens genéticas, sendo a maioria encontrada em espécies de aves residentes, indicando transmissão local. Foram observadas treze infecções múltiplas (9,8% dos indivíduos infectados) por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* em sete espécies hospedeiras, demonstrando a presença de transmissão local ativa de parasitas para espécies de aves residentes no sudeste do Irã, e contribuindo para o conhecimento sobre a diversidade genética de hemosporídios nessa região pouco estudada do mundo.

Na Nova Zelândia, a malária aviária, tem apresentado aumento significativo, ameaçando espécies de aves nativas que estão entre as mais propensas à extinção no mundo. É fundamental compreender melhor os possíveis efeitos em cadeia que as modificações antropogênicas têm sobre essas espécies mais frágeis (Filion et al., 2022). As mudanças climáticas podem alterar a distribuição e a diversidade desses parasitas, com potencial impacto na saúde das aves. Se faz necessário, então, monitorar essas interações para entender as consequências das mudanças globais nos ecossistemas (Yusupova et al., 2023).

Leite, Pinheiro e Braga (2013) investigaram a prevalência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves de áreas urbanas e naturais no Tocantins, Brasil. Embora a prevalência geral tenha sido elevada, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois tipos de ambiente. No entanto, a prevalência variou em função da estação do ano, sendo maior no período chuvoso. Os resultados sugeriram que a dinâmica das infecções por hemosporídeos pode ser mais complexa e influenciada por fatores locais, como a

composição da comunidade de aves e a disponibilidade de vetores.

Fecchio et al. (2021) investigaram como a diversidade funcional e filogenética dos hospedeiros, em conjunto com fatores ambientais como cobertura florestal e temperatura, influenciam a prevalência e diversidade de hemosporídeos em aves da Mata Atlântica. Foi observado que a prevalência de malária aviária é maior em áreas desmatadas e está negativamente relacionada à diversidade funcional dos hospedeiros. Os resultados sugerem que a perda de habitat e a consequente alteração da composição e estrutura das comunidades de aves podem facilitar a transmissão de hemosporídeos.

3.4 Relação parasita-hospedeiro

Os hemosporídeos podem infectar uma variedade de espécies de aves, afetando sua aptidão física e sobrevivência. A prevalência desses parasitas varia amplamente entre as espécies hospedeiras, influenciada por fatores biológicos, ecológicos e evolutivos (Ribeiro et al., 2020). As interações entre hospedeiros e parasitas afetam tanto os processos biológicos individuais quanto a evolução das espécies: infecções parasitárias podem mudar o curso de vida de espécies hospedeiras (Yusupova et al., 2023). Parasitas generalistas que ocorrem em abundância em determinados locais, distribuições amplas e possuem a capacidade de infectar uma grande diversidade filogenética de hospedeiros, são frequentemente considerados letais para as populações hospedeiras, embora existam poucos estudos sobre o potencial dos parasitas especialistas em causar mortalidade do hospedeiro (Galen et al., 2022).

Aves em cativeiro em ambientes zoológicos frequentemente abrigam parasitas, mas há pouca informação disponível sobre o potencial da avifauna livre para atuar como uma fonte de infecção (Carrera-Játiva et al., 2020). O uso de uma metodologia sensível e precisa de detecção de parasitas é crucial em estudos que exploram a prevalência de parasitas em populações ou comunidades hospedeiras. A incerteza na identificação de gêneros ou linhagens de parasitas pode limitar a compreensão das interações hospedeiro-parasita (Rodrigues et al., 2020). Em um estudo abrangente com aves do Cerrado, Ribeiro et al. (2020) demonstraram que a prevalência de parasitas sanguíneos estava positivamente correlacionada com a biomassa e a condição corporal dos hospedeiros. Sugerindo, então, que aves maiores e em melhor condição física podem ser mais suscetíveis à infecção.

Aves passeriformes, como *Turdus merula* e *Turdus philomelos*, são frequentemente infectadas por hemosporídios. Embora essas infecções sejam comumente consideradas inofensivas, sabe-se que podem causar doenças graves e até a morte dessas aves. Isso ocorre porque os parasitas podem se multiplicar e causar danos a diversos órgãos do corpo, através do desenvolvimento exo-eritrocitário (Himmel et al., 2020). A malária aviária e os hemosporídios relacionados são responsáveis pela perda de aptidão e mortalidade em espécies de aves suscetíveis. Esse grupo de parasitas, distribuídos globalmente, há muito tempo é utilizado como um sistema clássico para investigar associações hospedeiro-parasita.

Essa associação pode ser avaliada pela prevalência na população hospedeira e pela intensidade da infecção em um indivíduo hospedeiro, o que, respectivamente, refletem a capacidade do parasita de infectar e se reproduzir dentro do hospedeiro (Huang, 2021). Populações de aves insulares e seus parasitas sanguíneos estritos são de grande interesse para compreender o acúmulo de biodiversidade e a relação evolutiva com seus congêneres continentais (Sedano-Cruz; Castillo; Gil-Vargas, 2020).

Ao analisar a avifauna da Serra do Mar, (Anjos et al., 2021) identificaram uma nova espécie de *Haemoproteus*, ampliando o conhecimento sobre a diversidade de parasitas hemosporídeos na região. E, apesar de aves migratórias terem apresentado maior prevalência de infecções por *Leucocytozoon*, a ausência de estágios infectantes desse parasita em aves residentes indica que a transmissão local é restrita. Sugerindo, então, que as aves migratórias atuam como vetores para a introdução desses parasitas na região.

Em um estudo, conduzido por Yusupova et al. (2023), foram investigados a presença de hemosporídios em aves passeriformes no sudoeste de Yamal, na Sibéria, o qual encontraram alta prevalência de infecção, principalmente por *Leucocytozoon*, e identificaram diversos genótipos de parasitas, sendo cinco deles inéditos. Concluíram, também, que a prevalência e os tipos de parasitas variavam entre diferentes espécies de aves, locais de coleta e sexos. Além disso, aves maiores tendiam a apresentar mais infecções.

A relação entre personalidade e parasitismo é um tema de grande interesse em ecologia comportamental. Jing et al. (2023) investigaram essa relação em uma população de *Turdus rubrocanus*, no Planalto Tibetano, uma região com condições ambientais desafiadoras. Os autores não encontraram evidências de que a infecção por *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* influenciasse a atividade ou a ousadia dos indivíduos, sugerindo que a relação entre esses fatores pode ser mais complexa do que se pensava anteriormente.

3.5 Ciclo Biológico

Os ciclos de vida dos hemosporídeos (Haemosporida) são obrigatoriamente heteroxenos (Figura 3), com partes que ocorrem dentro de vetores dípteros hematófagos e partes que ocorrem dentro de vertebrados. Todos os grupos de vertebrados (com uma probabilidade rara em peixes e anfíbios) podem ser infectados por hemosporídeos após a exposição às picadas de vetores infecciosos. Após a infecção, os parasitas podem completar seu ciclo de vida ou abortar seu desenvolvimento, dependendo de quão bem adaptados estão a seus hospedeiros. Os hemosporídeos alternam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, diferindo em modo de multiplicação e até mesmo padrões de metabolismo em diferentes estágios de seu ciclo de vida. Os estágios seguintes de desenvolvimento e sua sequência de ocorrência são encontrados em todos os grupos de hemosporídeos aviários (Valkiūnas; Atkinson, 2020).

Durante suas migrações, as aves encontram uma variedade maior de hemosporídeos do que as aves residentes, transportando-os por longas distâncias. Embora alguns parasitas sejam

amplamente distribuídos, a transmissão não é garantida e depende da presença de insetos vetores e da compatibilidade do parasita com as aves nativas da região (Musa et al., 2024). Estudos de longo prazo em populações naturais são essenciais para entender a dinâmica de infecções por hemosporídeos, pois a prevalência e a composição dessas infecções podem variar consideravelmente ao longo do tempo e entre diferentes populações de aves (Grieves et al., 2023).

Devido ao conhecimento limitado dos ciclos biológicos dos hemosporídeos do gênero *Haemoproteus*, esses patógenos têm sido considerados relativamente benignos, sendo negligenciados na medicina veterinária e no manejo de aves. No entanto, estudos moleculares recentes forneceram evidências de que parasitas *Haemoproteus* podem causar doenças graves se infectarem hospedeiros aviários não adaptados, devido a danos marcados de órgãos por estágios exo-eritrocitários (megalomeroes). Além disso, altas infecções por *Haemoproteus* são letais para insetos hematófagos (Valkiūnas et al., 2019).

A falta de informações sobre o desenvolvimento exo-eritrocitário na maioria das espécies descritas de *Plasmodium* impede a compreensão dos mecanismos de virulência durante a malária aviária (Pendl et al., 2022). Parasitas hemosporídeos causam doenças em aves através da merogonia exo-eritrocitária e anemia. Notadamente, o desenvolvimento de megalomeroes por espécies de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* tem sido associado a mortalidades em aves (Himmel et al., 2019).

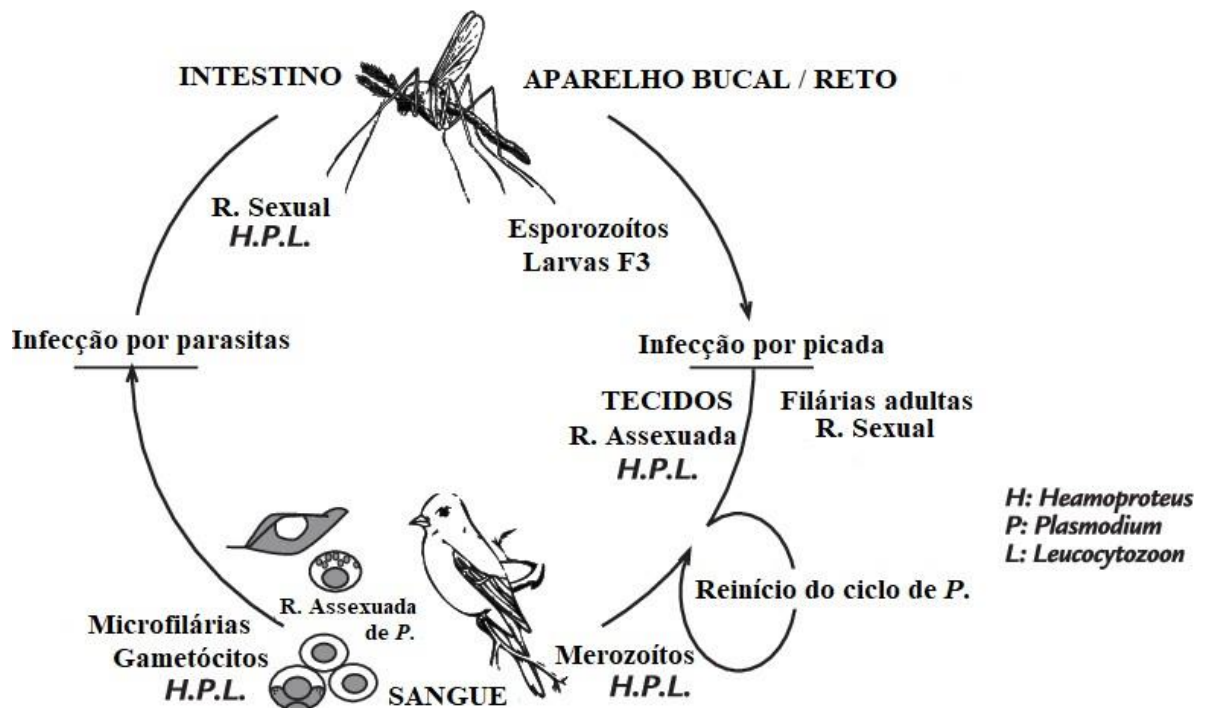


Figura 2– Ciclo biológico do *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*. (Adaptado segundo – (Matta, N.E., & Rodríguez, O.A., 2001).

3.5.1 *Plasmodium* spp.

O gênero *Plasmodium* tem seu ciclo de vida em sua maior parte intracelular, contudo é um dos ciclos mais complexos dos hemosporídeos. Para completar seu ciclo de vida e permitir tanto a amplificação quanto a transmissão, o parasita deve sair da célula hospedeira de maneira altamente regulada. Os eventos de egresso durante o ciclo de vida do *Plasmodium* são: egresso de merozoíto e gametócito das hemácias, egresso de esporozoíto do oocisto e egresso de merozoíto do hepatócito. As semelhanças, bem como as diferenças, entre os vários caminhos de egresso do parasita destacam tanto a biologia celular inovadora quanto os potenciais alvos terapêuticos para interromper seu ciclo de vida (Dvorin; Goldberg, 2022).

A vigilância de *Plasmodium* spp. Em mosquitos e aves locais fornece informações sobre o ciclo de transmissão dos parasitas locais e pode alertar sobre riscos de infecção para espécies de interesse, o que é essencial para o controle e prevenção de doenças de forma eficiente (González-Olvera et al., 2022).

3.5.2 *Haemoproteus* spp.

Os parasitas do gênero *Haemoproteus*, pertencentes à ordem Haemosporida, possuem um ciclo de vida complexo e compartilham muitas características com outros parasitas, como o *Plasmodium*. Esses parasitas são transmitidos por insetos hematófagos, principalmente mosquitos do gênero *Culicoides*. Após a picada, os esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado e iniciam seu desenvolvimento em diversos tecidos. Em seguida, infectam células sanguíneas, onde se diferenciam em gametócitos. A reprodução sexuada ocorre no inseto vetor, dando origem a novos esporozoítos que serão transmitidos a outros hospedeiros. Uma característica marcante dos *Haemoproteus* é a ausência de multiplicação assexuada nas células sanguíneas, diferenciando-os do *Plasmodium*. Apesar dessas diferenças, as filogenias moleculares indicam que ambos os gêneros são evolutivamente próximos e compartilham um ancestral comum (Valkiūnas; Iezhova, 2022).

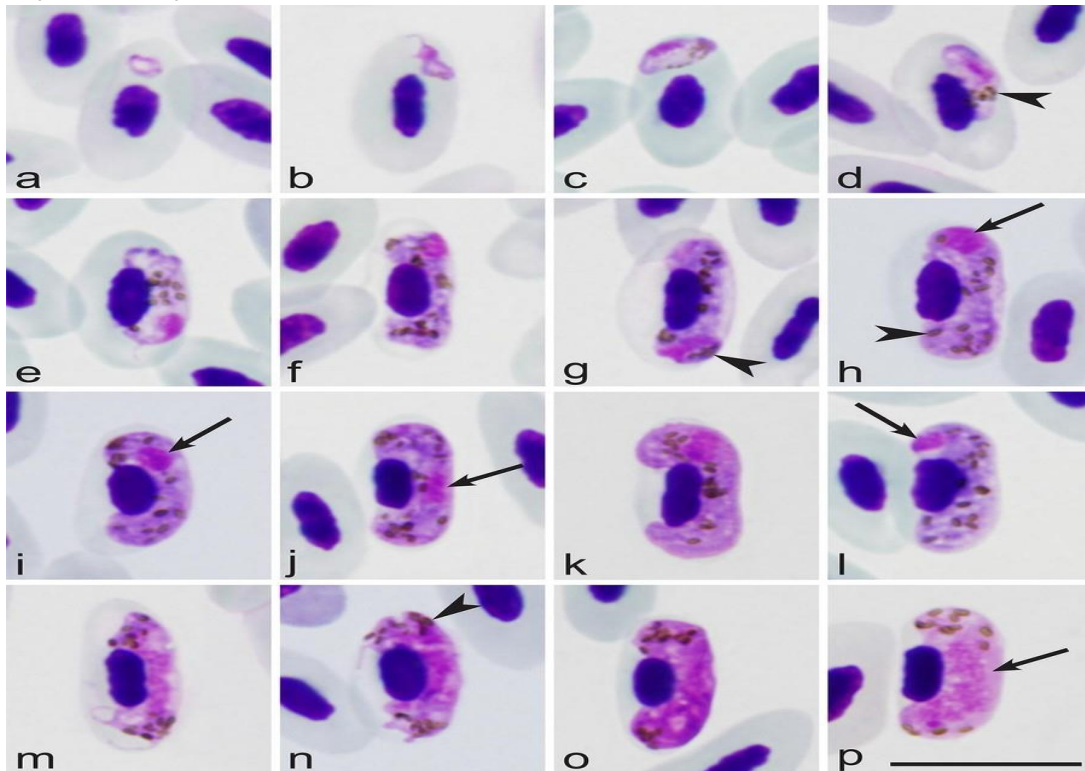


Figura 3 – Gametócito de *Haemoproteus majoris* (linhagem hPHYBOR04) do sangue de um *Turdus pilaris*. Gametócitos jovens a-d; Macrogametócitos e-l; Microgametócitos m-p. Flechas apontam para núcleos de parasitas; Cabeças flechas apontam para grânulos pigmentados. Esfregaços sanguíneos corados com Giemsa.(Ilguñas et al.,2019)

3.5.3 *Leucocytozoon* spp.

Os parasitas *Leucocytozoon* (*Haemosporida*, *Leucocytozoidae*) são um grupo de protozoários ainda pouco compreendidos. Sua diversidade, desenvolvimento fora das hemácias (exo-eritrocitário) e os vetores que os transmitem são aspectos que requerem mais estudos. Por muito tempo, acreditou-se que as infecções por *Leucocytozoon* em aves silvestres eram inofensivas, apesar de causarem doenças graves em aves domésticas, e estarem associadas ao declínio de algumas populações de aves selvagens (Chagas et al., 2023).

Através de técnicas histológicas convencionais, cortes corados por hematoxilina e eosina (H&E) e hibridização *in situ* cromogênica (CISH), Chagas et al. (2023) identificaram merontes e estruturas semelhantes a megamerozoítos de *Leucocytozoon* em tecidos de *Turdus philomelos*. A presença de diferentes estágios de desenvolvimento do parasita em um mesmo indivíduo sugere que o ciclo de vida de *Leucocytozoon* nas aves pode não ser sincronizado, com fases ocorrendo em diferentes momentos e em diversos órgãos. Os rins se mostraram como um local preferencial para o desenvolvimento inicial do parasita. Esses resultados demonstram a complexidade do ciclo de vida de *Leucocytozoon* e a importância de estudos adicionais para compreender os mecanismos de infecção e os impactos dessas parasitoses na saúde das aves.

3.6 Aspectos fisiológicos e sinais clínicos nas aves

Os hemosporídeos são parasitas comuns em aves e suas manifestações variam de infecções subclínicas a doenças graves, dependendo do parasita envolvido e da espécie de ave. As hemosporidioses clínicas são frequentemente observadas em aves não adaptadas em zoológicos ou aviários, enquanto em aves selvagens, particularmente passeriformes, as infecções por hemosporídeos parecem frequentemente ser assintomáticas. Contudo, um estudo recente da Áustria mostrou infecções patogênicas por hemosporídeos em *Turdus merula* devido a altas cargas parasitárias de *Plasmodium matutinum* LINN1, um parasita comum nessa espécie de ave, sugerindo que infecções virulentas também ocorrem em hospedeiros naturais (Himmel et al., 2021). O *Plasmodium*, agente da malária aviária, acomete diversas espécies e está associado a surtos e perda da biodiversidade. A capacidade de adaptação a novos hospedeiros, pelo *Haemoproteus* e pelo *Leucocytozoon* está relacionada a doença clínica muitas vezes fatal (Carvalho; Paludo, 2021).

Os parasitas *Plasmodium* (*Haemosporida*, *Plasmodiidae*) são organismos que infectam o sangue, apresentando grande diversidade. E, embora o conhecimento genético a respeito dos parasitas da malária aviária esteja bastante avançado, pouco se sabe ainda sobre seu desenvolvimento exo-eritrocitário. Essa lacuna é importante, pois, ao contrário dos parasitas da malária que infectam mamíferos, os parasitas da malária aviária passam por várias fases de desenvolvimento fora das hemácias, frequentemente causando danos em

diversos órgãos (Pendl et al., 2022).

Através de técnicas moleculares (PCR) para detectar a presença de parasitas em amostras de sangue e tecidos, e a hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para visualizar a localização dos parasitas nos tecidos, Himmel et al. (2020) identificaram diversas espécies de *Plasmodium* e *Leucocytozoon* em *Turdus merula* e *Turdus philomelos*. O *Leucocytozoon* sp. *TUMER01* causou lesões, como a formação de estruturas parasitárias maiores nos órgãos. Contudo, o *Plasmodium matutinum* LINN1 se destacou como um parasita altamente virulento para *Turdus merula*, causando infecções graves e danos teciduais significativos.

Os parasitas *Haemoproteus* e *Plasmodium* são amplamente distribuídos em aves e, embora algumas espécies de *Plasmodium* sejam mais conhecidas por causar doenças graves em aves nativas, os efeitos dos *Haemoproteus* são menos estudados. Foi descoberto, de forma inesperada, que uma espécie de *Haemoproteus*, o *H. minutus*, normalmente infectante a aves como o *Turdus merula* e o *Turdus philomelos* sem causar problemas graves, tem sido letal a psitacídeos em cativeiro na Europa (Ortiz-Catedral et al., 2019).

Pendl et al. (2022) investigaram o desenvolvimento exo-eritrocitário do parasita *Plasmodium matutinum* em um *Turdus pilaris* encontrado atropelado na Suíça. Observaram que o parasita se multiplicava ativamente tanto dentro das hemácias, quanto em leucócitos e outras células dos vasos sanguíneos. Essa multiplicação exo-eritrocitária era especialmente intensa no cérebro, causando danos significativos a esse órgão. A elevada presença de parasitas em desenvolvimento no cérebro, em conjunto com sinais de obstrução dos vasos sanguíneos, sugere que a infecção pode ter afetado a visão e a coordenação motora do animal, contribuindo para o acidente. Este estudo demonstrou a importância de investigar o desenvolvimento exo-eritrocitário dos parasitas da malária aviária para entender como essas infecções afetam as aves. O *Plasmodium matutinum* pode causar danos significativos ao sistema nervoso central e outros órgãos, e a compreensão desse processo é fundamental para avaliar o impacto da malária aviária na saúde das aves e na dinâmica das populações.

3.7 Diagnóstico

Utilizando diversas técnicas, como histopatológico, PCR e avaliação microscópica, é possível identificar diferentes estágios do parasita em diversos órgãos do animal (Pendl et al., 2022). O recente desenvolvimento de bancos de dados genéticos, com novas metodologias moleculares, tem possibilitado uma quantificação mais precisa de hemosporídios aviários, como a PCR *real-time* quantitativa, e a PCR *droplet* digital melhorou, também, a sensibilidade experimental e a repetibilidade da quantificação (Huang, 2021).

O diagnóstico de infecções letais é atualmente realizado pela detecção dos estágios teciduais dos parasitas em exame histopatológico combinadas com PCR e sequenciamento. No entanto, as sequências frequentemente não são obtidas de forma confiável e a discriminação genérica dos estágios teciduais exo-eritrocitários com base em caracteres morfológicos é desafiadora (Himmel et al., 2019). A detecção precisa de hemosporídeos

aviários é fundamental para estudos ecológicos e evolutivos. Enquanto a microscopia tradicional exige alta especialização, os métodos moleculares, apesar de sensíveis, podem não detectar todas as infecções mistas, limitando a compreensão da complexidade das interações parasita-hospedeiro. A PCR *multiplex one-step*, se mostra uma técnica conveniente e menos onerosa, sendo um método possível de ser utilizado para triagem molecular de hemosporídeos aviários. (Ciloglu et al., 2019).

Infecções por hemosporídeos aviários são regularmente identificadas por métodos moleculares, incluindo PCR *multiplex*, que permite aos pesquisadores distinguir infecções mistas de parasitas de múltiplos gêneros. Ciloglu et al. (2023) ampliaram a aplicabilidade de uma PCR *multiplex* preexistente, projetando um conjunto de oligonucleotídeos específicos para os dois subgêneros de *Haemoproteus* (*Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*). A nova PCR *multiplex* permite a detecção simultânea de *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, *Haemopro-* teus e *Parahaemoproteus*, sendo os dois últimos possíveis de serem identificados mesmo em baixos níveis de infecção.

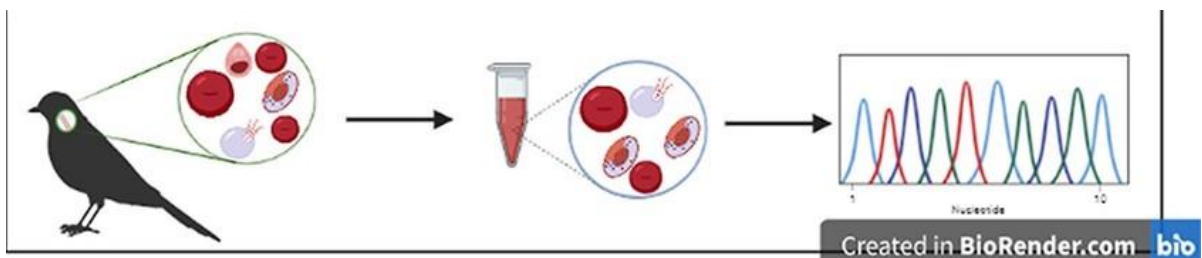


Figura 4 – A principal metodologia para identificar o status da infecção pelos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* e caracterizar as linhagens de parasitas sanguíneos é a PCR e sequenciamento de DNA do gene *cytB* de amostras de sangue de aves. (Brock et al., 2021).

4.0 REFERÊNCIAS

ANJOS, C. C. et al. Avian malaria and related parasites from resident and migratory birds in the brazilian atlantic forest, with description of a new Haemoproteus species. v. 10, n. 2, p. 1 – 21, 2 2021.

BENSCH, S.; HELLGREN, O. The Use of Molecular Methods in Studies of Avian Haemosporidians. In: SANTIAGO-ALARCON, D.; MARZAL, A. (Ed.). Cham: [s.n.], 2020. v. 1, cap. 4, p. 113 – 135.

CAIZERGUES, A. E. et al. Cities as parasitic amplifiers? Malaria prevalence and diversity in great tits along an urbanization gradient. v. 4, p. 000 – 000, 2024. Disponível em: <<http://www.centre-mersenne.org/>>.

CARRERA-JÁTIVA, P. D. et al. *Free-ranging avifauna as a source of generalist parasites for captive birds in zoological settings: An overview of parasite records and potential for cross-transmission.* 2020. 482 – 500 p.

CARVALHO, A. de M.; PALUDO, G. R. HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS – Plasmodium sp., Haemoproteus sp. e Leucocytozoon sp. In: CARVALHO, A. de M.; PALUDO, G. R. (Ed.). [s.n.], 2021. p. 49 – 62. Disponível em: <<https://sseditora.com.br/ebooks/atualidades-em- medicina-tropical-na- america-do-sul-veterinaria/>>.

CHAGAS, C. R. F. et al. Exo-erythrocytic development of Leucocytozoon parasites (Haemosporida, Leucocytozoidae) in song thrushes Turdus philomelos. v. 22, p. 60 – 68, 12 2023.

CILOGLU, A. et al. A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites. v. 118, n. 1, p. 191 – 201, 1 2019.

CILOGLU, A. et al. A novel one-step multiplex PCR protocol to detect avian haemosporidian parasites in the subgenus Haemoproteus (Kruse, 1890) used to quantify parasite prevalence in domestic pigeons (Columba livia) in Turkey. v. 47, n. 2, p. 511 – 521, 6 2023.

DVORIN, J. D.; GOLDBERG, D. E. *Plasmodium* Egress Across the Parasite Life Cycle. v. 76, n. 1, p. 67 – 90, 9 2022.

FECCHIO, A. et al. Loss of forest cover and host functional diversity increases prevalence of avian malaria parasites in the Atlantic Forest. v. 51, n. 9, p. 719 – 728, 8 2021.

FIGUEROLA, J. et al. Urbanization correlates with the prevalence and richness of blood parasites in Eurasian Blackbirds (Turdus merula). v. 922, 4 2024.

- FILION, A. et al. Anthropogenic landscape alteration promotes higher disease risk in wild New Zealand avian communities. v. 17, n. 3 March, 3 2022.
- GALEN, S. C. et al. Parasite-associated mortality in birds: The roles of specialist parasites and host evolutionary distance. v. 18, n. 4, 2022.
- GHAEMITALAB, V. et al. Prevalence and genetic diversity of avian haemosporidian parasites in Southern Iran. v. 10, n. 6, 6 2021.
- GONZÁLEZ-OLVERA, M. et al. Molecular and epidemiological surveillance of Plasmodium spp. during a mortality event affecting Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) at a zoo in the UK. v. 19, p. 26 – 37, 12 2022.
- GRIEVES, L. A. et al. Haemosporidian infection prevalence varies temporally and spatially and Leucocytozoon infections are male biased in Song Sparrows. v. 140, n. 2, 4 2023.
- HARL, J. et al. Geographic and host distribution of haemosporidian parasite lineages from birds of the family Turdidae. v. 19, n. 1, 9 2020.
- HERNÁNDEZ-OSPINA, M. C. et al. Avian haemosporidians of the genera Plasmodium and Haemoproteus from resident and Neotropical migrant birds in Colombia. v. 123, n. 6, 6 2024.
- HIMMEL, T. et al. Molecular probes for the identification of avian Haemoproteus and Leucocytozoon parasites in tissue sections by chromogenic in situ hybridization. v. 12, n. 1, 6 2019.
- HIMMEL, T. et al. A citizen science-based survey of avian mortality focusing on haemosporidian infections in wild passerine birds. v. 20, n. 1, 12 2021.
- HIMMEL, T. et al. Haemosporidiosis in wild Eurasian blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*): An in situ hybridization study with emphasis on exo-erythrocytic parasite burden. v. 19, n. 1, 2 2020.
- HOESEL, W. V. et al. Effects of forest structure on the interaction between avian hosts, dipteran vectors and haemosporidian parasites. v. 20, n. 1, 8 2020.
- HUANG, X. *Assessment of associations between malaria parasites and avian hosts—a combination of classic system and modern molecular approach*. 2021.
- ILGUNAS, M. et al. Patterns of Plasmodium homocircumflexum virulence in experimentally infected passerine birds. v. 18, n. 1, 5 2019.
- JING, C. lei et al. Avian malaria parasite infections do not affect personality in the chestnut thrush (*Turdus rubrocanus*) on the Qinghai-Tibet Plateau. v. 9, n. 9, 9 2023.

LEITE, Y. F. C.; PINHEIRO, R. T.; BRAGA, E. M. Prevalência de Hemosporídeos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. v. 1, n. 6, p. 1 – 12 2013.

LOPES, V. L. et al. High fidelity defines the temporal consistency of host-parasite interactions in a tropical coastal ecosystem. v. 10, n. 1, 12 2020.

MACGREGOR-FORS, I.; CARBÓ-RAMÍREZ, P.; BONILLA-MOHENO, M. An Introduction to Landscape and Urban Ecology: An Avian Haemosporida Perspective. In: SANTIAGO-ALARCON, D.; MARZAL, A. (Ed.). Cham: [s.n.], 2020. v. 1, p. 429 – 450.

MANDAL, F. B. Hurdle in taxonomy: A case of malaria parasites and other Haemosporidia. v. 2, n. 1, p. 40 – 54, 1 2021.

MUSA, S. et al. Parasite airlines: mapping the distribution and transmission of avian blood parasites in migratory birds. 2024.

ORTIZ-CATEDRAL, L. et al. Haemoproteus minutus is highly virulent for Australasian and South American parrots. v. 12, n. 1, 1 2019.

PACHECO, M. A. et al. Mode and Rate of Evolution of Haemosporidian Mitochondrial Genomes: Timing the Radiation of Avian Parasites. v. 35, n. 2, p. 383 – 403, 2 2018.

PENDL, H. et al. Exo-erythrocytic development of Plasmodium matutum (lineage pLINN1) in a naturally infected roadkill fieldfare Turdus pilaris. v. 21, n. 1, 12 2022.

PERKINS, S. L. Malaria's Many Mates: Past, Present, and Future of the Systematics of the Order Haemosporida. v. 100, n. 1, p. 11 – 25, 2 2014.

RIBEIRO, P. V. A. et al. Haemosporidian parasites prevalence associated with physical conditioning of avian species from the Brazilian Cerrado. v. 42, p. e50 –, 5 2020.

RODRIGUES, R. A. et al. Using a multistate occupancy approach to determine molecular diagnostic accuracy and factors affecting avian haemosporidian infections. v. 10, n. 1, 12 2020.

SCHUMM, Y. R. et al. Prevalence and genetic diversity of avian haemosporidian parasites in wild bird species of the order Columbiformes. v. 120, n. 4, p. 1405 – 1420, 4 2021.
Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-021-07053-7>>.

SEDANO-CRUZ, R.; CASTILLO, A.; GIL-VARGAS, D. L. Molecular identification of Haemosporidia in avian endemics of Gorgona Island within a context for the eastern tropical Pacific region. v. 78, p. 104123 –, 3 2020.

STREHMANN, F. et al. Half of a forest bird community infected with haemosporidian parasites. v. 11, 2023.

- TORRE, G. M. D. L. et al. Hemoparasites and their relation to body condition and plumage coloration of the White-necked thrush (*Turdus albicollis*). v. 32, n. 6, p. 509 – 526, 11 2020.
- TOSTES, R. et al. Plasmodium spp. and Haemoproteus spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. v. 35, n. 1, p. 67 – 74, 1 2015.
- VALAVIČIŪTĖ-POCIENĖ, K. et al. Avian haemosporidian parasites from wild-caught mosquitoes with new evidence on vectors of Plasmodium matutum. v. 256, p. 107260 –, 8 2024.
- VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T. Introduction to Life Cycles, Taxonomy, Distribution, and Basic Research Techniques. In: VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T. (Ed.). Cham: [s.n.], 2020. p. 45 – 80.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. *Insights into the Biology of Leucocytozoon Species (Haemosporida, Leucocytozoidae): Why Is There Slow Research Progress on Agents of Leucocytozoonosis?* 2023.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Keys to the avian Haemoproteus parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). v. 21, n. 1, p. 269 –, 9 2022.
- VALKIŪNAS, G. et al. Molecular characterization of six widespread avian haemoproteids, with description of three new Haemoproteus species. v. 197, p. 105051 –, 9 2019.
- YUSUPOVA, D. A. et al. Haemosporidian blood parasites of passerine birds in north-western Siberia. v. 46, n. 6, p. 497 – 511, 6 2023.

CAPÍTULO 2

OCORRÊNCIA DE HEMOSPORÍDEOS EM POPULAÇÕES URBANAS DE AVES DO GÊNERO *Turdus* NO DISTRITO FEDERAL

Capítulo 2

Ocorrência de hemosporídeos em populações urbanas de aves do gênero *Turdus* no Distrito Federal

Stephanie Carolliny Nunes Ferreira¹, Giane Regina Paludo²

¹Médica Veterinária/Mestranda em Ciências Animais – PPG/UnB – Brasília/DF

²Médica Veterinária/Doutora – UnB – Brasília/DF

RESUMO

Os hemosporídeos, protozoários transmitidos por vetores, representam uma ameaça significativa para a saúde das aves. Os principais gêneros envolvidos são *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. O ciclo de vida desses parasitas envolve um hospedeiro vertebrado (ave) e um vetor (inseto hematófago). As análises moleculares têm sido cruciais para identificar novas espécies e elucidar as relações evolutivas entre os diferentes gêneros. Nesse cenário os objetivos desse trabalho foram investigar a ocorrência e diversidade dos hemosporídeos (gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) em aves do gênero *Turdus* em diferentes regiões urbanas do Distrito Federal. Para este trabalho, foram capturadas em redes de neblina 65 aves do gênero *Turdus spp.* As capturas ocorreram em 20 regiões do Distrito Federal entre abril e setembro de 2022. As aves foram submetidas à coleta de sangue para a confecção de esfregaços sanguíneos e extração de DNA para PCR. As amostras de DNA foram submetidas a PCR convencional para sexagem e a outras duas PCR para detecção de hemosporídeos. A microscopia óptica foi utilizada para a análise dos esfregaços sanguíneos. A espécie *Turdus leucomelas* foi a mais capturada, e a maioria das capturas ocorreu em áreas periurbanas. Os resultados da PCR *multiplex* revelaram uma maior detecção de hemosporídeos em relação à microscopia, reiterando a maior sensibilidade da técnica molecular. Este estudo demonstrou a superioridade da PCR *multiplex* para a detecção de hemosporídeos em aves passeriformes do Cerrado, revelando uma sensibilidade significativamente maior em relação a métodos tradicionais. Esses resultados destacam a importância da aplicação de técnicas moleculares em estudos de parasitologia aviária.

Palavras-chave: Protozoários. Hemoparasitas. Diagnóstico. PCR.

ABSTRACT

Hemosporidians, vector-transmitted protozoa, represent a significant threat to avian health. The main genera involved are *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon*. The life cycle of these parasites involves a vertebrate host (bird) and a vector (blood-feeding insect). Molecular analyses have been crucial for identifying new species and elucidating the evolutionary relationships between different genera. In this context, the objectives of this study were to investigate the prevalence and diversity of hemosporidians (*Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon* genera) in birds of the genus *Turdus* across different urban regions of the Federal District, Brazil. For this study, 65 birds of the genus *Turdus spp.* were captured using mist nets. The captures took place in 20 regions of the Federal District between April and September 2022. Blood samples were collected for the preparation of blood smears and DNA extraction for PCR. The DNA samples were subjected to conventional PCR for sex determination and two additional PCRs for the detection of hemosporidians. Optical microscopy was used to analyze the blood smears. The species *Turdus leucomelas* was the most frequently captured, with most captures occurring in periurban areas. The results of the multiplex PCR revealed a higher detection rate of hemosporidians compared to microscopy, reiterating the greater sensitivity of the molecular technique. This study demonstrated the superiority of multiplex PCR for the detection of hemosporidians in passerine birds from the Cerrado, showing significantly higher sensitivity compared to traditional methods. These results highlight the importance of applying molecular techniques in avian parasitology studies.

Keywords: Protozoa, Hemoparasites, Diagnosis, PCR.

1.0 INTRODUÇÃO

Os passeriformes formam um grupo bastante diverso. Pertencem à ordem *Passeriformes*, formada por cerca de 60% das espécies de aves já descritas (Hoyo; Elliott; Sargatal, 2019). Possuem ampla distribuição mundial, com ocorrência pelas Américas, Europa, Ásia, África e Oceania. Com essa diversidade, ocupam diferentes nichos ecológicos e desempenham um papel importante no equilíbrio ecológico de diversos ecossistemas (Raikow; Bledsoe, 2000). Nesse cenário, são importantes no controle e na disseminação de doenças infecciosas e parasitárias, principalmente considerando a sua capacidade de dispersão geográfica (Ciloglu et al., 2019). O Cerrado é um bioma que reflete essa diversidade, e uma das espécies que merecem atenção são as do gênero *Turdus*. Essas aves possuem ampla ocorrência pelo Distrito Federal e podem ser encontradas em ambientes urbanos e periurbanos (Ribeiro et al., 2020).

Entre os agentes infecciosos, destacam-se os protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa e ordem Haemosporida. Essa ordem é constituída por três gêneros principais: *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. Existem mais de 200 espécies de hemosporídeos que infectam aves (Bernotienė et al., 2019). O seu ciclo é heteroxeno e depende de vetores dípteros que ingerem sangue para sua transmissão. Costumam causar doença clínica principalmente em hospedeiros imunossuprimidos (Ciloglu et al., 2019).

O diagnóstico pode ser realizado pela visualização dos esquizontes, trofozoítos e/ou gametócitos em esfregaço sanguíneo. Contudo, este método de diagnóstico possui baixa sensibilidade e depende da experiência do patologista clínico, especialmente em infecções com baixa parasitemia (Ishtiaq et al., 2017). Outro ponto relevante é que as coinfeções são frequentes, podendo não ocorrer a visualização em lâmina de todos os agentes envolvidos. A PCR, por outro lado, é um método com alta sensibilidade e especificidade. Além disso, algumas PCR permitem a identificação simultânea de diferentes gêneros de hemosporídeos. Apesar disso, diferentes protocolos existem e podem não possuir a mesma sensibilidade (Ciloglu et al., 2019).

No Distrito Federal, poucos estudos foram realizados com hemosporídeos em passeriformes e a sua diversidade ainda precisa ser investigada (Fecchio et al., 2011; Fecchio; Marini; Braga, 2007). Apesar de muitas espécies de aves não desenvolverem a doença clínica, podem funcionar como reservatório para espécies suscetíveis. Por isso, objetivou-se verificar a ocorrência e a diversidade de hemosporídeos, em *Turdus* spp. no DF por meio da pesquisa em esfregaço sanguíneo e PCR.

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

As coletas foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília sob o registro 001/2020 e SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) nº 73880-4.

2.2 Coletas das amostras

As amostras foram coletadas em 20 regiões do Distrito Federal, cada qual com diferentes níveis de urbanização. O período de coleta foi entre abril e setembro de 2022. Para a captura dos indivíduos do gênero *Turdus* spp., foram utilizadas redes de neblina com dimensões de 10,0 m x 3,0 m e malha de 50 mm. Essas redes eram montadas entre 30 minutos e 1 hora antes do nascer do sol, horário em que as aves iniciam suas atividades, e desmontadas por volta das 13 horas, devido à redução da atividade nesse período.

Cada ave capturada era identificada taxonomicamente e pesada. Em seguida, realizava-se uma punção na veia jugular direita utilizando uma seringa de 1 mL. O volume de sangue coletado era proporcional ao peso da ave, respeitando o limite máximo de 1% do peso corporal. O sangue de cada indivíduo era armazenado em microtubos sem anticoagulante, refrigerados até o processamento. Além disso, duas lâminas de esfregaço sanguíneo eram confeccionadas no local de coleta. Após o procedimento, as aves eram anilhadas seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/IBAMA) e depois soltas no mesmo local de captura.

2.3 Análise das amostras

2.3.1 Avaliação dos esfregaços sanguíneos

As lâminas dos esfregaços sanguíneos foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília. Cada lâmina foi submetida a um método de coloração distinto: uma pelo método de Panóptico (*NewProv*®, Brasil) e a outra pela coloração de *Rosenfeld*. Em seguida, as lâminas foram analisadas por microscopia óptica para identificação de possíveis hemoparasitas.

2.3.2 Ensaios moleculares

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Setor de Biologia Molecular, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Os coágulos obtidos de cada amostra foram pesados e utilizados para extração de DNA, utilizando o kit comercial *PureLink™ Genomic DNA* (Invitrogen®, Calsbad, CA) conforme as especificações do fabricante. O material genético extraído foi armazenado a -20 °C.

Inicialmente, as amostras de DNA foram submetidas PCR convencional (cPCR) para a sexagem, com os objetivos de, além de identificar o sexo das aves, verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA e a presença de possíveis inibidores da reação de PCR. O protocolo utilizou os oligonucleotídeos 2550F e 2718R (Fridolfsson; Ellegren, 1999), para a detecção dos genes CHD1-W e CHD1-Z. A reação da PCR para sexagem foi composta por 2,0µL de DNA, 1X de tampão da Taq DNA Polimerase, 2,0 mM de MgCl₂, 2,0 mM de cada oligonucleotídeo, 0,25 mM de dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Calsbad, CA) e água Milli-Q® purificada para um volume final de 25µL por reação. O protocolo de amplificação foi utilizado conforme Quintana, Gabriela López e Somoza (2008) com adaptações. A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de: 95°C por 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 54°C por 45 segundos para a hibridização dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão das fitas. Por último, foi realizada a extensão final a 72°C por 5 minutos. Essa técnica de PCR nos permite obter dois fragmentos distintos, com uma diferença de aproximadamente 200 pares de bases entre eles. A presença de ambos os fragmentos foi interpretada como característica de fêmeas (ZW), enquanto a detecção de um único fragmento indicou machos (ZZ) (Quintana; Gabriela López; Somoza, 2008).

Posteriormente, as amostras foram submetidas à duas cPCR, uma para hemosporídeos e outra, *multiplex*, para *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. (Tabela 1).

A cPCR para hemosporídeos utilizou os oligonucleotídeos 3760F e 4292Rw2 (BEA-DELL et al., 2004). As reações de PCR utilizaram solução tampão da Taq DNA polimerase a 1X, 1,0mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Calsbad, CA), 2,0 mM de cada oligonucleotídeo, 2,0µL de DNA e água MilliQ® purificada para volume final de 25µL por reação. O protocolo de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 40 segundos a 95°C, 1 minuto a 58°C, e 1 minuto a 72°C, seguidos por uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

A multiplex cPCR para *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. utilizou os oligonucleotídeos PMF e PMR, HMF e HMR, LMF e LMR, respectivamente (Ciloglu et al., 2019). A reação de PCR para esse *multiplex* foi composta por 2 µL de DNA, 1X de tampão da Taq DNA Polimerase, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM de cada oligonucleotídeo,

0,2 mM de dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*®, Calsbad, CA) e água *Milli-Q*® purificada para um volume final de 25µL por reação. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos; seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 90 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e 1 ciclo de extensão final 72°C por 10 min (Ciloglu et al., 2019).

Todas as amostras foram testadas em duplicata utilizando o termociclador *Biorad*® C1000TM *Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Como controle negativo, foi empregada água ultrapura *Milli-Q*® previamente autoclavada, enquanto o controle positivo consistiu em DNA extraído de animais infectados naturalmente por hemossporídeos e previamente sequenciados. Após as reações de PCR, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio (*Vetec Sigma-Aldrich*®, St. Louis, MO) e examinados sob luz ultravioleta utilizando um transiluminador (*UV transilluminator*®, UVP LLC, Upland, CA).

A determinação taxonômica a nível de gênero dos agentes presentes nas amostras positivas foi realizada com base no tamanho dos fragmentos obtidos na PCR multiplex. Fragmentos com 533 pb (citocromo b) pertenciam a *Haemoproteus* spp., 378 pb (região não codante do genoma mitocondrial) a *Plasmodium* spp. e 218 pb (citocromo oxidase subunidade 1) a *Leucocytozoon* spp.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos, genes alvos e tamanhos dos produtos de PCR utilizados para detecção de hemosporídeos

Gene	Oligonucleotídeos	Sequências dos Oligonucleotídeos (5'-3')	Especificidade	Fragmento	Referências
CHD1-W	2550F	GTTACTGATTCGTCTACG AGA	Aves	450 pb	(Fridolfs-son e Ellegren, 1999)
CHD1-Z	2718R	ATTGAAATGATCCAGTGC TTG	Aves	650 pb	(Fridolfs-son e Ellegren, 1999)
Citocromo b	3760F	GAGTGG ATGGTG TTTTAG AT	<i>Plasmodium</i> spp./ <i>Hemopro-</i> <i>teus</i> spp.	533 pb	(Beadell et al.,2004)
Citocromo b	4292Rw2	TGG AAC AAT ATG TAR AGG AGT	<i>Plasmo-</i> <i>dium/Hemopr-</i> <i>oteus</i> spp.	533 pb	(Beadell et al.,2004)
Região não codante do mtDNA	PMF	CCTCACGAGTCGATCAG G	<i>Plasmodium</i> spp.	378 pb	(Ciloglu et al.,2018)
Região não codante do mtDNA	PMR	GGAAACCGGCGCTAC	<i>Plasmodium</i> spp.	378 pb	(Ciloglu et al.,2018)
Citocromo b	HMF	ATTGGATGTCAATTACCA CA- ATC	<i>Haemoproteus</i> spp.	533 pb	(Ciloglu et al.,2018)
Citocromo b	HMR	GGGAAGTTTATCCAGGA AGTT	<i>Haemoproteus</i> spp.	533 pb	(Ciloglu et al.,2018)
Citocromo c oxidase subunidade 1	LMF	TGGAACAATAATTGSATTA TT- TACAYT	<i>Leucocytozoon</i> spp.	218 pb	(Ciloglu et al.,2018)
Citocromo c oxidase subunidade	LMR	AACATATCATATTCCATCC ATT- TAGATTA	<i>Leucocytozoon</i> spp.	218 pb	(Ciloglu et al.,2018)

2.3.3 Análise estatística

Para comparar a eficácia das duas técnicas de PCR utilizamos o teste de McNemar com correção de Yates, uma vez que se tratava de dados pareados e variáveis nominais. As contagens observadas de resultados positivos e negativos para ambos os métodos foram organizadas em uma tabela de contingência 2x2. Para avaliar se a ocorrência de infecções em fêmeas era maior que em machos, realizamos o teste de Fisher por se tratar de variáveis nominais e não pareadas. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período amostral foram capturadas 65 aves do gênero *Turdus*. A distribuição das coletas e dos animais positivos se encontram representados na Figura 6. A distribuição das capturas por região demonstrou que *Turdus leucomelas* foi a espécie de maior ocorrência dentro do gênero, com 55 indivíduos. Em contrapartida, somente 10 *Turdus rufiventris* foram identificados. Na tabela 2, pode-se observar que a região de maior captura foi o Park Way (Aeroporto) com 8 indivíduos de *T. leucomelas*, Guará II com 8 *T. rufiventris*, seguida por Sobradinho II com 7 exemplares de *T. leucomelas*. A distribuição das coletas está de acordo com o observado por Sick (1997) e (Ribeiro et al., 2020), que relataram que essa espécie está relacionada a ambientes periurbanos e urbanos devido à sua dieta generalista e à alta tolerância a distúrbios ambientais.

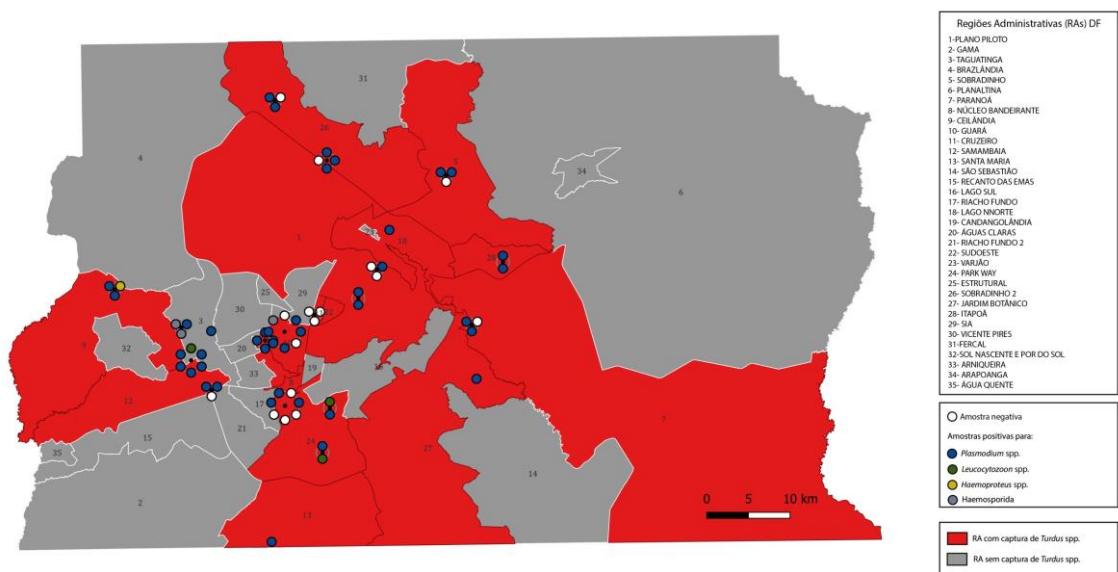


Figura 5 - Mapa com representação dos locais das capturas das aves e dos locais das amostras positivas por região administrativa do DF.

Tabela 2 – Locais de capturas e quantidade de aves capturadas por espécie.

Região	Total de Capturas	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>Turdus rufiventris</i>
Taguatinga Norte	4	4	0
Itapuã	2	2	0
Asa Norte	4	3	1
Incra 9	3	3	0
Samambaia Sul	3	3	0
Samambaia Norte	5	5	0
Cruzeiro Novo	3	3	0
Ceilândia Sul	1	1	0
Park Way (Águas claras)	3	3	0
Guára I	1	1	0
Sobradinho II	7	7	0
Park Way (Aeroporto)	8	8	0
Lago Norte	1	1	0
Sobradinho I	3	2	1
Santa Maria	1	1	0
Núcleo Bandeirante	1	1	0
Jardim Botânico	3	2	1
Taquari	1	1	0
Guára II	8	1	7
Altiplano Leste	3	3	0
Total Geral	65	55	10

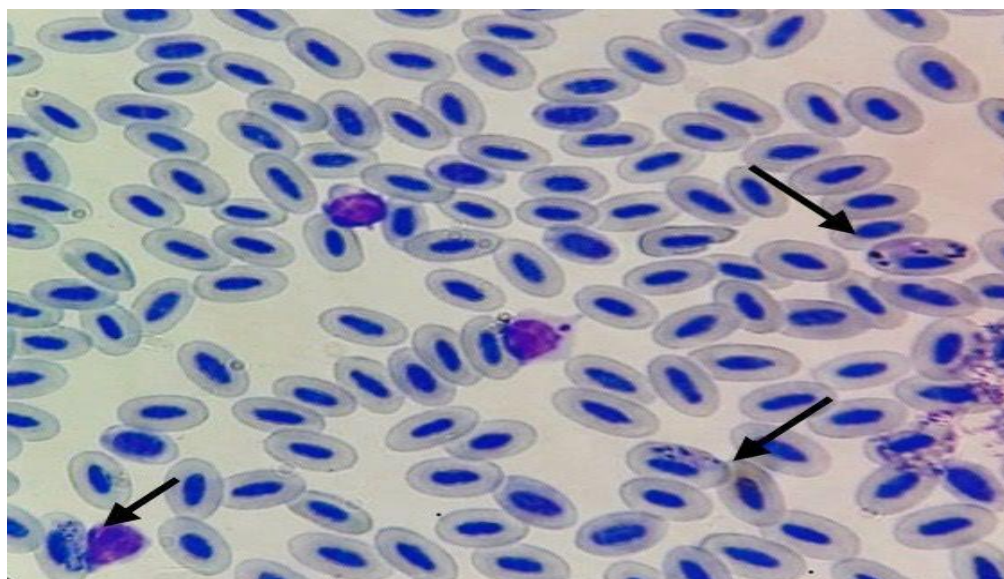
Turdus rufiventris foi a espécie com menos indivíduos capturados e a região com maior número de indivíduos desta espécie capturados (7 aves) foi no Guará II. Isso pode estar relacionado a uma menor adaptabilidade da espécie a ambientes urbanos ou diferenças no comportamento territorial da espécie, como foi observado por (Marini, 2001). Foi relatado que essa espécie está mais relacionada a áreas de vegetação mais bem preservadas, o que justifica a sua menor ocorrência em ambientes urbanos.

Em relação ao sexo das aves, obteve-se um maior número de machos capturados (45 indivíduos) em comparação às fêmeas (20 indivíduos) (tabela 3). Essa diferença pode ser dada aos comportamentos dessas aves, como por exemplo, disputa territorial e períodos de caça, tornando-os mais suscetíveis à captura, como discutido por (Donald, 2007).

Tabela 3 – Sexagem das aves capturadas do gênero *Turdus* separadas por espécie.

Espécie	Machos	Fêmeas
<i>T.leucomelas</i>	36	19
<i>T.rufiventris</i>	9	1
Total	45	20

Das 65 aves capturadas, em apenas um esfregaço sanguíneo foi encontrado parasito (1,54%), que se encontravam em várias fases distintas de gametócitos jovens e maduros. Essa amostra pertencia a *T. leucomelas*. A baixa sensibilidade da microscopia comparada à técnica de PCR está em concordância com os achados de Ribeiro et al. (2005). Nesse estudo foi avaliada a ocorrência de *Plasmodium* spp. Em várias espécies de aves da Mata Atlântica em Minas Gerais. Comparando as duas técnicas, encontraram ocorrências de hemoparasitas de 7,3% na microscopia e 34,3% na PCR. Sendo assim, esses resultados reforçam o uso da técnica de PCR principalmente em casos de baixa carga parasitária, em que a microscopia muitas vezes pode falhar na identificação. Outros estudos semelhantes relatam essa diferença de sensibilidade entre as duas técnicas (Ciloglu et al., 2019).

Figura 6 – Macrogametócitos de hemosporídeo em *T. leucomelas*. (setas)

As análises moleculares baseadas em duas estratégias de PCR, uma para detecção de hemosporídeos por PCR *singleplex*, outra com o uso de três conjuntos de oligonucleotídeos em uma única reação (PCR *multiplex*), cada qual para um gênero específico dentro da ordem Hemosporida (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. E *Leucocytozoon* spp.), revelaram diferenças entre os resultados. De um total de 65 amostras, 49% das amostras foram positivas na PCR *singleplex* (n=32), enquanto na PCR *multiplex* (mPCR), 71% (n=46). A mPCR foi capaz de detectar 17 amostras positivas que foram negativas na PCR *singleplex* (Tabela 4). Com exceção de três amostras, todos os indivíduos positivos na PCR *singleplex* foram positivos na PCR *multiplex*. Para determinar se havia uma diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas de PCR, foi realizado o teste de McNemar com correção de Yates. A análise revelou uma diferença significativa entre os resultados das duas técnicas ($p < 0.05$).

A maior diferença na ocorrência de hemosporídeos considerando as duas técnicas e as duas espécies foi em *T. leucomelas*, em que 49,1% das aves foram positivas na PCR *singleplex* (n=27) em oposição 72,7% (n=40) na PCR *multiplex*. Para *T. rufiventris*, os valores foram 50% (n=5) e 60% (n=6), respectivamente (tabela 4).

Tabela 4 – Total de aves positivas submetidas aos dois tipos de PCRs.

Espécie	<i>Singleplex</i>	<i>Multiplex</i>
<i>T.leucomelas</i>	27/55	40/55
<i>T. rufiventris</i>	5/10	6/10
Total de positivos	32/65	46/65

As regiões com maior número de positivos foram o Park Way (Aeroporto), Guará II e Sobradinho II, que foram também as áreas com maior local de captura. Pelo número amostral baixo em cada região, não foi avaliada estatisticamente a diferença entre os locais (tabela 5).

Tabela 5 – Número de positivos e negativos para hemossporídeos por região do DF.

Região	<i>Plasmodiums</i> spp.	<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Leucocytozoon</i> spp.	Gênero não identificado	Negativos
Taguatinga Norte	2	0	0	2	0
Itapuã	2	0	0	0	0
Asa Norte	2	0	0	0	2
Incra 9	2	1	0	0	0
Samambaia Sul	2	0	0	0	1
Samambaia Norte	4	0	1	0	0
Cruzeiro Novo	0	0	0	0	3
Ceilândia Sul	1	0	0	0	0
Park Way (Águas Claras)	3	0	1	0	4
Guará I	1	0	0	0	0
Sobradinho II	5	0	0	0	2
Park Way (Aeroporto)	4	0	1		3
Sobradinho I	2	0	0	0	1
Santa Maria	1	0	0	0	0
Jardim Botânico	2	0	1	0	0
Núcleo Bandeirante	0	0	0	0	1
Lago Norte	1	0	0	0	0
Guará II	5	0	0	1	2
Altiplano Leste	2	0	0	0	1

No estudo de Ciloglu et al. (2019), não houve diferença significativa entre os dois testes, mas de um total de 180 amostras, 52,7% foram positivas na PCR multiplex e 48,8% na *nested* PCR. Além disso, foi demonstrado que a mPCR foi capaz de identificar indivíduos positivos com baixa parasitemia. Contudo, a especificidade dos oligonucleotídeos nesse estudo foi avaliada somente por ferramentas de bioinformática, especificamente pelo Primer-BLAST, uma vez que as amostras positivas não foram sequenciadas. Existe a possibilidade de os oligonucleotídeos se anelarem a regiões inespecíficas do genoma do hospedeiro ou de outro parasito, o que torna a ferramenta Primer-BLAST útil. Porém, os achados são preditivos e nem todo genoma de ave e de seus parasitos se encontram depositados no banco de dados (GenBank) para comparação.

A mPCR empregada no presente estudo possui algumas características vantajosas que são importantes no estudo e diagnóstico desses agentes. O primeiro deles é o fato de que os oligonucleotídeos foram desenhados para englobar os três gêneros de hemosporídeos (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp.). Cabe salientar que alguns protocolos para PCR em hemosporídeos foram desenvolvidos com base em alinhamentos múltiplos utilizando apenas sequências de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp, não englobando *Leucocytozoon* spp. (Pacheco et al., 2018; Beadell et al., 2004). Contudo, esta última espécie pode ser comumente identificada na natureza, não devendo ser negligenciada. O segundo é que essa técnica permite a amplificação simultânea de agentes distintos em um mesmo indivíduo, devendo ser ressaltado que coinfeções de hemosporídeos em aves são frequentes (Valkiūnas; Iezhova; Shapoval, 2003; Bernotienė et al., 2016). E o terceiro é a economia ao se utilizar uma única reação que permite identificar se amostra é positiva para hemosporídeos, além de informar à qual gênero pertence o agente. Adicionalmente, como boa parte dos protocolos de PCR para hemosporídeos, o alvo de amplificação são regiões do genoma mitocondrial, o que aumenta a sensibilidade de detecção uma vez uma célula possui múltiplas cópias dessa molécula de DNA, quando comparado com marcadores nucleares.

A reação de PCR singleplex do presente estudo utilizou os oligonucleotídeos 3760F e 4292Rw2, que foram desenhados para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. Logo, sequências de *Leucocytozoon* spp. podem não ser amplificadas por esse conjunto de oligonucleotídeos. Em uma rápida análise no programa Geneious v9.1.8, testou-se o anelamento desses oligonucleotídeos com alguns isolados de *Leucocytozoon* spp., e a complementariedade foi baixa (dados não mostrados). Além disso, das três amostras positivas para esse gênero na mPCR, somente uma delas foi positiva também na PCR *singleplex*. Outro ponto importante é que o desenho dos oligonucleotídeos deve contemplar o maior número de isolados possíveis no alinhamento múltiplo como forma de aumentar a sensibilidade e reduzir as chances que falsos positivos. Nesse cenário, Beadell et al. (2004), dado a data de publicação, provavelmente utilizaram menos isolados quando desenharam os oligonucleotídeos, considerando que havia menos sequências de DNA disponíveis para comparação na época.

Essas informações podem ajudar a justificar as diferenças observadas entre as duas técnicas de PCR. De forma objetiva, pode-se levantar como hipóteses: a complementariedade reduzida entre a sequência dos oligonucleotídeos 3760F e 4292Rw2 e a dos hemosporídeos, dificultando o anelamento; a presença de falsos positivos na mPCR, sendo esta menos provável.

Observou-se uma alta ocorrência de hemosporídeos nessas aves, especificamente para *Plasmodium* spp. (64,6%, n=42), seguido por três casos de *Leucocytozoon* spp. (4,6%) e apenas um caso de *Haemoproteus* (1,8%) (Tabela 6). Apesar de a maioria das infecções

serem em *T. leucomelas*, é difícil comparar tal dado com *T. rufiventris*, considerando o número amostral reduzido para essa última espécie. Essa ocorrência predominante de *Plasmodium* spp. está de acordo com outros estudos em aves tropicais (Fecchio et al., 2021). Esse número elevado pode estar associado a diferentes fatores, como suscetibilidade do hospedeiro, distribuição e abundância de vetores. Destaca-se que regiões desmatadas e urbanas podem contribuir para a maior exposição desta espécie a vetores competentes (Fecchio et al., 2021).

Contudo, Fecchio et al. (2011) relataram uma baixa ocorrência de hemosporídeos (6,9%) em passeriformes do Distrito Federal. No estudo foram analisados 508 indivíduos divididos em 26 espécies. A alta diferença na ocorrência pode ser devido ao processo de urbanização e desmatamento no DF ao longo das duas décadas de distância entre os estudos. Outro fator pode incluir a susceptibilidade das espécies de *Turdus* spp. aos agentes. É necessário que mais estudos de ocorrência sejam realizados para analisar se esse mesmo cenário se repete para outras espécies de aves.

Por outro lado, Fecchio et al. (2011) relataram baixa ocorrência para algumas espécies de passeriformes, mas ocorrência elevada para algumas, particularmente aquelas que vivem em grupos. Esse fator é associado com a maior exposição dos hospedeiros a vetores. Provavelmente, essa característica não seria tão importante para *Turdus* spp. No mesmo estudo também, é descrito uma associação positiva na prevalência de *Plasmodium* spp. em aves e espécies que constroem ninhos fechados ou em cavidades. Isso também não se aplica às espécies de *Turdus* do presente estudo.

Tabela 6 – Quantidade de aves positivas submetidas a PCR *multiplex* para hemosporídeos.

Espécie	<i>Plasmodium</i> spp.	<i>Haemoproteus</i> spp.	<i>Leucocytozoon</i> spp.
<i>T.leucomelas</i>	36/55	1/55	3/55
<i>T.rufiventris</i>	6/10	0/10	0/10
Total de positivos	42/65	1/65	3/65

Quanto à relação do sexo das aves e à presença de hemosporídeos, obteve-se 30 machos positivos (67% do total de machos) e 16 fêmeas (80% do total de fêmeas) (tabela 7), mas que não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$). Outros estudos apontam para maior ocorrência de infecção em machos e sugerem que eles enfrentam maior pressão de parasitismo devido ao estresse fisiológico associado à reprodução e territorialidade (Møller; Lope; Saino, 2004). Os dados observados no presente estudo podem ser devido ao número amostral reduzido de aves capturadas.

Tabela 7 – Total de aves positivas por espécie e sexo.

Espécie	Machos	Fêmeas
<i>T.leucomelas</i>	25/36	15/19
<i>T.rufiventris</i>	5/9	1/1
Total	30/45	16/20

Logo, o uso da mPCR desenvolvida para hemosporídeos, Ciloglu et al. (2019) demonstram ser uma técnica muito sensível e econômica que pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica em aves. Isso reforça a importância do uso combinado de técnicas moleculares para garantir maior precisão nos estudos de ocorrência parasitária, minimizando também limitações individuais de cada método, como apontado por Santiago-Alarcon, Palinauskas e Schaefer (2012). Adicionalmente, dada a alta ocorrência desses agentes, principalmente de *Plasmodium* spp., é necessário que estudos futuros façam a caracterização molecular a nível de espécie desses parasitos, identificando as linhagens envolvidas. Isso permitiria ajudar a compreender melhor sua diversidade genética e sua dinâmica populacional, contribuindo em melhores medidas de controle e no entendimento do perfil epidemiológico desses agentes. É importante lembrar que muitas espécies de passeriformes não desenvolvem sinais clínicos em infecções por hemosporídeos. Contudo, esses animais podem servir como reservatório para outras espécies, causando doença clínica importante principalmente em hospedeiros não competentes (Valkiūnas et al., 2014a; Valkiūnas et al., 2014b; Ciloglu et al., 2019).

4.0 CONCLUSÕES

Por meio da PCR *multiplex* e *singleplex* foi possível identificar uma alta ocorrência de hemosporídeos em *Turdus* spp., importante espécie de passeriforme no DF. Em contrapartida na microscopia poucas amostras foram positivas para esses agentes. Das regiões de captura todas, com exceção de duas (Núcleo bandeirante e Cruzeiro novo), apresentaram animais positivos para hemosporídeos. Os resultados deste estudo destacam a relevância do uso de diferentes abordagens moleculares para a detecção de hemosporídeos em aves. A PCR *multiplex* demonstrou-se ser uma ferramenta útil e com boa sensibilidade, detectando um maior número de amostras positivas quando comparada a PCR *singleplex*. Além disso, permitiu a determinação dos gêneros dentro da ordem Haemosporida, com maior ocorrência de *Plasmodium* spp., seguido por *Leucocytozoon* spp. e *Haemoproteus* spp. Estudos futuros devem focar na análise de fatores ambientais específicos que influenciam a prevalência desses parasitas e no impacto dessas infecções na saúde das populações de aves. Conjuntamente, deve ser realizada a caracterização molecular desses isolados para ajudar a entender sua diversidade genética e dinâmica populacional.

5.0 REFERÊNCIAS

- BEADELL, J. S. et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. v. 13, n. 12, p. 3829 – 3844, 12 2004.
- BERNOTIENĖ R. et al. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. v. 163, p. 31 – 37, 4 2016.
- BERNOTIENĖ R. et al. Identification of a new vector species of avian haemoproteids, with a description of methodology for the determination of natural vectors of haemosporidian parasites. v. 12, n. 1, p. 307 –, 12 2019.
- CILOGLU, A. et al. A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites. v. 118, n. 1, p. 191 – 201, 1 2019.
- DONALD, P. F. Adult sex ratios in wild bird populations. v. 149, n. 4, p. 671 – 692, 10 2007.
- FECCHIO, A. et al. Loss of forest cover and host functional diversity increases prevalence of avian malaria parasites in the Atlantic Forest. v. 51, n. 9, p. 719 – 728, 8 2021.
- FECCHIO, A. et al. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. v. 111, n. 2, p. 132 – 138, 6 2011.
- FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. v. 2, n. 3, p. 127 – 135, 2007.
- FRIDOLFSSON, A.; ELLEGREN, H. A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. v. 30, n. 1, p. 116 –, 3 1999.
- HOYO, J. D.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. *Handbook of the Birds of the World Alive*. Barcelona: [s.n.], 2019.
- ISHTIAQ, F. et al. Estimating prevalence of avian haemosporidians in natural populations: a comparative study on screening protocols. v. 10, n. 1, p. 127 –, 12 2017.
- MARINI, M. A. Effects of forest fragmentation on birds of the cerrado region, Brazil. v. 11, n. 1, p. 13 – 25, 3 2001.
- MØLLER, A. P.; LOPE, F. de; SAINO, N. PARASITISM, IMMUNITY, AND ARRIVAL DATE IN A MIGRATORY BIRD, THE BARN SWALLOW. v. 85, n. 1, p. 206 – 219, 1 2004.
- PACHECO, M. A. et al. Mode and Rate of Evolution of Haemosporidian Mitochondrial Genomes: Timing the Radiation of Avian Parasites. v. 35, n. 2, p. 383 – 403, 2 2018.

QUINTANA, F.; GABRIELA LÓPEZ; SOMOZA, G. A Cheap and Quick Method for DNA-based Sexing of Birds. v. 31, n. 3, p. 485 – 488, 9 2008.

RAIKOW, R. J.; BLEDSOE, A. H. Phylogeny and Evolution of the Passerine Birds: Independent methods of phylo-genetic analysis have produced a well-supported hypothesis of passerine phylogeny, one that has proved particularly useful in ecological and evolutionary studies. v. 50, n. 6, p. 487 – 499, 6 2000.

RIBEIRO, P. V. A. et al. Haemosporidian parasites prevalence associated with physical conditioning of avian species from the Brazilian Cerrado. v. 42, p. e50 –, 5 2020.

RIBEIRO, S. F. et al. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. v. 130, n. 3, p. 261 – 267, 3 2005.

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H. M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. v. 87, n. 4, p. 928 – 964, 11 2012.

SICK, H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: [s.n.], 1997. v. 3.

VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; SHAPOVAL, A. P. High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. v. 37, n. 22, p. 2647 – 2652, 11 2003.

VALKIŪNAS, G. et al. Haemoproteus infections (Haemosporida, Haemoproteidae) kill bird-biting mosquitoes. v. 113, n. 3, p. 1011 – 1018, 3 2014a.

VALKIŪNAS, G. et al. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. v. 113, n. 6, p. 2251 – 2263, 6 2014b.

Referências

- ANJOS, C. C. et al. Avian malaria and related parasites from resident and migratory birds in the Brazilian Atlantic forest, with description of a new *Haemoproteus* species. v. 10, n. 2, p. 1 – 21, 2 2021.
- ANTONINI, Y. et al. Patterns of avian malaria in tropical and temperate environments: Testing the “The enemy release hypothesis”. v. 19, n. 4, 2019.
- BEADELL, J. S. et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. v. 13, n. 12, p. 3829 – 3844, 12 2004.
- BENSCH, S.; HELLGREN, O. The Use of Molecular Methods in Studies of Avian Haemosporidians. In: SANTIAGO-ALARCON, D.; MARZAL, A. (Ed.). Cham: [s.n.], 2020. v. 1, cap. 4, p. 113 – 135.
- BERNOTIENÈ R. et al. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): A comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. v. 163, p. 31 – 37, 4 2016.
- BERNOTIENÈ R. et al. Identification of a new vector species of avian haemoproteids, with a description of methodology for the determination of natural vectors of haemosporidian parasites. v. 12, n. 1, p. 307 –, 12 2019.
- CAIZERGUES, A. E. et al. Cities as parasitic amplifiers? Malaria prevalence and diversity in great tits along an urbanization gradient. v. 4, p. 000 – 000, 2024. Disponível em: <<http://www.centre-mersenne.org/>>.
- CARRERA-JÁTIVA, P. D. et al. *Free-ranging avifauna as a source of generalist parasites for captive birds in zoological settings: An overview of parasite records and potential for cross-transmission*. 2020. 482 – 500 p.
- CARVALHO, A. de M.; PALUDO, G. R. HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS – *Plasmodium* sp., *Haemoproteus* sp. e *Leucocytozoon* sp. In: CARVALHO, A. de M.; PALUDO, G. R. (Ed.). [s.n.], 2021. p. 49 – 62. Disponível em: <<https://sseditora.com.br/ebooks/atualidades-em-medicina-tropical-na-america-do-sul-veterinaria/>>.
- CHAGAS, C. R. F. et al. Exo-erythrocytic development of *Leucocytozoon* parasites (Haemosporida, Leucocytozoidae) in song thrushes *Turdus philomelos*. v. 22, p. 60 – 68, 12 2023.
- CILOGLU, A. et al. A new one-step multiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of avian haemosporidian parasites. v. 118, n. 1, p. 191 – 201, 1 2019.

- CILOGLU, A. et al. A novel one-step multiplex PCR protocol to detect avian haemosporidian parasites in the subgenus *Haemoproteus* (Kruse, 1890) used to quantify parasite prevalence in domestic pigeons (*Columba livia*) in Turkey. v. 47, n. 2, p. 511 – 521, 6 2023.
- DONALD, P. F. Adult sex ratios in wild bird populations. v. 149, n. 4, p. 671 – 692, 10 2007.
- DVORIN, J. D.; GOLDBERG, D. E. *Plasmodium* Egress Across the Parasite Life Cycle. v. 76, n. 1, p. 67 – 90, 9 2022.
- FECCHIO, A. et al. Loss of forest cover and host functional diversity increases prevalence of avian malaria parasites in the Atlantic Forest. v. 51, n. 9, p. 719 – 728, 8 2021.
- FECCHIO, A. et al. High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. v. 111, n. 2, p. 132 – 138, 6 2011.
- FECCHIO, A.; MARINI, M. A.; BRAGA, E. M. Baixa prevalência de hemoparasitos em aves silvestres no Cerrado do Brasil Central. v. 2, n. 3, p. 127 – 135, 2007.
- FIGUEROLA, J. et al. Urbanization correlates with the prevalence and richness of blood parasites in Eurasian Blackbirds (*Turdus merula*). v. 922, 4 2024.
- FILION, A. et al. Anthropogenic landscape alteration promotes higher disease risk in wild New Zealand avian communities. v. 17, n. 3 March, 3 2022.
- FRIDOLFSSON, A.; ELLEGREN, H. A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. v. 30, n. 1, p. 116 –, 3 1999.
- GALEN, S. C. et al. Parasite-associated mortality in birds: The roles of specialist parasites and host evolutionary distance. v. 18, n. 4, 2022.
- GHAEMITALAB, V. et al. Prevalence and genetic diversity of avian haemosporidian parasites in Southern Iran. v. 10, n. 6, 6 2021.
- GONZÁLEZ-OLVERA, M. et al. Molecular and epidemiological surveillance of *Plasmodium* spp. during a mortality event affecting Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) at a zoo in the UK. v. 19, p. 26 – 37, 12 2022.
- GRIEVES, L. A. et al. Haemosporidian infection prevalence varies temporally and spatially and *Leucocytozoon* infections are male biased in Song Sparrows. v. 140, n. 2, 4 2023.
- HARL, J. et al. Geographic and host distribution of haemosporidian parasite lineages from birds of the family Turdidae. v. 19, n. 1, 9 2020.
- HERNÁNDEZ-OSPINA, M. C. et al. Avian haemosporidians of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* from resident and Neotropical migrant birds in Colombia. v. 123, n. 6, 6 2024.

- HIMMEL, T. et al. Molecular probes for the identification of avian Haemoproteus and Leucocytozoon parasites in tissue sections by chromogenic in situ hybridization. v. 12, n. 1, 6 2019.
- HIMMEL, T. et al. A citizen science-based survey of avian mortality focusing on haemosporidian infections in wild passerine birds. v. 20, n. 1, 12 2021.
- HIMMEL, T. et al. Haemosporidiosis in wild Eurasian blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*): An in situ hybridization study with emphasis on exo-erythrocytic parasite burden. v. 19, n. 1, 2 2020.
- HOESEL, W. V. et al. Effects of forest structure on the interaction between avian hosts, dipteran vectors and haemosporidian parasites. v. 20, n. 1, 8 2020.
- HOYO, J. D.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. *Handbook of the Birds of the World Alive*. Barcelona: [s.n.], 2019.
- HUANG, X. *Assessment of associations between malaria parasites and avian hosts—a combination of classic system and modern molecular approach*. 2021.
- ILGUNAS, M. et al. Patterns of *Plasmodium homocircumflexum* virulence in experimentally infected passerine birds. v. 18, n. 1, 5 2019.
- ISHTIAQ, F. et al. Estimating prevalence of avian haemosporidians in natural populations: a comparative study on screening protocols. v. 10, n. 1, p. 127 – 12 2017.
- JING, C. lei et al. Avian malaria parasite infections do not affect personality in the chestnut thrush (*Turdus rubrocanus*) on the Qinghai-Tibet Plateau. v. 9, n. 9, 9 2023.
- LEITE, Y. F. C.; PINHEIRO, R. T.; BRAGA, E. M. Prevalência de Hemosporídeos em três localidades do Estado do Tocantins, Brasil. v. 1, n. 6, p. 1 – 12 2013.
- LOPES, V. L. et al. High fidelity defines the temporal consistency of host-parasite interactions in a tropical coastal ecosystem. v. 10, n. 1, 12 2020.
- MACGREGOR-FORS, I.; CARBÓ-RAMÍREZ, P.; BONILLA-MOHENO, M. An Introduction to Landscape and Urban Ecology: An Avian Haemosporida Perspective. In: SANTIAGO-ALARCON, D.; MARZAL, A. (Ed.). Cham: [s.n.], 2020. v. 1, p. 429 – 450.
- MANDAL, F. B. Hurdle in taxonomy: A case of malaria parasites and other Haemosporidia. v. 2, n. 1, p. 40 – 54, 1 2021.
- MARINI, M. A. Effects of forest fragmentation on birds of the cerrado region, Brazil. v. 11, n. 1, p. 13 – 25, 3 2001.

MØLLER, A. P.; LOPE, F. de; SAINO, N. PARASITISM, IMMUNITY, AND ARRIVAL DATE IN A MIGRATORY BIRD, THE BARN SWALLOW. v. 85, n. 1, p. 206 – 219, 1 2004.

MUSA, S. et al. Parasite airlines: mapping the distribution and transmission of avian blood parasites in migratory birds. 2024.

ORTIZ-CATEDRAL, L. et al. Haemoproteus minutus is highly virulent for Australasian and South American parrots. v. 12, n. 1, 1 2019.

PACHECO, M. A. et al. Mode and Rate of Evolution of Haemosporidian Mitochondrial Genomes: Timing the Radiation of Avian Parasites. v. 35, n. 2, p. 383 – 403, 2 2018.

PENDL, H. et al. Exo-erythrocytic development of Plasmodium matutum (lineage pLINN1) in a naturally infected roadkill fieldfare Turdus pilaris. v. 21, n. 1, 12 2022.

PERKINS, S. L. Malaria's Many Mates: Past, Present, and Future of the Systematics of the Order Haemosporida. v. 100, n. 1, p. 11 – 25, 2 2014.

QUINTANA, F.; GABRIELA LÓPEZ; SOMOZA, G. A Cheap and Quick Method for DNA-based Sexing of Birds. v. 31, n. 3, p. 485 – 488, 9 2008.

RAIKOW, R. J.; BLEDSOE, A. H. Phylogeny and Evolution of the Passerine Birds: Independent methods of phylo-genetic analysis have produced a well-supported hypothesis of passerine phylogeny, one that has proved particularly useful in ecological and evolutionary studies. v. 50, n. 6, p. 487 – 499, 6 2000.

RIBEIRO, P. V. A. et al. Haemosporidian parasites prevalence associated with physical conditioning of avian species from the Brazilian Cerrado. v. 42, p. e50 –, 5 2020.

RIBEIRO, S. F. et al. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. v. 130, n. 3, p. 261 – 267, 3 2005.

RODRIGUES, R. A. et al. Using a multistate occupancy approach to determine molecular diagnostic accuracy and factors affecting avian haemosporidian infections. v. 10, n. 1, 12 2020.

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H. M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. v. 87, n. 4, p. 928 – 964, 11 2012.

SCHUMM, Y. R. et al. Prevalence and genetic diversity of avian haemosporidian parasites in wild bird species of the order Columbiformes. v. 120, n. 4, p. 1405 – 1420, 4 2021.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-021-07053-7>>.

- SEDANO-CRUZ, R.; CASTILLO, A.; GIL-VARGAS, D. L. Molecular identification of Haemosporidia in avian endemics of Gorgona Island within a context for the eastern tropical Pacific region. v. 78, p. 104123 –, 3 2020.
- SICK, H. *Ornitologia brasileira*. Rio de Janeiro: [s.n.], 1997. v. 3.
- STREHMANN, F. et al. Half of a forest bird community infected with haemosporidian parasites. v. 11, 2023.
- TORRE, G. M. D. L. et al. Hemoparasites and their relation to body condition and plumage coloration of the White-necked thrush (*Turdus albicollis*). v. 32, n. 6, p. 509 – 526, 11 2020.
- TOSTES, R. et al. Plasmodium spp. and Haemoproteus spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. v. 35, n. 1, p. 67 – 74, 1 2015.
- VAL AVIČIŪTĖ-POCIENĖ, K. et al. Avian haemosporidian parasites from wild-caught mosquitoes with new evidence on vectors of Plasmodium matutinum. v. 256, p. 107260 –, 8 2024.
- VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T. Introduction to Life Cycles, Taxonomy, Distribution, and Basic Research Techniques. In: VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T. (Ed.). Cham: [s.n.], 2020. p. 45 – 80.
- VAL KIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. *Insights into the Biology of Leucocytozoon Species (Haemosporida, Leucocytozoidae): Why Is There Slow Research Progress on Agents of Leucocytozoonosis?* 2023.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Keys to the avian Haemoproteus parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). v. 21, n. 1, p. 269 –, 9 2022.
- VAL KIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; SHAPOVAL, A. P. High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. v. 37, n. 22, p. 2647 – 2652, 11 2003.
- VAL KIŪNAS, G. et al. Molecular characterization of six widespread avian haemoproteids, with description of three new Haemoproteus species. v. 197, p. 105051 –, 9 2019.
- VAL KIŪNAS, G. et al. Haemoproteus infections (Haemosporida, Haemoproteidae) kill bird-biting mosquitoes. v. 113, n. 3, p. 1011 – 1018, 3 2014a.
- VAL KIŪNAS, G. et al. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. v. 113, n. 6, p. 2251 – 2263, 6 2014b.

YUSUPOVA, D. A. et al. Haemosporidian blood parasites of passerine birds in north-western Siberia. v. 46, n. 6, p. 497 – 511, 6 2023.