



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DISSERTAÇÃO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Leucocytozoon*
spp. EM FRANGOS CAPIRAS NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA

Ana Luiza Castro dos Santos

São Luís - MA

2022

ANA LUIZA CASTRO DOS SANTOS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Leucocytozoon*
spp. EM FRANGOS CAIPIRAS NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA, da Universidade Estadual do Maranhão.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva, Reprodução e Conservação Animal

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

São Luís - MA

2022

Santos, Ana Luiza Castro dos.

Epidemiologia molecular e caracterização de *Leucocytozoon* spp. em frangos caipiras na ilha de São Luís - MA / Ana Luiza Castro dos Santos. – São Luís, 2022.

48 f.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo.

1.Hemosporídeos. 2.Aves. 3.Diagnóstico molecular. I.Título.

CDU: 636.5.09:616.993(812.1)

ANA LUIZA CASTRO DOS SANTOS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Leucocytozoon*
spp. EM FRANGOS CAIPIRAS NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA**

Aprovada em: 14/10/2022

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA, da Universidade Estadual do Maranhão.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
(Orientador)

Prof. Dr. José Gomes Pereira
(1º Membro Titular)

Profa. Dra. Carla Janaína Rebouças Marques do Rosário
(2º Membro Titular)

São Luís - MA
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela sua força e presença constante, em todos os momentos da minha vida. Sem Ele, nada seria possível.

À minha família, Antônio Carlos, Paula Castro e Vinicius Castro. Obrigada pelo incentivo, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo, pelos ensinamentos, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À toda a equipe do laboratório de Imunodiagnóstico, em especial, MSc. Cristian Lima, MSc. Jéssica Lindoso, Profa. Dra. Carla Rebouças e MSc. Walérya Mendonça, pelo apoio e disposição em sempre ajudar-me quando necessário.

À toda equipe do laboratório de Patologia Molecular, pelo auxílio e suporte técnico para a realização deste trabalho.

À toda equipe do laboratório de Parasitologia, em especial a Danielle Coutinho, Andrea Teles e Jordeano Araújo. Agradeço ao modo como disponibilizaram-se a ajudar-me na realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Andréa Pereira da Costa, pela sua inestimável contribuição para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada pela disposição do seu tempo, paciência, compreensão e por sua dedicação a ensinar.

Às minhas amigas, Suellem Botelho, Caroline Lima, Erica Mendes, Dennisiane Saraiva, Francielma Chaves, Jucyara Moraes, Karolina Brandão e Caroline Calixto, minhas grandes companheiras da graduação.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCA/UEMA, pela oportunidade de aperfeiçoar-me profissionalmente. Agradeço aos funcionários do curso pela assistência, sempre quando solicitada.

À FAPEMA, pela concessão da bolsa de pesquisa.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos criadores de aves que se dispuseram a participar desta pesquisa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.



DECLARAÇÃO – PROTOCOLO Nº 034/2020

Declaramos aos devidos fins que o projeto de pesquisa intitulado **“Epidemiologia molecular e caracterização de Leucocytozoon spp. em frangos caipiras na ilha de São Luís-MA”** foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, conforme protocolo nº 34/2020 executado pela mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a médica veterinária, **Ana Luiza Castro dos Santos**, sob orientação do Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo, por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária-CFMV nº 1000/2012, a Lei 11.794/2008 e normas do CONCEA.

São Luís, 20 de março de 2021.

Profª. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Leucocytozoon* spp. EM FRANGOS CAIPIRAS NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA

RESUMO - A avicultura de subsistência é uma atividade presente na vida das comunidades rurais no estado do Maranhão, possuindo um importante papel cultural e econômico. Nos locais de criação de aves domésticas, é comum presenciar a interação e criação desses animais com espécies de aves silvestres e migratórias. Estes aspectos podem favorecer a dispersão e ocorrência de diversos agentes infecciosos e parasitários, já que esses animais podem atuar como potenciais portadores biológicos ou transportadores mecânicos, permitindo-lhes colonizar novas áreas e parasitar hospedeiros suscetíveis. A leucocitoozoonose aviária é causada por protozoários do gênero *Leucocytozoon* spp. Sua transmissão ocorre por meio da picada de insetos dípteros, pertencentes as famílias Simuliidae e Ceratopogonidae. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de *Leucocytozoon* spp. em frangos caipiras que convivem com aves migratórias na ilha de São Luís, Maranhão. Foram coletadas 100 amostras de sangue de frangos caipiras originados dos quatro municípios que fazem parte da ilha de São Luís - MA. Para identificação do parasito, foi realizada a técnica de Nested PCR. Porém, de todas as amostras analisadas, nenhuma apresentou resultado positivo para *Leucocytozoon* spp. Embora a presença de *Leucocytozoon* spp. não tenha sido identificada, são necessários estudos futuros que contribuam para determinar a distribuição geográfica do parasito, visto que a ilha de São Luís faz parte da rota migratória de aves costeiras que podem carrear diversos patógenos, afim de evitar a ocorrência de hemosporídeos nas criações de aves de subsistência.

Palavras-chave: hemosporídeos, aves, diagnóstico molecular

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND CHARACTERIZATION OF
Leucocytozoon spp. **IN FREE-RANGE CHICKENS ON THE ISLAND OF SÃO**
LUÍS-MA

ABSTRACT - Subsistence poultry farming is an activity present in the life of rural communities in the state of Maranhão, having an important cultural and economic role. In domestic poultry breeding sites, it is common to witness the interaction and breeding of these animals with wild and migratory bird species. These aspects can favor the dispersion and occurrence of several infectious and parasitic agents, since these animals can act as potential biological carriers or mechanical transporters, allowing them to colonize new areas and parasitize susceptible hosts. Avian leukocytozoonosis is caused by protozoa of the genus *Leucocytozoon* spp. Its transmission occurs through the bite of dipteran insects, belonging to the Simuliidae and Ceratopogonidae families. Given the above, the objective of this work was to verify the occurrence of *Leucocytozoon* spp. in free-range chickens that live with migratory birds on the island of São Luís, Maranhão. 100 blood samples were collected from free-range chickens from the four municipalities that are part of the island of São Luís - MA. To identify the parasite, the Nested PCR technique was performed. However, of all the samples analyzed, none showed a positive result for *Leucocytozoon* spp. Although the presence of *Leucocytozoon* spp. has not been identified, future studies are needed to help determine the geographic distribution of the parasite, since the island of São Luís is part of the migratory route of coastal birds that can carry several pathogens, in order to avoid the occurrence of hemosporidian in subsistence poultry farms.

Keywords: hemosporidian, birds, molecular diagnosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Municípios que fazem parte da ilha de São Luís - MA	23
FIGURA 2. Criação de aves domésticas e exóticas, além de instalações que permitiam o acesso de diversas espécies de aves migratórias aos locais de criação de aves, São Luís-MA.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores para o gene *β-actina*.....25

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores para o gene *cytb*.....26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Aspectos econômicos da avicultura no Brasil	15
2.2 Sítios de aves migratórias e sua relação com o transporte de hemosporídeos.. 16	
2.3 Hemosporídeos aviários	17
2.4 <i>Leucocytozoon</i> spp.	18
2.5 Distribuição geográfica e aspectos epidemiológicos	18
2.6 Transmissão e ciclo de vida	19
2.7 Patogenia	21
2.8 Sinais clínicos	21
2.9 Diagnóstico	21
2.10 Controle e profilaxia	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Comitê de ética	25
4.2 Área de estudo	25
4.3 Amostragem e coleta de material	26
4.4 Extração do DNA	26
4.5 Diagnóstico Molecular	26
4.5.1 PCR convencional para o gene endógeno de aves β-actina	26
4.5.2 Nested PCR para <i>Leucocytozoon</i> spp.	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de subsistência é uma atividade presente na vida da maioria das famílias rurais. Possui um importante papel cultural, econômico e é considerada uma forma alternativa de agregar valores aos produtos produzidos por pequenas propriedades brasileiras. É uma atividade predominante no estado do Maranhão, possuindo grande importância do ponto de vista social e econômico (GALVÃO, BENTO & SOUZA, 2009; PEDROSA et al., 2019). Nos locais de criação de aves de subsistência, é comum presenciar a criação e interação desses animais com aves silvestres e migratórias. Este aspecto é considerado um fator para a ocorrência de diferentes enfermidades na produção de aves industrial, comercial ou doméstica (SCHERER et al., 2011).

Todo ano, várias espécies de aves chegam ao litoral do Brasil, provenientes de vários continentes do mundo (VALENTE et al., 2011). As aves migratórias são consideradas potenciais portadores e carreadores de diversos agentes patógenos e parasitários, disseminando-os de forma biológica ou mecânica (HUBÁLEK, 2004). O estresse provocado pelo processo de migração pode causar imunossupressão e aumentar a suscetibilidade desses animais a doenças infecciosas e parasitárias, facilitando a sua instalação e dispersão (DHAMA et al., 2008).

Dentre as parasitoses que acometem aves, existem os hematozoários, que apresentam ciclo de vida heteróximo obrigatório (GARNHAM, 1966). Os hemosporídeos são um grupo de protozoários do reino Protista, pertencentes ao filo Apicomplexa, classe Coccidiea e ordem Haemosporidida. Possuem como integrantes as famílias Garniidae, Haemoproteidae, Plasmodiidae e Leucocytozoidae e podem parasitar diversos hospedeiros, incluindo aves, répteis e mamíferos (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005; TELFORD, 2009; PERKINS, 2014).

Os principais gêneros são *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. São transmitidos por vetores dípteros, pertencentes as famílias Culicinae, Ceratopogonidae e Simuliidae, respectivamente. Epidemias tem ocorrido em populações naturais, levando à perda da diversidade biológica em escala local ou global, afetando uma ampla variedade de táxons, incluindo as aves (VALKIUNAS, 2005; CLARK et al., 2014; RIVERO & GANDON, 2018).

A leucocitozoonose aviária é causada pelo gênero *Leucocytozoon*, possuindo como subgêneros *Akiba* e *Leucocytozoon*. Algumas das espécies deste parasita relatadas em aves domésticas são *Leucocytozoon caulleryi*, *Leucocytozoon sabralesi*,

Leucocytozoon smithi, *Leucocytozoon andrewsi*, *Leucocytozoon schoutedeni* e *Leucocytozoon simondi*. Destas, *Leucocytozoon caulleryi* é considerada a mais patogênica, causando doença hemorrágica em aves jovens e quedas na produção (VAN-WETTERE, 2020). A maioria das espécies de *Leucocytozoon* spp. são transmitidas por meio da picada de moscas negras, pertencentes a família Simuliidae. Porém, Akiba et al. (1958) descobriu que *Leucocytozoon caulleryi* é transmitido pela picada do mosquito *Culicoides arakawae*.

O Brasil possui aproximadamente cerca de 18% de toda diversidade de aves do mundo, o que o coloca entre os países com maior riqueza de espécies aviárias. É um país que possui uma enorme diversidade de ambientes, sendo este um aspecto que lhe permite abrigar e receber uma grande variedade de aves em seu território (ICMBIO, 2019). A migração é um fator de risco para a dispersão de parasitas pelas aves, além de ser um aspecto que favorece a exposição das aves parasitadas a possíveis novos reservatórios e vetores (REED et al., 2003, VALKIUNAS, 2005).

As aves de subsistência são animais que podem atuar como sentinelas para infecções parasitárias, pois podem entrar em contato com patógenos carregados por aves silvestres e migratórias, já que a captura e criação desses animais juntamente a aves domésticas é uma prática comum no estado do Maranhão (CLARK & HALL, 2006; SCHERER et al., 2011; FILHO, 2014). As aves de subsistência poderiam funcionar como potenciais reservatórios, assim como disseminar agentes parasitários para outras aves migrantes (HERNANDEZ-DIVERS et al., 2008).

Existem poucos dados em relação ocorrência de *Leucocytozoon* spp. e seus vetores no território brasileiro, sendo este considerado o gênero menos estudado, em comparação aos demais hemosporídeos aviários (LUTZ et al., 2015; OUTLAW et al., 2017). Há trabalhos que relatam que *Leucocytozoon* spp. possui grande diversidade em regiões neotropicais, como a América do Sul (MERINO et al., 2008; GALEN & WITT, 2014; LOTTA et al., 2016). No município de São José de Ribamar, localizado no estado do Maranhão, já houve o relato da ocorrência de hemosporídeos em aves domésticas e selvagens migratórias sob o regime de cativeiro, onde constatou-se parasitismo por *Leucocytozoon* spp. nesses animais (FILHO, 2014).

A ilha de São Luís, devido a sua localização, faz parte da rota de migração de aves costeiras. Segundo levantamentos, a costa norte do Brasil é a segunda área mais importante da América do Sul, em número de aves migratórias. A seção Maranhão/Pará abriga cerca de 13,1% do índice de aves que visitam o continente (VALENTE et al.,

2011). O sítio de Guarás, localizado no município de Cururupu e o sítio de Panaquatira, localizado no município de São José de Ribamar são sítios migratórios, encontrados no estado do Maranhão (ICMBIO, 2019). Diante disso, o estudo de *Leucocytozoon* spp. é fundamental para um melhor conhecimento dos focos naturais de infecções parasitárias, já que as aves são animais que atuam como sentinelas para contaminação ambiental, o que pode ajudar a identificar a circulação desses agentes entre os animais, a estabelecer fatores de risco existentes e a compreender melhor a ecologia e evolução das interações entre parasita-hospedeiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos econômicos da avicultura no Brasil

A avicultura ocupa uma posição de destaque na economia brasileira e mundial, desempenhando um importante papel na alimentação da população. A competitividade dessa cadeia é expressa por ganhos de produtividade no decorrer dos últimos anos, o que resultou na queda dos custos de produção e conseqüentemente no preço da carne de frango, em comparação a outras fontes de proteína animal. O Brasil destaca-se no cenário mundial por sua produção no setor agropecuário e no agronegócio. O setor da avicultura foi o que mais evoluiu nos últimos anos, elevando o país a posição de maior exportador e segundo maior produtor de carne de frango mundialmente. No ano de 2018, foram produzidos 1.468.351.527 bilhões de cabeças de aves (COSTA, GARCIA & BRENE, 2015; ABPA, 2018; SAGRIMA, 2018).

O país ocupa o sétimo lugar no ranking mundial da produção de ovos, o que representa 3,34% da produção mundial. São Paulo é o maior produtor de ovos dentre as unidades da federação, seguido pelos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Pernambuco e Mato Grosso. A maioria da produção de ovos é destinada ao mercado interno (ABPA, 2018).

No ano de 2018 no Maranhão, a produção foi de 12.134.673 de aves. Os municípios de maiores destaques do estado são Paço do Lumiar com 597.356 cabeças, Porto Franco com 588.500 cabeças, Pindaré-Mirim com 570.587 cabeças, São José de Ribamar com 512.113 cabeças e Balsas com 496.724 cabeças (SAGRIMA, 2018). A cadeia avícola tem apresentado grande dinamismo, passando por significativas mudanças na produção, industrialização, comercialização e consumo em todo o mundo (PESSOA et al., 2012; ABPA, 2018).

A exploração de aves caipiras também é considerada uma importante atividade agropecuária, enraizada na tradição cultural de produtores da agricultura familiar. Requer baixos investimentos, proporciona boa lucratividade e se caracteriza por sua forma de exploração extensiva, assim como práticas de manejo adotadas que não contemplam eficientemente os aspectos reprodutivos, nutricionais e sanitários (SAGRILO, 2003, OLIVEIRA et al., 2009). A criação de aves caipiras tem grande aceitação entre os pequenos produtores, principalmente devido a resistência das aves, por apresentar menores índices de mortalidade e boa produtividade. No caso do sistema de produção da avicultura industrial, o investimento é alto e o risco é considerável. Estes aspectos criam

uma oportunidade comercial, garantindo que a produção caipira ocupe um nicho de mercado deixado pelas empresas avícolas, dando condições e oportunidade ao pequeno produtor de ingressar na atividade avícola com investimentos iniciais bem menores, menores riscos e considerável lucratividade (MELO, 2012).

2.2 Sítios de aves migratórias e sua relação com o transporte de hemossporídeos

A migração é um comportamento que se desenvolveu em todos os grandes grupos taxonômicos de vertebrados. O grupo das aves destaca-se, por sua complexidade nas migrações, podendo ser locais, regionais e intercontinentais. O tempo, as direções e as distâncias são relativamente constantes de ano a ano. Outro tipo de migração é a facultativa, considerada opcional, cujos indivíduos podem migrar em um ano sim e outro não, dependendo da oferta de alimento e condições climáticas do local (RODRIGUES, 2000; NASCIMENTO, 2010; NEWTON, 2011; RODRIGUES, 2015).

O Brasil está localizado na região denominada neotropical, a qual se estende da América Central do México até o ponto mais meridional da América do Sul, Cabo de Los Hornos. As aves da região neotropical ocupam na América do Sul um grande número de nichos ecológicos (CBRO, 2014; IUCN, 2022). Além disso, o território brasileiro apresenta grande diversidade de ecossistemas, possuindo a segunda avifauna mais rica do mundo e participando da rota de várias espécies de aves migratórias, sendo elas: Rota Atlântica, ao longo de toda costa brasileira, do Amapá até o Rio Grande do Sul; Rota Nordeste, iniciando na Baía de São Marcos no Maranhão e no Delta do Parnaíba, divisa entre Maranhão e Piauí, seguindo pelo interior do Nordeste até a costa da Bahia; Rota Brasil Central, na altura da foz do rio Amazonas e arquipélago de Marajó, de onde segue pelos rios Tocantins e Araguaia, passando pelo Brasil Central e atingindo o vale do rio Paraná na altura de São Paulo; Rota Amazônia Central/Pantanal, seguindo dos rios Negro, Branco e Trombetas, passando pela região de Manaus e Santarém, seguindo pelo vale dos rios Madeira e Tapajós, até o Pantanal; e por fim, Rota Amazônia Ocidental, que inicia nos vales dos rios Japurá, Içá, Purus, Juruá e Guaporé, chegando até ao Pantanal (ICMBIO, 2019; DEVELEY, 2021).

A costa brasileira possui grande importância para as aves migratórias, devido a existência de vários sítios ao longo do litoral. Na região nordeste, o estado do Maranhão destaca-se pelas rotas de reentrâncias maranhenses, que correspondem a região que vai da divisa com o Pará até São Luís. É uma região composta por vários igarapés cobertos por manguezais, diversas ilhas e baías, sendo esta região uma área de conservação

ambiental. Os municípios que fazem parte das áreas de Reentrâncias Maranhenses são: Cururupu, Alcântara, São Luís, São José de Ribamar, Cedral, Guimarães, Mirinzal, Bequimão, Luís Domingues, Cândido Mendes, Turiaçu, Godofredo Viana, Cururupu, Bacuri e Carutapera (RODRIGUES, 2007, VALENTE et al., 2011; ICMBIO, 2019).

As aves migratórias podem permanecer em regiões de sítios migratórios por horas ou dias, em busca de alimentos e descanso (FOUCHIER & MUNSTER, 2009; MISHRA et al., 2017). Para esses animais, a migração é um processo que demanda um elevado gasto de energia, o que pode resultar em uma baixa na quantidade de recursos para o animal em gerar uma resposta imune eficaz, e assim, conseqüentemente, ocasionar maiores taxas de infecções parasitárias (WIKELSKI et al., 2003; ALTIZER, BARTEL & HAN, 2011).

As aves são ótimas indicadoras da qualidade ambiental, podendo atuar como organismos sentinelas, devido sua diversidade, estarem amplamente distribuídas e pela realização de migrações de curta e longa distância (GREGORY & STRIEN, 2010; OCHOA, 2014; VALLS et al., 2016; MEKONEN, 2017). Por isso, o seu monitoramento pode fornecer informações sobre ecossistemas, sendo este um mecanismo efetivo para a avaliação da qualidade ambiental (MEKONEN, 2017).

O parasitismo é um parâmetro que influencia na dinâmica e estrutura de comunidades biológicas, atuando como reguladores do tamanho de populações. Ao realizar-se a avaliação de um ecossistema, o parasitismo em aves é considerado, pois podem afetar o comportamento e saúde desses animais, causando impactos na sua fisiologia, sobrevivência e reprodução, exercendo importante pressão ecológica e evolucionária (DASZAK et al., 2000; ATKINSON et al., 2000; VALADÃO et al., 2006).

A ocorrência de parasitoses pode ser utilizada como critério para a avaliação das condições de um ecossistema, assim como do grau de regeneração ambiental. Infecções parasitárias por hemosporídeos é um importante fator que contribui para a perda da biodiversidade e são considerados uma ameaça para as aves, uma vez que estes parasitas podem levar os hospedeiros à morte e em casos mais extremos, a extinção de espécies de aves (PINHO, 2018).

2.3 Hemosporídeos aviários

Os hemosporídeos são protozoários heteróxenos obrigatórios, protistas do filo Apicomplexa e classe Coccidiea. Pertencem a ordem Haemosporida, possuindo as famílias Garniidae, Haemoproteidae, Plasmodiidae e Leucocytozoidae como seus

integrantes. São parasitas sanguíneos, parasitando uma grande gama de hospedeiros. Os principais gêneros que parasitam aves são *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. Possuem como vetores insetos da ordem Diptera, e reproduzem-se de forma sexuada no vetor, sendo estes seus hospedeiros definitivos. As aves atuam como hospedeiros intermediários (VALKIUNAS 2005).

Mosquitos hematófagos da família Culicidae são vetores de *Plasmodium* spp; percevejos e moscas das famílias Ceratopogonidae e Hypoboscidae atuam como vetores do gênero *Haemoproteus* spp.; *Leucocytozoon* spp. possui como vetores moscas negras da família Simuliidae e o mosquito *Culicoides arakawae*, da família Ceratopogonidae (SANTIAGO-ALARCON et al., 2012). Estes parasitas, assim como seus vetores, apresentam uma ampla distribuição mundial, sendo sua ocorrência descrita em diversas espécies de aves em praticamente todo mundo (VALKIUNAS, 2005).

2.4 *Leucocytozoon* spp.

O gênero *Leucocytozoon* pertence reino Protista, filo Apicomplexa, subordem Haemosporina, família Leucocytozoidae. Apresenta dois subgêneros: *Leucocytozoon* e *Akiba*. São transmitidos por insetos dípteros, da família Simuliidae e Ceratopogonidae. O subgênero *Akiba* possui uma única espécie, *Leucocytozoon caulleryi*. (BERMUDEZ, 2003; VANSTREELS & PARSONS, 2014; SEHGAL, 2015).

Já o subgênero *Leucocytozoon* apresenta aproximadamente 143 espécies relatadas em animais (FORRESTER & GREINER, 2008). É um parasita de aves domésticas e silvestres. O nome da doença deriva da crença de que os gametócitos são encontrados apenas nos leucócitos do sangue, mas pesquisas posteriores mostraram que os gametócitos podem ocupar e se desenvolver tanto em eritrócitos quanto em leucócitos (BERMUDEZ, 2003).

2.5 Distribuição geográfica e aspectos epidemiológicos

A prevalência e intensidade de *Leucocytozoon* spp. variam, provavelmente devido a diferenças na suscetibilidade de populações hospedeiras e a características ambientais, que determinam a distribuição de vetores (SOL et al., 2000; MARTÍNEZ-ABRAÍN et al., 2004). São encontrados em praticamente todas regiões geográficas, com exceção da Antártica, e podem parasitar a maioria das espécies de aves (VALKIUNAS, 2005; CLARK et al., 2014; MOENS & PÉREZ-TRIS, 2016).

A ocorrência e diversidade de *Leucocytozoon* spp. são maiores em regiões de clima neotropical e temperado (VALKIUNAS, 2005; FECCHIO et al., 2018), como

evidenciado nas linhagens relatadas da América do Norte e Europa. O continente Africano também possui uma alta diversidade desse gênero (BENSCH et al., 2009; OUTLAW et al., 2017). Relatos sobre a prevalência de hemoparasitos em aves foram realizados nas Americas do Norte (JARVI, et al., 2002; BARNARD et al., 2010), Central (FALLON et al., 2005) e do Sul (DURRANT et al., 2006), Europa (KRONE et al., 2008), Ásia (NAGATA, 2006) e África (BEADELL et al., 2009; LOISEAU et al., 2010). Estudos realizados no Brasil têm demonstrado a grande diversidade destes parasitos em ambientes naturais (BELO et al. 2011; FECCHIO et al. 2013; LACORTE et al. 2013; VILLAR et al. 2013; ROOS et al. 2015).

Diferenças relacionadas a prevalência de hemosporídeos em determinadas regiões podem ser explicadas devido a fatores como resistência das aves ou tolerância à infecção, exposição dos hospedeiros ao vetor e competição entre parasitas. Sendo assim, explicar as causas ecológicas e evolutivas das diferenças em relação a prevalência de hemosporídeos entre espécies de aves e regiões continua sendo um desafio, especialmente devido à falta de informações sobre a infecção deste parasita em seus hospedeiros invertebrados (ROBIN et al., 2015). Todos esses fatores bióticos e abióticos significam que os padrões de transmissão podem variar (SANTIAGO-ALARCON et al. 2012).

2.6 Transmissão e ciclo de vida

A maioria das espécies de *Leucocytosoon* spp. são transmitidos por meio da picada de espécies de moscas negras, da família Simuliidae. Já a espécie *Leucocytozoon caulleryi* é transmitida pela picada do mosquito *Culicoides arakawae*. A transmissão ocorre quando as aves são picadas. Estas são infectadas por esporozoítos de *Leucocytozoon* spp., presentes na saliva do vetor. Para que a transmissão tenha sucesso, o parasita deve estar no estágio de vida correto, a ave deve ser suscetível ao parasita e o vetor deve estar presente no ambiente (AKIBA et al., 1958; AKIBA, 1970)

Após o hospedeiro intermediário ser picado, os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do inseto vetor migram para as células hepáticas, onde irão sofrer múltiplas divisões nucleares, dando origem a uma estrutura chamada citômeros, que quando rompidas, liberam merozoítos e sincícios, que são remanescentes de merontes. O processo ocorre durante o período de 4 a 5 dias (VALKIUNAS & TATJANA, 2017).

Os merozoítos e sincícios são liberados dos hepatócitos para a corrente sanguínea, onde os merozoítos irão parasitar eritrócitos no sangue após 14 dias da inoculação dos esporozoítos. Este estágio é essencial para potencializar a fonte infecciosa inicial. Após

invadirem os eritrócitos, os merozoítos sofrem gametogonia. Ou seja, os merozoítos crescem e se diferenciam em gametócitos, que são infectantes para vetores. Os gametócitos caracterizam-se por causar hipertrofia acentuada na célula e em seu núcleo; o desenvolvimento completo dos gametócitos ocorre em 2 dias e o núcleo do hospedeiro adquire uma forma de taça ou fita (VALKIUNAS, 2005; VALKIUNAS & IEZHOVA, 2018; VALKIUNAS & ATKINSON, 2020).

Os sincícios são transportados pela corrente sanguínea, para diferentes órgãos, como fígado, baço, linfonodos e cérebro, onde são fagocitados por macrófagos e formam megalomerontes. Os megalomerontes possuem milhares de merozoítos, que ao serem liberados, invadem linfócitos e leucócitos, para tornar-se em gametócitos fusiformes. Vários merozoítos liberados pelos megalomerontes são absorvidos por células endoteliais. Estes merozoítos retardam seu desenvolvimento, para depois dar origem a novos megalomerontes, que serão responsáveis pela fase crônica da infecção parasitária (ATKINSON, THOMAS & HUNTER, 2008).

No vetor, o ciclo de vida inicia-se quando o inseto díptero ingere gametócitos ao realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro intermediário infectado. Ao migrar para o estômago do vetor, os gametócitos irão diferenciar-se em macrogametas e microgameta. Durante a transferência do sangue do hospedeiro vertebrado para o vetor, a concentração de oxigênio, dióxido de carbono e temperatura sofrerão alteração, estimulando os gametócitos, iniciando assim a gametogênese (ATKINSON & VAN RIPER III, 1991; VALKIUNAS, 2005; LAHONDERE & LAZZARI, 2013)

Os microgametas sofrem exflagelação e fusionam-se aos macrogametas no intestino médio do inseto, ocorrendo a reprodução sexuada e dando origem aos oocinetos. Estes irão migrar para o epitélio e lâmina basal do intestino, onde formarão os oocistos. Durante o processo de desenvolvimento, cada oocisto irá se multiplicar por esporogonia. Os oocistos após sofrerem maturação, irão romper-se e dar origem a esporozoítos. Estes seguirão para a hemolinfa e então penetrarão nas glândulas salivares do vetor, aguardando o seguimento do ciclo a partir de um novo repasto em um hospedeiro intermediário suscetível. Os esporozoítos são as formas infectantes para as aves e são liberados em pequenas quantidades sempre que o mosquito pica um hospedeiro (RODRIGUEZ & HERNÁNDEZ, 2004; ABRAHAM & JACOBS, 2004; LEVIN II et al., 2011; VANSTREELS & PARSONS, 2014; RIVERO & GANDON, 2018).

2.7 Patogenia

O período pré-patente de infecção por *Leucocytozoon* spp. inicia-se quando o parasita adentra os eritrócitos circulantes, possuindo duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, há um aumento intenso da parasitemia, e quando esta chega ao seu limite máximo, ocorre a fase crônica. Na fase crônica, há estabilização e diminuição da parasitemia, ocorrendo um estágio latente da infecção, onde os parasitas estão ausentes na corrente sanguínea, porém persistem nos órgãos internos, onde se reproduzem de forma assexuada, levando a queda ou aumento temporário da parasitemia. Geralmente ocorrem recidivas da infecção parasitária durante o período de reprodução das aves, sendo este importante para a infecção da prole e manutenção do parasita na natureza (VALKIUNAS 2005; VALKIUNAS & IEZHOVA, 2018; VALKIUNAS & ATKINSON, 2020).

Os hemosporídeos, além de provocarem alterações no sangue devido ao desenvolvimento de alta parasitemia, também causam danos em diversos órgãos. Isso ocorre devido aos danos ocasionados pelos estágios exoeritrocitários, que se desenvolvem em várias células do sistema reticuloendotelial. *Leucocytozoon* spp. podem ser encontrados em diversos órgãos das aves, incluindo coração, fígado, cérebro, olhos, nervos e musculatura esquelética (BRAY, 1957; GARNHAM, 1966; FREVERT et al., 2008).

2.8 Sinais clínicos

A gravidade das infecções parasitárias varia conforme o estado geral do hospedeiro, idade, patogenicidade do agente, grau de exposição e a intensidade da infestação. Os sinais clínicos observados em aves parasitadas por *Leucocytozoon* spp. incluem anemia, prostração, ausência de apetite, anorexia, esplenomegalia, diminuição da produção de ovos ou postura de ovos anormais, diarreia de coloração esverdeada, alterações neurológicas e digestivas, penas eriçadas, e em casos de alta parasitemia, pode levar o animal à morte (ATKINSON, THOMAS & HUNTER, 2008; SAWALE et al. 2018). Em aves jovens, podem ocorrer hemorragias sistêmicas. As taxas de mortalidade são maiores em animais jovem e menores em aves adultas (MIURA et al., 1973; JIN et al. 1976, LEE et al., 2016).

2.9 Diagnóstico

Leucocytozoon spp. pode ser detectado por meio de achados clínicos, hematológicos e histopatológicos. Por microscopia óptica, é possível visualizar suas

formas gametogônicas em amostras de esfregaços sanguíneos, onde é feita a observação de um determinado número de campo microscópico, fornecendo assim uma estimativa do número de parasitas. Também são utilizados vários métodos de coloração, como a de Romanowsky, coloração de Giemsa ou coloração com azul de cresil brilhante (CORDERO, 1999; VALKIUNAS et al., 2008).

As espécies de *Leucocytozoon* spp. podem ser diferenciadas entre si pela morfologia dos gametócitos e células hospedeiras, em esfregaços sanguíneos. Ambos os gêneros *Leucocytozoon* spp. e *Plasmodium* spp., pertencem à ordem Haemosporida e parasitam eritrócitos de aves (BERMUDEZ, 2013). Em infecções ocasionadas por *Plasmodium* spp, tanto nas fases de esquizogonia e gametogonia, é possível realizar a visualização do pigmento malárico, em eritrócitos parasitados. Já nos eritrócitos parasitados por *Leucocytozoon* spp., há a ausência deste pigmento na gametogonia. Assim, o diagnóstico diferencial de *Leucocytozoon* spp. e *Plasmodium* spp. pode ser realizado com base em amostras de esfregaços sanguíneos e nos achados histológicos de aves parasitadas (BERMUDEZ, 2013). O diagnóstico por meio de microscopia óptica pode resultar na subestimação da prevalência parasitária em comparação com os métodos de diagnóstico molecular (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013).

Abordagens moleculares, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem detectar algumas parasitemias perdidas por esfregaços sanguíneos (MERINO et al., 2008). As ferramentas de detecção molecular, associadas as análises genéticas de populações têm sido utilizadas para elucidar processos ecológicos e evolutivos (MANEL & HOLDEREGGER, 2013; PETREN, 2013; ROBIN et al., 2015). A integração destes métodos, aliados a informações epidemiológicas, podem fornecer informações importantes sobre a dinâmica de transmissão de doenças e aspectos epidemiológicos de infecções emergentes (ARCHIE et al., 2009).

O sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) do parasita, de aproximadamente 500 pares de base, é o método molecular mais comum para examinar a prevalência do parasita, suscetibilidade do hospedeiro, diversidade genética e dinâmica evolutiva dos hemosporídeos aviários (HILL et al., 2010; ARGILLA et al., 2013). Os níveis de fluxo gênico podem ajudar a caracterizar a disseminação de fenótipos de importância epidemiológica em populações de parasitas e vetores, e também ajudar a quantificar o risco de invasão de parasitas (SCHWABL et al., 2017). No entanto, falsos negativos não são completamente excluídos por métodos moleculares (GOMEZ-DIAZ et al., 2010).

Os dados genéticos ajudam na conservação biológica, fornecendo dados sobre como os fatores ecológicos afetam a conectividade funcional de parasitas, hospedeiros e vetores em escalas individuais ou populacionais (DHARMARAJAN et al., 2011). As ferramentas genéticas e genômicas ajudam a compreender melhor a transmissão do parasita e a caracterizar aspectos do parasita e do hospedeiro (DECANDIA et al., 2018).

No exame post mortem de aves parasitadas por *Leucocytozoon* spp., é possível visualizar alterações em diversos órgãos. Ocorre hepatomegalia, com múltiplas áreas castanho-claras, vermelhas e escuras; esplenomegalia; congestão pulmonar; derrame pericárdico; presença de hemorragia e espessamento do saco pericárdico; miosite e miodegeneração do músculo esquelético e cardíaco; hemorragia epicárdica; nódulos miliares espessados e hemorragias múltiplas em moela e do músculo cardíaco; e presença de sangue torácico e celômico livre (WALKER & GARNHAM, 1972; PAGE, GREINER & SCHMIDT 1987; FOWLER & FORBES, 1972). No exame histopatológico, é possível visualizar a presença de merozoítos fagocitados em órgãos parenquimatosos; hepatócitos levemente edemaciados e vacuolizados e a presença de megaloesquizontes (WALKER & GARNHAM, 1972; PAGE, GREINER & SCHMIDT, 1987).

2.10 Controle e profilaxia

Para aves domésticas ou criadas em cativeiro, as medidas de prevenção incluem a proteção do recinto contra a entrada do inseto vetor, especialmente nos períodos mais quentes do ano, devido a atividade de repasto sanguíneo ser maior nesta época. Neste período, é recomendado manter as aves em ambientes fechados, protegidos por telas ou redes (ATKINSON, 2008).

Para o controle vetorial, é recomendado realizar a drenagem de águas superficiais, cobertura de grandes recipientes de armazenamento de água com material impenetrável a pequenos insetos, remover habitats aquáticos artificiais e eliminação adequada de resíduos (WILSON et al., 2020). Para aves selvagens, novos animais que forem introduzidos na natureza, recomenda-se a realização exames regulares, para a detecção de possíveis hemoparasitos. Caso positivo, é recomendado realizar o isolamento de indivíduos parasitados (ZWARG, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Verificar a ocorrência de *Leucocytozoon* spp. em frangos caipiras que convivem com aves migratórias na ilha de São Luís, Maranhão, Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Contribuir para identificação de *Leucocytozoon* spp. em frangos caipiras que convivem com aves migratórias na ilha de São Luís, Maranhão
- Determinar a distribuição geográfica da existência de *Leucocytozoon* spp. em frangos caipiras na ilha de São Luís, Maranhão

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Os experimentos conduzidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual do Maranhão, sob o protocolo de nº 34/2020.

4.2 Área de estudo

A pesquisa foi realizada na ilha de São Luís – MA (Figura 1). Apresentando latitude 02° 31' 47" S, longitude 44° 18' 10" W e uma população estimada em 1.115.932 habitantes, São Luís é a cidade mais populosa do estado do Maranhão, possuindo uma área de 831,7 km² e contém quatro municípios: São José de Ribamar, com área de 436,1 km², Paço do Lumiar, com área de 121,4 km² e Raposa, com área de 63,9 km² (IBGE, 2020).

O clima da ilha de São Luís, segundo classificação climática proposta por Köppen, é da categoria AWW', em que A é do tipo tropical úmido com altas temperaturas, W constitui estação seca definida e W' apresenta precipitações acentuadas no verão e outono. O clima é do tipo tropical úmido, com duas estações delimitadas ao longo do ano, uma chuvosa, no período de janeiro a junho e outra seca, no semestre que se estende de julho a dezembro. As temperaturas variam em média entre 23° e 30°C. A amplitude térmica diária é baixa, devido a fatores como baixa latitude e a proximidade com o oceano, fazendo com que não haja uma variação de temperatura entre o dia e a noite (SANTOS, 2020).

FIGURA 1. Municípios integrantes da ilha de São Luís, MA



Fonte: IPEA, 2014

4.3 Amostragem e coleta de material

O tamanho da amostra foi definido utilizando amostragem não probabilística por conveniência. Foram realizadas a coleta de 100 amostras de sangue de frangos caipiras, originados dos quatro municípios que fazem parte da ilha de São Luís - MA. As coletas foram realizadas durante os períodos de clima seco e chuvoso, de março a agosto de 2021. As aves selecionadas eram adultas, criadas em sistema avicultura de subsistência, para o consumo próprio de carne e ovos. Durante as visitas, também foi realizada a avaliação visual de comportamentos e características das criações de aves.

No município de São Luís, as amostras de sangue foram coletadas de animais dos bairros de Pedrinhas (4/100), Vila Maranhão (6/100), Pão de Açúcar (6/100), Cruzeiro do Anil (6/100), e Quebra Pote (6/100). Em São José de Ribamar, os bairros amostrados foram Cidade Nova (6/100), Ponta Verde (4/100), Ponta Vermelha (6/100), Parque Jair (6/100) e Parque Vitória (6/100). No município de Paço do Lumiar, os bairros foram Vassoural (7/100), Alto da Esperança (7/100) e Vila São José (8/100). No município de Raposa, nos bairros Maresia (8/100) e Juçara (8/100).

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção venosa da veia braquial das aves e transferidas para sistema a vácuo (*Vacutainer*[®]) estéril de 4 mL com anticoagulante EDTA, sendo estes devidamente identificados. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo, até a sua chegada ao laboratório de Imunodiagnóstico/UEMA.

Para o processamento das amostras, foi realizada a transferência das mesmas para microtubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml, sendo estes acondicionados em freezer em temperatura de -20° C, para posterior realização das técnicas de diagnóstico molecular.

4.4 Extração do DNA

Para a extração de DNA das amostras de sangue, foi utilizado o kit InstaGene[™] Matrix BioRad, seguindo as orientações do fabricante.

4.5 Diagnóstico Molecular

4.5.1 PCR convencional para o gene endógeno de aves β -actina

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) de 30% (30/100) das amostras para a detecção de um gene endógeno de aves, β -actina, de 136 pares de base. Por meio desta etapa, buscou-se avaliar a eficácia da extração de DNA das amostras de sangue de frangos caipiras. Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores, de acordo com

protocolo descrito por Nascimento et al. (2015). Os iniciadores estão apresentados na Tabela 1.

Foi utilizada uma solução *mastermix* contendo 9µL de *GoTaq® Green Master mix* (Promega, EUA), 1 µL de cada iniciador (5pmol/µL – Invitrogen -ThermoFisher) e 11,5 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA) chegando a um volume final de 25 µL.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores para o gene *β-actina*.

Primer	Sequência	Fragmento
β-actina F	ACCCCAAAGCCAACAGA	136 pb
β-actina R	CCAGAGTCCATCACAATACC	136 pb

F= Forward e R= Reverse

Nascimento et al. (2015)

Como controle negativo, foi utilizado 9 µl *master mix* de reagentes da PCR, acrescido de 11,5 µL de água ultra pura estéril. A reação ocorreu no termociclador modelo SimpliAmp™ Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, EUA) e consistiu-se em uma desnaturação inicial de um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95° C por 10 segundos, 60 ° C por 60 segundos, 72° C por 45 segundos e uma extensão final de 72° C por 10 minutos, amplificando um fragmento de 136 pb. Os produtos da reação foram submetidos a eletroforese de gel agarose 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (3,0 /µL), em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) pH 8,3, por 40 minutos. As bandas amplificadas foram visualizadas em transluminador UV.

4.5.2 Nested PCR para *Leucocytozoon* spp.

O diagnóstico molecular para detecção de *Leucocytozoon* spp. foi realizado por meio da técnica de Nested PCR, para amplificar um fragmento de aproximadamente 500 pares de base do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*), seguindo o protocolo descrito por Hellgreen et al. (2004). Os iniciadores estão apresentados na Tabela 2.

Na primeira reação de amplificação, foram utilizados os primers HaemNFI e HaemNR3. Foi utilizada uma solução *master mix* contendo 9µL de *GoTaq® Green Master mix* (Promega, EUA), 1,5 µL de cada iniciador (Invitrogen ThermoFisher) e 12,5 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA). Como controle negativo, foi utilizado 9 µL *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 12,5 µL de água ultra pura estéril.

Para a segunda reação, foram utilizados os primers HaemFL e HaemR2L. Foi utilizada uma solução *master mix* contendo 9 µL de *Green GoTaq® Green Master mix* (Promega, EUA), 1,5 µL de cada iniciador (Invitrogen ThermoFisher) e 12,5 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 3 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Do produto da primeira reação, foi utilizado 1,5 µL/amostra como molde de DNA da segunda reação (*nested*), utilizando os iniciadores HaemNF e HaemNR2, específicos para *Leucocytozoon* spp. Como controle negativo, foi utilizado 9 µL *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 12,5 µL de água ultra pura estéril (HELLGREEN et al., 2004). As respectivas PCRs foram realizadas separadamente, em volumes de 25 µL. Modificou-se o número de ciclos de amplificação da primeira para a segunda reação, de 30 para 33.

Os produtos obtidos da segunda reação de PCR foram submetidos a eletroforese de gel agarose 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (3,0 /µL), em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) pH 8,3, por 40 minutos. As bandas amplificadas foram visualizadas em transluminador UV.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores para o gene *cytb*.

Primer	Sequência	Fragmento
HaemNFI	CATATATTAAGAGAAITATGGAG	617 pb
HaemNR3	ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC	617 pb
HaemFL	ATGGTGTTTTAGATACTTACATT	480 pb
HaemR2L	CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC	480 pb

Hellgreen et al. (2004)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação do gene β -actina foi avaliada em gel de agarose e submetido a eletroforese, resultando em um fragmento de 136 pares de base. A detecção e amplificação do gene β -actina foi positiva em 24 (80%) das 30 amostras testadas, indicando que a extração de DNA obteve êxito.

Por meio da Nested PCR, foram analisadas 100 amostras de material genético, extraído do sangue de frangos caipiras. Todas as amostras apresentaram resultados negativos para a detecção de *Leucocytozoon* spp. Segundo Fecchio et al. (2018), resultados negativos para a detecção de *Leucocytozoon* spp. já foram publicados em território brasileiro, onde buscou-se detectar os principais gêneros de hemosporídeos aviários, *Plasmodium*, *Hemoproteus* e *Leucocytozoon*. Nestes estudos, foram utilizadas metodologias diferentes da nossa pesquisa. Os trabalhos foram realizados por Fecchio et al. (2011), Sebaio et al. (2012), Roos et al. (2015), Fecchio et al. (2015) e Dias et al. (2016), que verificaram a ausência de *Leucocytozoon* spp. por meio de microscopia óptica. Foram analisadas amostras de esfregaços sanguíneos de diversas espécies aviárias, em estudos realizados nos biomas amazônico, cerrado, pantanal e mata atlântica, nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Amazonas, no Brasil.

De acordo com Zelé et al., (2014), resultados negativos para a detecção de *Leucocytozoon* spp. podem ocorrer em casos de baixa parasitemia, podendo estar associados a baixa virulência e patogenicidade do parasita ou a uma eficiente resposta imune do hospedeiro. O sistema imunológico do hospedeiro adquire resistência à presença do agente parasitário, tolerando a infecção e minimizando os custos derivados da ativação da resposta imune, o que poderia reduzir a eficácia biológica e multiplicação do parasita (RABERG et al. 2007; SORCI, 2013). Devido a estes aspectos, sua detecção por meio da PCR pode ser subestimada (ZELÉ et al., 2014). Em casos de indivíduos que sobrevivem a infecção parasitária e passam a tolerá-la, os hemosporídeos persistem em baixa densidade no organismo do seu hospedeiro (WESTERDAHL et al, 2012) ou ocorre a eliminação da infecção parasitária (SORCI, 2013).

Segundo Valkiunas et al. (2006), embora a Nested PCR seja um método de diagnóstico molecular sensível e possa aumentar a especificidade e rendimento da amplificação do DNA alvo, existem limitações. Como a maioria dos métodos baseados em PCR, esses protocolos podem subestimar infecções mistas de hemosporídeos. Já Freed & Cann (2006), Beadell et al. (2006) afirmam que, caso o número de cópias do

DNA do parasita for baixo, isso pode levar a falsos negativos devido a um molde fraco, o que pode impedir que ocorra a amplificação do fragmento de DNA.

Filho (2014) relatou em seu trabalho a presença de instalações que permitiam o acesso de diversas espécies de aves migratórias aos locais de criação de aves domésticas. Afirmou ainda que a captura de aves migratórias é considerada uma prática comum, onde estas conviviam juntamente com as aves domésticas. Este fato também foi verificado neste estudo (Figura 2), onde foi constatado o acesso de aves, como anuns e pardais, além da criação de outras espécies aviárias como marrecos, patos, galinhas da angola e perus, nos locais de criações de frangos caipiras.

FIGURA 2. Criação de aves domésticas e exóticas, além de instalações que permitiam o acesso de espécies de aves migratórias aos locais de criação de aves, São Luís-MA.



Fonte: Autoria Própria

Tanto os animais domésticos quanto os animais selvagens desempenham um importante papel como reservatórios de parasitas. A migração e introdução passiva de animais pelo ser humano podem alterar padrões epidemiológicos de doenças (POZIO, 2020). As aves migratórias desempenham um papel importante na epidemiologia de hemossporídeos, pois anualmente deslocam-se entre diferentes regiões zoogeográficas, favorecendo a dispersão de parasitas intercontinentalmente (WALDENSTRÖM, 2002; ARAÚJO, 2014). As migrações sazonais de curta e principalmente longa distância, assim como fenômenos regulares realizados por diversas espécies aviárias, entre locais com diferentes condições ecológicas, são considerados comportamentos preponderantes para a transmissão e dispersão de hematozoários (VALKIUNAS, 2005). É importante ressaltar que, para que ocorra a transmissão, é necessário que haja a presença dos insetos vetores

no ambiente, além da existência de ecossistemas favoráveis, para a sua reprodução (FILHO, 2014).

Informações sobre as relações entre hemosporídeos aviários e seus vetores permanecem escassas (KIMURA, DARBRO & HARRINGTON, 2010), assim como o conhecimento sobre os padrões de desenvolvimento de espécies de hemosporídeos e suas linhagens genéticas em vetores (EJIRI et al., 2009; KIM et al., 2009; KIMURA, DARBRO & HARRINGTON, 2010; LAPOINTE et al., 2010; NJABO et al., 2011). Os fatores que causam a escassez de *Leucocytozoon* spp. no território brasileiro ainda não são bem compreendidos (FECCCHIO, 2018). A realização de estudos futuros pode ajudar a determinar o papel dos insetos vetores na dinâmica de transmissão e distribuição de linhagens entre hospedeiros aviários, afim de verificar a competência vetorial (MEDEIROS et al., 2013), buscando padrões de transmissão, hábitos alimentares e interações evolutivas e ecológicas entre vetores e parasita.

Uma vez que as interações hospedeiro e parasita ocorrem em diversos ecossistemas, a prevalência de *Leucocytozoon* spp. tende a variar em escalas espaciais e temporais, devido a diferenças na exposição ambiental ao parasita (BENSCH & AKESSO, 2003), suscetibilidade do hospedeiro ou resistência à infecção em populações aviárias (YOHANNES et al., 2008). Há também um crescente reconhecimento da importância que o controle de vetores pode desempenhar na prevenção de doenças (WILSON et al., 2020).

A ocorrência de resultados negativos é fundamental, para permitir comparações entre estudos. Embora a presença de *Leucocytozoon* spp. não tenha sido identificada neste trabalho, é de suma importância oferecer um manejo sanitário adequado as aves domésticas, assim como realizar a vigilância epidemiológica e monitoramento de aves migratórias e insetos vetores de hemosporídeos aviários, afim de evitar a ocorrência desses hematozoários em criações de aves domésticas.

6. CONCLUSÃO

- Embora a presença de *Leucocytozoon* spp. não tenha sido identificada em frangos caipiras que convivem com aves migratórias na ilha de São Luís, é necessário a realização de estudos futuros, que venham contribuir para determinar a distribuição geográfica do parasito, visto que a ilha faz parte da rota migratória de aves costeiras que podem carrear diversos patógenos, afim de evitar a ocorrência de hemosporídeos nas criações de aves de subsistência.

REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Produção Animal. **Relatório Anual 2018**. Disponível em:<<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2018/10/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em 12 de setembro de 2022.
- ABRAHAM, E. G.; JACOBS-LORENA, M. Mosquito midgut barriers to malaria parasite development. **Insect Biochem Mol Biol.** v.34, n.7, p. 667-71, 2004.
- AKIBA, K. Leucocytozoonosis of chickens. **Natl. Inst. Anim. Health Q.**, V.10, p-131-147, 1970.
- AKIBA, K.; KAWASHIMA, H; INUI, S.; ISHII, S. Studies on *Leucocytozoon* in chickens in Japan. I. Natural infection of *L. caulleryi*. Kachiku eisei shikenjo houkoku. **Bull. Natl. Inst. Anim. Health**, V.34, p-163-180, 1958.
- ALTIZER, S.; BARTEL, R.; HAN, B. A. Animal migration and infectious disease risk. **Science**.v.331, n.6015, p.296-302, 2011.
- ARAÚJO, F. A. A. Febre do Nilo Ocidental. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**, Editores. 2ª ed. São Paulo: Roca; p. 1250-61, 2014.
- ARCHIE, E.A.; LUIKART, G.; EZENWA, V.O. Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. **Trends Ecol. Evol.** 24, 21–30, 2009.
- ARGILLA, L. S.; HOWE, L.; GARTRELL, D.; ALLEY, M. R. High prevalence of *Leucocytozoon* spp. in the endangered yellow-eyed penguin (*Megadyptes antipodes*) in the sub-Antarctic regions of New Zealand. **Parasitology**, v.140, p.672–682, 2013.
- ATKINSON C. T. Avian malaria. In: Atkinson NJ, Thomas NJ, Hunter DB, eds. **Parasitic diseases of wild birds**. Iowa: Wiley-Blackwell, 35–53, 2008.
- ATKINSON, C. T., THOMAS, N. J., & HUNTER, D. B. **Parasitic diseases of wild birds**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008.
- ATKINSON, C.; DUSEK, R. J.; WOODS, K. L.; IKO, W. M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 2, p. 197-201, 2000.

ATKINSON, C.T.; VAN-RIPER-III C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M. **Bird-parasite interactions: ecology, evolution, and behaviour**. Oxford: Oxford University Press, p. 19-48, 1991.

BARNARD, W. H.; METTKE-HOFMANN, C.; MATSUOKA, S. M. Prevalence of hematozoa infections among breeding and wintering rusty blackbirds. **The Condor**. n.112, n.4, p.849-853, 2010.

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

BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; COVAS, R.; MELO, M.; WARREN, B. H.; ATKINSON, C. T.; Bensch, S.; Graves, G. R.; Jhala, Y. V.; Peirce, M. A.; Rahmani, A. R.; Fonseca, D. M. Fleischer, R. C. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. **Proc Royal Soc B**, v.273, p.2935–2944, 2006.

BELO, N. O.; PINHEIRO, R. T.; REIS, E. S.; RICKLEFS, R. E.; BRAGA, E. M. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. **PLoS ONE**, v.6, p-e17654, 2011.

BENSCH, S.; AKESSON, S. Temporal and spatial variation of haemoprotozoans in Scandinavian willow warblers. **J Parasitol**. v.89, p.388–391, 2003.

BERMUDEZ, A. J. Miscellaneous and sporadic protozoal infections. **Diseases of poultry**, 13th edition, eds. Swayne, D. E., Wiley-Blackwell, Ames, USA, p.1182-1194, 2013.

BERMÚDEZ, A. Miscellaneous and Sporadic Protozoal Infections. In: **Diseases of Poultry**. 11 th Ed. Y.M. Saif; C.W. H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne. Iowa State. University Press. Ames, p-1010-1013, 2003.

BRAY, R S. Studies on the exo-erythrocytic cycle in the genus *Plasmodium*. **Mem. Lond. Sch. Hyg. Trop. Med**. v.12, n1, p–92., 1957.

CALLISTO, M.; GONCALVES, J. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**. v.31, n.182, p. 68 – 71, 2002.

CBRO - Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Lista das aves do Brasil**. Rio de Janeiro: CBRO; 2014. Disponível em <http://www.cbro.org.br/wp-content/uploads/2020/06/avesbrasil_2014jan1.pdf>. Acesso em 12 de setembro de 2022.

CLARK, L.; HALL, J. Avian Influenza in Wild Birds: Status as Reservoirs, and Risks to Humans and Agriculture. **Ornithological Monographs**, 60, 3–29, 2006.

CLARK, N. J.; CLEGG, S. M.; LIMA, M. R. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. **Int. J. Parasitol.** v.44, p.329–38, 2014.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. **Parasitología Veterinaria**. Ed. 1°. Editorial Interamericana. España, p. 816, 1999.

COSTA, L. S.; GARCIA, L. A. F.; BRENE, P. R. A. Indústria de frango de corte no mundo e no Brasil e a participação da indústria avícola paranaense neste complexo. **Ciências Sociais em Perspectiva**, v. 14, n. 27, p. 319-341. 2015.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 1, p. 443-448, 2000.

DECANDIA, A. L.; DOBSON, A. P.; VONHOLDT, B. M. Toward an integrative molecular approach to wildlife disease. **Conserv. Biol.** v.32, p.798–807, 2018

DEVELEY, P. F. Bird Conservation in Brazil: Challenges and practical solutions for a key megadiverse country. **Perspective in Ecology and Evolution**. v. 19, n. 2, p.171-178, 2021.

DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; TOMAR, S. Pathogens transmitted by migratory birds: threat perceptions to poultry health and production. **Int. J. Poultry Sci.**, v.7, n.6, p.516-525, 2008

DHARMARAJAN, G., BEASLEY, J.C., RHODES, O.E. Heterozygote deficiencies in parasite populations: an evaluation of interrelated hypotheses in the raccoon tick, *Ixodes texanus*. **Heredity**, v.106, p.253–260, 2011.

DIAS, R.; MANICA, I., L. T.; GRESSLER, D.; BELL, J. A.; FECCHIO, A. Plumage coloration, body condition, and immunological status in Yellow-billed Cardinals (*Paroaria capitata*). **Ethology Ecology & Evolution**, v.28, p.462–476, 2016.

DURRANT, K. L.; BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; GRAVES, G. R.; OLSON, S. L.; GERING, E.; PEIRCE, M. A.; MILENSKY, C. M.; SCHMIDT, B. K.; GEBHARD, C.; FLEISCHER, R. Avian hematozoa in south america: a comparison of temperate and tropical zones. **Ornithological Monographs**, v.60, p. 98-111, 2006.

EJIRI, H.; SATO, Y.; SAWAI, R.; SASAKI, E.; MATSUMOTO, R.; UEDA, M.; HIGA, Y.; TSUDA, Y.; OMORI, S.; MURATA, K.; YUKAWA, M. Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. **Parasitology Research**. v. 105, p. 629–633, 2009.

EZENWA, V. O.; GHAI, R. R.; MCKAY, A. F.; WILLIAMS, A. E.; Group living and pathogen infection revisited. **Curr. Opin. Behav. Sci.** v.12, p.66–72, 2016.

FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. v.165, n.4, **The American Naturalist**, p.466-480, 2005.

FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; SILVEIRA, P.; RIBAS, A. C. A.; CAPARROZ, R.; MARINI, M. A. Age, but not sex and seasonality, influence Haemosporida prevalence in Whitebanded Tanagers (*Neothraupis fasciata*) from central Brazil. **Canadian Journal of Zoology**, v.93, p.71–77, 2015.

FECCHIO, A.; LIMA, M. R.; SVENSSON-COELHO, M.; MARINI, M. A.; RICKLEFS, R. E. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. **Parasitology**, v.140, p.181–192, 2013.

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

FECCHIO, A.; SILVEIRA, P.; WECKSTEIN, J. D.; DISPOTO, J. H.; ANCIAES, M.; BOSHOLN, M.; TKACH, V.V.; BELL, J.A. First Record of *Leucocytozoon* (Haemosporida: Leucocytozoidae) in Amazonia: Evidence for Rarity in Neotropical

Lowlands or Lack of Sampling for This Parasite Genus? **J. Parasitol.** v.104, p.168–172, 2018.

FILHO, J. B. S. Ecobiologia de hemosporídeos em aves silvestres coabitando com aves domésticas em povoados adjacentes ao sítio migratório de Panaquatira Município de São José de Ribamar. **Dissertação de Mestrado**. Curso de Pós-Graduação em Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão. 89 f, 2014.

FORREST, J.; MILLER-RUSHING, A. J. Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution *Phil. Trans. R. Soc.* v. B3653101, p.3112, 2010.

FORRESTER, D. J.; GREINER, E. C. Leucocytozoonosis. In: Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB. **Parasitic diseases of wild birds**. Ames: Wiley- Blackwell, p. 54-107, 2008.

FOUCHIER, R.A.M.; MUNSTER, V.J. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. **Rev Sci Tech**, v. 28, n. 1, p. 49–58, 2009.

FOWLER, N.G.; FORBES, G. B. Correspondence - Aberrant Leucocytozoon Infection in Parakeets, **Vet. Rec.**, v.91, p.345-346, 1972.

FREED, L. A.; CANN, R. L. DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: a review. **Condor**. v.108, p.460–474, 2006.

FREVERT, U.; SPÄTH, G. F.; YEE, H. Exoerythrocytic development of *Plasmodium gallinaceum* in the White Leghorn chicken. **Int. J. Parasitol**; v.38, n.655, p-72, 2008

GALEN, S. C.; WITT, C. C. Diverse avian malaria and other haemosporidian parasites in Andean house wrens: Evidence for regional co-diversification by host-switching. *Journal of Avian Biology*. **Journal of Avian Biology** v.45, p.001–013, 2014.

GALVÃO, J. G. B. G.; BENTO, E. F.; SOUZA, A. F. Diagnóstico da realidade dos criatórios de aves na comunidade base física – Ipanguaçu/RN. **Holos**, Natal, v. 4, p. 120-126, 2009.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other haemosporidia**. Blackwell Scientific, 1966.

GOMEZ-DIAZ, E.; JR-DOHERTY, P. F.; DUNEAU, D.; MCCOY, K. D. Cryptic vector divergence masks vector-specific patterns of infection: na example from the marine cycle of Lyme borreliosis. **Evol Appl** v.3, p.391–401, 2010.

GONZÁLEZ, C. R.; LLANOS, L. Dípteros (Insecta: Diptera) en la Cordillera de la Costa centro-sur de Chile: una mirada a su diversidad. **Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile**, Editorial Universidad de Los Lagos, p. 101-124., 2019

GREGORY, R. D.; STRIEN, A. Wild bird indicators: Using composite population trends of birds as measures of environmental health. **Ornithological Science**, v. 9, n. 1, p. 3–22, 2010.

HANGUI, S. Granulomatous myositis by *Leucocytozoon* in broiler. **J. Jpn. Soc. Poult. Dis.**, v. 50, p-93, 2014.

HELLGREN, O.; WALDENSTROM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **J Parasitol.** v.90, n.4, p.797-802, 2004.

HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; VILLEGAS, P.; JIMENEZ, C.; HERNANDEZ-DIVERS, S. J.; GARCIA, M.; RIBLET, S. M.; CARROLL, C. R.; O'CONNOR, B. M.; WEBB, J. L.; YABSLEY, M. J.; WILLIAMS, S. M.; SANCHEZ, S. Backyard chicken flocks pose a disease risk for neotropical birds in Costa Rica. **Avian Dis.**; v.52, n.4, p.558-566, 2008.

HERNANDEZ-LARA, C.; GONZALEZ-GARCIA, F.; SANTIAGO-ALARCON, D. Spatial and seasonal variation of avian malaria infections in five different land use types within a Neotropical montane forest matrix. **Landsc. Urban Plan.** v.157, p. 151–160, 2017.

HERRERA, J.; NUNN, C. L. Behavioural ecology and infectious disease: Implications for conservation of biodiversity. **B Biol. Sci.** v. 374, n.1781, p. 1471-2970, 2019.

HILL, A. G.; HOWE, L.; GARTRELL, B. D.; ALLEY, M. R. Prevalence of *Leucocytozoon* spp, in the endangered yellow-eyed penguin *Megadyptes antipodes*. **Parasitology** v.137, p.1477–1485, 2010.

HOLT, E. A.; MILLER, S. W. Bioindicators Using Organisms to Measure Environmental Impacts. Learn Science at Scitable. **Nature Education Knowledge**. v. 3, n. 10, 2011.

HORTA, R. S. ; MARQUES, M. V. R. ; MARTINS, N.R.S. ; RESENDE, J.S. ; VILELA, D. A. R. ; COSTA, M. P. ; CARVALHAES, A. G. ; GOMES A. M. ; ANDRADE, E. A. G. ; ECCO, R. Ocorrência de hemoparasitos em aves selvagens no Centro de Triagem de Animais Silvestres. In: CONGRESSO, XI e ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, XVII, 2008, Belo Horizonte. **Anais. Belo Horizonte: Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do IBAMA**, p.117-120, 2008.

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **J Wild Dis**, v.40, n. 4, p.639-659; 2004.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades IBGE**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/sao-luis/panorama>>. Acesso em: 04/09/2022

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO E BIODIVERSIDADE. ICMBIO. **Relatório anual de rotas e áreas de concentração de aves migratórias no Brasil**. Cabedelo, PB: CEMAVE/ ICMBio. 2016. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/DCOM_Miolo_Rotas_Migrat%C3%B3rias_2016_final.pdf. Acesso em: 04 de setembro de 2022.

IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. **The IUCN red list of threatened species**. Disponível em:<<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 12 de setembro de 2022.

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

JIN, K.; HOMMA, S.; OMI, Y. Occurrence of leucocytozoonosis in southern part of Hokkaido.. **J. Jpn. Soc. Poult. Dis**. v.12, p.93-96, 1976.

JOHNSON, P. T. J.; ROHR, J. R.; HOVERMAN, J. T.; KELLERMANN, E.; BOWERMAN, J.; LUNDE, K. B. Living fast and dying of infection: Host life history

drives interspecific variation in infection and disease risk. **Ecol. Lett.** v.15, p.235–242, 2012.

KIM, K. S.; TSUDA, Y.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, M.; HIROTA, Y. Mosquito blood-meal analysis for avian malaria study in wild bird communities: Laboratory verification and application to *Culex sasai* (Diptera: Culicidae) collected in Tokyo, Japan. **Parasitology Research.** v. 105, p.1351–1357, 2009.

KIMURA M.; DARBRO, J. M.; HARRINGTON, L. C. Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. **Journal of Parasitology.** Vol. 96: 144–51, 2010.

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

LACORTE, G. A.; FELIX, G. M. F.; PINHEIRO, R. R. B.; CHAVES, A. V.; ALMEIDA-NETO, G.; NEVES, F. S.; LEITE, L. O.; SANTOS, F. R.; BRAGA, E. M. Exploring the diversity and distribution of Neotropical avian malaria parasites – A molecular survey from Southeast Brazil. G Snounou, Ed. **PLoS ONE.** v.8, p-e57770, 2013.

LAHONDERE, C.; LAZZARI, C. R. Thermal stress and thermoregulation during feeding in *Anopheles* mosquitoes. In: Manguin S. **New insights into malaria vectors.** InTech. 2013.

LAPOINTE, D. A.; GOFF, M. L.; ATKINSON, C. T. Thermal constraints to the sporogonic development and altitudinal distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawaii. **J Parasitol.** v.96, n.318–324, 2010.

LEE, H. R.; KOO, B. S.; JEON, E. O.; HAN, E. O.; MIN, K. C.; LEE, S. B.; BAE, Y.; MO, I. P. Pathology and molecular characterization of recent *Leucocytozoon caulleryi* cases in layer flocks. **J. Biomed. Res.**, v.30, p-517-524, 2016.

LEVIN II; VALKIUNAS, G.; SANTIAGO-ALARCON, D.; CRUZ, L. L.; IEZHOVA, T. A.; O'BRIEN, S. L.; HAILER, F.; DEARBORN, D.; SCHREIBER, E. A.; FLEISCHER, R. C.; RICKLEFS, R. E.; PARKER, P. G. Hippoboscids-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. **Int J Parasitol.** v.41, n.10, p.1019, 2011.

LOISEAU, C.; IEZHOVA, T.; VALKIUNAS, G.; CHASAR, A.; HUTCHINSON, A.; BUERMANN, W.; SMITH, T. B.; SEHGAL, R. N. M. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in african rainforest bird species. **Journal of Parasitology**, v.96, n.1, p.21-29, 2010.

LOTTA, I. A.; PACHECO, M. A.; ESCALANTE, A. A.; GONZÁLEZ, A. D.; MANTILLA, J. S.; MONCADA, L. I.; ADLER, P. H.; MATTA, N. E. *Leucocytozoon* Diversity and Possible Vectors in the Neotropical highlands of Colombia. **Protist**. v.167n.2, p.185-204, 2016.

LUTZ, H. L.; HOCHACHKA, W. M.; ENGEL, J. I.; BELL, J. A.; TKACH, V. V.; BATES, J. M.; HACKETT, S. J.; WECKSTEIN, J. D. Parasite prevalence corresponds to host life history in a diverse assemblage of afrotrropical birds and haemosporidian parasites. – **PLoS One**, v.10, p.e0121254, 2015.

MANEL, S.; HOLDEREGGER, R. Ten years of landscape genetics. **Trends Ecol. Evol.** v.28, p.614–621, 2013.

MANUEL, M. F. Further studies on *Leucocytozoon caulleryi* in domestic fowls in the Philippines. **Avian Dis.**, v.13, p.280-287, 1969.

MARTÍNEZ-ABRAIN, A.; ESPARZA, B.; ORO, D. Lack of blood parasites in bird species: does absence of blood parasite vectors explain it all? **Ardeola** v.5, p.225–232, 2004.

MEDEIROS, M. C.; HAMER, G. L.; RICKLEFS, R. E. Host compatibility rather than vector-host-encounter rate determines the host range of avian Plasmodium parasites. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v.280, p-20122947, 2013.

MEKONEN, S. Birds as Biodiversity and Environmental Indicator. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 7, n. 21, 2017.

MELO, S. S. Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte Label Rouge criados em aviários móveis. **Dissertação de Mestrado**. Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais. 55 f, 2012.

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

MISHRA, A.; VIJAYAKUMAR, P.; RAUT, A. A. Emerging avian influenza infections: Current understanding of innate immune response and molecular pathogenesis. **Int. Rev Immunol.** v. 36, n. 2, p.89-107, 2017.

MIURA, S.; OSHIMA, K.; ITAKURA, C.; YAMAGIWA, S. A histopathological study on leucocytozoonosis in young hens. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 35, p.175-181, 1973.

MOENS, M. A.; PEREZ-TRIS, J. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. **Int. J. Parasitol.** v.46, p.41–49, 2016.

NAGATA, H. Reevaluation of the prevalence of blood parasites in Japanese Passerines by using PCR based molecular diagnostics. **Ornithological Science**, v.5, p.105–112, 2006.

NASCIMENTO, A. F. F. Seasonal abundance of nearctic shorebirds in the Gulf of Maranhão, Brazil. *Journal of Field Ornithology*, n. 71, p.665-675, 2000.

NASCIMENTO, C. S.; BARBOSA, L. T.; BRITO, C.; FERNANDES, R. P. M.; MANN, R. S.; PINTO, A. P. G. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, n. 10, v.5, p.e0127935, 2015.

NEWTON, I. The ecology of bird migration patterns. BOU Proceedings – **The Ecology and Conservation of Migratory Birds**; Leicester; Reino Unido. Proceedings. Leicester; Reino Unido: 2011.

NJABO, K. Y.; CORNEL, A. J.; BONNEAUD, C.; TOFFELMIER, E.; SEHGAL, R. N.; VALKIŪNAS, G.; RUSSELL, A. F.; SMITH, T. B. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasites associations in a central African rainforest. **Molecular Ecology**. v. 20, p.1049–1061, 2011.

OCHOA, E. P. Aves silvestres como bioindicadores de contaminación ambiental y metales pesados”. **CES Salud Pública**, v. 5, n. 1, p. 59-69, 2014.

OLIVEIRA, I. M. M. Características da carcaça de frangos de corte criados em diferentes materiais de cama aviária. In: **Congresso Latino Americano de Iniciação Científica**, João Pessoa, PB. Anais. Paraíba: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

OUTLAW, D.; HARVEY, J.; DROVETSKI, S.; VOELKER, G. Diversity and distribution of avian haemosporidians in sub-Saharan Africa: An inter-regional biogeographic overview. **Parasitology** v.144, p.394–402, 2017.

PAAIJMANS, K.P., HEINIG, R.L., SELIGA, R.A., BLANFORD, J.I., BLANFORD, S., MURDOCK, C.C., THOMAS, M.B., 2013. Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. **Glob. Chang. Biol.** v.19, n. 8, p. 2373-2380, 2013.

PAAIJMANS, K.P., IMBAHALE, S. S., THOMAS, M. B., TAKKEN, W. Relevant microclimate for determining the development rate of malaria mosquitoes and possible implications of climate change. **Malar. J.** v.9, p-196, 2010.

PAGE, C.D.; ATKINSON, E. C.; SCHMIDT, R. E. (1987). Leucocytozoonosis in Crested Oropendolas (*Psaracolius decumanus*), **AAV Today**, v.1, n.4, p.155-157, 1987.

PARHAM, P. E., WALDOCK, J.; CHRISTOPHIDES, G. K.; HEMMING, D.; AGUSTO, F.; EVANS, K. J.; FEFFERMAN, N. H.; GAFF, H.; GUMEL, A.; LADEAU, S.; LENHART, S.; MICKENS, R. E.; NAUMOVA, E. N.; OSTFELD, R. S.; READY, P. D.; THOMAS, M. B.; VELASCO-HERNANDEZ, J.; MICHAEL, E. Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. **Philos. Trans. R. Soc. B**, v.370, p-20130551, 2015.

PEDROSA, K. Y. F.; JUNIOR, G. M. A.; BEZERRA, D. C; COIMBRA, V. C. S.; BEZERRA, N. P. C.; IMPROTA, C. T. R. Characterizing the subsistence poultry breeding around a poultry matrix farm in Balsas county, Maranhão state, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 13, p. 147-152, 2019.

PERKINS, S. L., Malaria’s many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. **J. Parasitol.** v.100, p.11–25, 2014.

PESSOA, G. B. S.; TAVERNARI, F. C.; VIEIRA, R. A.; ALBINO, L. F. T. Novos conceitos em nutrição de aves. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 755-774. 2012.

PETREN, K. The evolution of landscape genetics. **Evolution**, v.67, p.3383–3385, 2013.

PINHO, I. F. Taxonomia e ecologia de coccídios de aves silvestres do Sudeste Brasileiro: Coccídios de sabiás (Passeriformes: Turdidae) no Parque Nacional do Itatiaia, RJ. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 68 f., 2018.

POZIO, E. How globalization and climate change could affect foodborne parasites, **Experimental Parasitology**, v.208, p.107807, 2020.

RABERG, L.; SIM, D.; READ, A. F. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. **Science**. v.318, n.5851, p.812-814, 2007.

REED, K. D. MEECE, J. K.; HENKEL, J. S; SHUKLA, S. K. Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. **Clinical Medicine & Research**, v. 1, n. 1, p. 5–12, 2003.

RIBEIRO, P. V. A. ; BAESSE, C. Q. ; TOLENTINO, V. C. M. ; SILVA, A. M.; FERREIRA, G. A. ; PANIAGO, L. P. M. ; SILVA, A. A. ; CUNHA, M. J. R. ; MELO, C. ; CURY, M. C. Ocorrência de hemoparasitos em aves silvestres de fragmentos florestais da microrregião de Uberlândia, MG. In: ENCONTRO SOBRE ANIMAIS SELVAGENS, VII e SIMPÓSIO SOBRE MEDICINA E CONSERVAÇÃO DA FAUNA DO CERRADO, II. Uberlândia. **Anais Uberlândia**. p. 181-185, 2014.

RIVERO, A., GANDON, S. Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. **Trends Parasitol**. v.34, p.712–726, 2018.

ROBIN, V.V.; VISHNUDAS, C.K.; GUPTA, P.; RAMAKRISHNAN, U. Deep and wide valleys drive nested phylogeographic patterns across a montane bird community. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* v.282, p-20150861, 2015.

RODRIGUES, A. A. F. Priority areas for conservation of migratory birds and resident waterbirds on the coast of Brazilian Amazonia. **Revista Brasileira de Ornitologia**. v. 15, n. 2, p.209-218, 2007.

RODRIGUES, A. A. F. Seasonal abundance of nearctic shorebirds in the Gulf of Maranhão, Brazil. **Journal of Field Ornithology**, v.71, n.4, p. 665-675, 2000.

RODRIGUES, R. C. Variação da composição corporal de Charadriiformes na costa Norte/Nordeste do Brasil: uma adaptação para migração. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

RODRIGUEZ, M. H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. L. Insect-malaria parasites interactions: the salivary gland. **Insect Biochem Mol Biol**. v. 34, n.7, p. 615-624, 2004.

ROOS, F. L.; BELO, N. O.; SILVEIRA, P.; BRAGA, E. M. Prevalence and diversity of avian malaria parasites in migratory Black Skimmers (*Rynchops niger*, Laridae, Charadriiformes) from the Brazilian Amazon Basin. **Parasitol. Res**. v.114, p.3903–3911, 2015.

SAGRIMA - SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Perfil da Agropecuária Maranhense**, 2019. Disponível em:<<https://sigite.sagrima.ma.gov.br/wp-content/uploads/2020/04/Perfil-da-Agropecu%C3%A1ria-Maranhense-2018-1.pdf>>. Acesso em: 12 de setembro de 2022.

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

SANTOS, L. E. N. **Caracterização sócio-ambiental de São Luís-MA**. Disponível em <https://www.agenciasaoluis.com.br/midias/anexos/2241_2228_caracterizacao_socioambiental_de_sao_luis.pdf>. Acesso em: 04/09/2022.

SAWALE, G. K.; DHAYGUDE, V. S.; MOREGAONKAR, S. D. Outbreak of leucocytozoonosis in layer birds. **Indian Vet. J.**, v.95, p. 42-44, 2018.

SCHERER, A.L.; SCHERER, J.F.M.; PETRY, M.V.; SANDER, M. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in southern Brazil. **Brasilian J Ornit.**, v. 1, p. 74-79, 2011.

SCHWABL, P.; LLEWELLYN, M.; LANDGUTH, E.L.; ANDERSSON, B.; KITRON, U.; COSTALES, J.A.; OCAÑA, S.; GRIJALVA, M.J. Prediction and prevention of parasitic diseases using a landscape genomics framework. **Trends Parasitol.** v.33, p.264–275, 2017.

SEBAIO, F., BRAGA, E. M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M. A. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic forest. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.21, p.7–15, 2012.

SOL, D; JOVANI, R; TORRES, J. Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. **Ecography** v.23, p.307–314, 2000.

SORCI, G. Immunity, resistance and tolerance in bird–parasite interactions. **Parasite Immunol**, v.35, p.350-361, 2013.

TELFORD, S. Hemoparasites of the Reptilia : color atlas and text. **CRC Press**, 2009.

VALADÃO, R. M; MARÇAL JÚNIOR, O.; FRANCHIN, A. G. A avifauna no parque municipal santa Luzia, zona urbana de Uberlândia, Minas Gerais. **Bioscience Journal**, v. 22, n. 2, p. 97-108, 2006.

VALENTE, R. D. M.; SILVA, J. M. C; STRAUBE, F. C.; NASCIMENTO, J. L. X. Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil. 1ª Ed. Belém: **Conservação Internacional** – CI-Brasil,. 400 p, 2011.

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

VALKIUNAS, G.; ATKINSON, C.T. Introduction to Life Cycles, Taxonomy, Distribution, and Basic Research Techniques. **Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics**. Springer: Cham, Switzerland, p. 45–80, 2020

VALKIUNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENE, A.; HELLGREN, O.; BOLSHAKOV, C. V. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. **J. Parasitol.** v.92, p.418–422, 2006.

VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Keys to the avian malaria parasites. **Malar. J.**, n. 17, p-212, 2018.

VALKIUNAS, G.; TATJANA, A. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. **Malaria Journal**, v.1, p.24, 2017.

VALKIUNAS, G.; ZEHTINDJIEV, P.; DIMITROV, D.; KRIZANAUSKIENE, A.; IEZHOVA, T. A.; BENSCH, S. Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium (Huffia) elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1185–1193, 2008.

VALLS, F. C. L.; ROSSI, L. C. R.; SANTOS, M. F. B.; PETRY, M. V. Comparative analysis of bird community in Atlantic forest areas in southern Brazil. **Oecologia Australis**, v. 20, n. 4, p. 477–491, 2016.

VANSTREELS, R. E; PARSONS, N. J. Malária aviária e outras hemsporidioses aviárias. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca; p. 1427-43, 2014.

VAN-WETTERE, A. J. Leucocytozoonosis in poultry. **MSD Veterinary manual 11th edition**, 2020. Disponível em: < <https://www.msddvetmanual.com/poultry/bloodborne-organisms/leucocytozoonosis-in-poultry>>. Acesso em 19 de julho de 2022.

VILLAR, C. M.; BRYAN, A. L.; LANCE, S. L.; BRAGA, E. M.; CONGRAINS, C.; DEL LAMA, S. N. Blood parasites in nestlings of wood stork populations from three regions of the American continent. **J. Parasitol.** v. 99, p.522–527, 2013.

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

WALKER, D.; GARNHAM, P. C. C. Aberrant Leucocytozoon Infection in Parakeets, **Vet. Rec.**, v.91, p.70- 72, 1972.

WESTERDAHL, H.; ASGHAR, M.; HASSELQUIST, D.; BENSCH, S. Quantitative disease resistance: To better understand parasite-mediated selection on major

histocompatibility complex. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** v.279, p.577-584, 2012.

WIKELSKI, M; TARLOW, E. M.; RAIM, A.; DIEHL, R. H.; LARKIN, R. P.; VISSER, G. H. Avian metabolism: Costs of migration in free-flying songbirds. **Nature**. v.423, n.6941, p.704, 2003.

WILSON, A. L.; COURTENAY, O.; KELLY-HOPE, L. A.; SCOTT, T. W.; TAKKEN, W.; TORR, S. J.; LINDSEY, S. W. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. **PLoS Negl Trop Dis** v.14, n.1, p.e0007831, 2020.

YOHANNES E.; HANSSON, B.; LEE, R. W.; WALDENSTRÖM, J.; WESTERDAHL, H.; AKESSON, M.; HASSELQUIST, D.; BENSCH, S. Isotope signatures in winter moulted feathers predict malária prevalence in a breeding avian host. **Oecologia**. v.158, p.299–306, 2008.

ZÉLÉ, F.; VÉZILIER, J.; L'AMBERT, G.; NICOT, A.; GANDON, S.; RIVERO, A.; DURON, O. Dynamics of prevalence and diversity of avian malaria infections in wild *Culex pipiens* mosquitoes: The effects of *Wolbachia*, filarial nematodes and insecticide resistance. **Parasites & Vectors**, v.7, p.1-16, 2014.

ZWARG, T. Hematologia, Pesquisa de hemoparasitos e mensuração da atividade de colinesterase plasmática em Falconiformes e Strigiformes do Estado de São Paulo, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.