



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM
AGROPECUÁRIA – PPGCTIA

PROGRAMA BINACIONAL DE DOUTORADO - CENTROS ASSOCIADOS
BRASIL/ARGENTINA

PROJETO DE DOUTORADO

A INFLUÊNCIA DA ALTITUDE, COBERTURA VEGETAL E USO DO SOLO NO ESTADO DE
ESTRESSE E NA DIVERSIDADE E DENSIDADE DE COCCÍDIOS DE AVES SILVESTRES NA
REGIÃO DO MÉDIO PARAÍBA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Candidata:

Carla Maronezi

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Pereira Beto

Co-orientador:

Prof. Dr. Sergio Thode Filho

Seropédica

2019

1. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Este projeto visa identificar e quantificar coccídios de aves silvestres capturadas na região na Região do Médio Paraíba, RJ, correlacionando-os com os níveis de corticosterona (cortisol) e com características ambientais como o estado de preservação, uso do solo para agricultura, pecuária, altitude, além de outras informações ecológicas. Desta forma, pretende-se estabelecer padrões de diversidade e distribuição dos coccídios associados ao estado de estresse e características dos habitats das aves.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Avaliar o estado das aves silvestres de diferentes localidades na Região do Médio Paraíba, RJ, por meio de observação e registro de dados ecológicos, biológicos e biométricos.
- Estimar o estresse das aves silvestres através da detecção dos níveis de corticosterona de penas, o qual é amplamente reconhecido como um biomarcador de estresse ambiental.
- Verificar e determinar a prevalência de coccídios nas amostras fecais das aves silvestres.
- Quantificar coccídios por OoPD (oocistos por defecação) conferindo as densidades.
- Analisar a morfologia e morfometria dos oocistos identificando espécies e/ou morfotipos.
- Extrair o DNA de oocistos isolados e amplificar e sequenciar genes específicos.
- Descrever novas espécies e/ou novos hospedeiros.
- Elaborar análises filogenéticas visando observar monofilias, parafilias e/ou polifilias associadas à atributos morfológicos, biológicos e/ou ecológicos dos coccídios.
- Avaliar de que forma as características ambientais (estado de preservação; uso do solo para agricultura, pecuária, urbanização, etc.; altitude, microclima, sazonalidade, etc.) das aves hospedeiras podem estar correlacionadas com o estresse e com a distribuição das espécies de coccídios, suas densidades e morfologia e morfometria dos oocistos.

2. HIPÓTESE

O desflorestamento para agricultura, pecuária e urbanização, queimadas, e outros impactos antrópicos, além da altitude, estações do ano, períodos de seca e chuva, etc. poderão influenciar no estado de estresse das aves silvestres e, conseqüentemente, na distribuição e densidade de suas respectivas espécies de coccídios e nas morfologia e morfometria dos oocistos. Desta forma, espécies distintas, genótipos, padrões morfométricos e/ou morfológicos dos oocistos, e densidades serão associadas a determinadas características ecológicas, biológicas e biométricas das aves. Conseqüentemente, as identificações e/ou elevadas densidades em determinada família, espécie ameaçada/endêmica ou aves em determinado ambiente poderão orientar ou priorizar a conservação de determinada ave e/ou localidade.

Os estudos morfológicos, morfométricos e moleculares poderão revelar novas espécies, redescrições, genótipos e novos hospedeiros aprimorando a taxonomia dos coccídios de aves silvestres. A identificação morfológica criteriosa do oocisto o qual extrair-se-á o DNA para o sequenciamento de genes específicos, tornarão equivalentes as informações genotípicas e morfológicas de cada espécie. Neste sentido, possíveis associações equivocadas de espécies e genótipos, decorrentes da amplificação de grandes quantidades de oocistos (YANG et al., 2014; 2015; 2016), poderão ser ajustadas e/ou corrigidas.

3. JUSTIFICATIVA GERAL E NUMA PERSPECTIVA DO MERCOSUL

A preservação e conservação ambiental são historicamente contrárias às perspectivas da produção agropecuária e ao crescimento populacional que culmina com o aumento da urbanização. Nesta lógica, os recursos naturais são apropriados para o desenvolvimento, mas como a natureza é finita, o sucesso do desenvolvimento conseqüentemente está associado a uma crise ambiental (MARTINS, 2009).

Neste sentido, torna-se importante o entendimento que as medidas de proteção ao meio ambiente não são contrárias ao desenvolvimento antrópico. Especialistas no 3º Congresso da União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN), realizado no final de novembro em Bangcoc, Tailândia, afirmam que a preservação e conservação ambiental não se opõem ao desenvolvimento, apenas se opõem às formas de exploração econômica que buscam o lucro fácil e imediato. Neste evento, foi concluído que deve-se conciliar os interesses econômicos e a conservação, promovendo o ordenamento da ocupação do território. Em outras palavras, quando se definem as áreas de agricultura intensiva e as que serão protegidas, a paisagem natural deixa de ser um obstáculo ao desenvolvimento e se torna um espaço essencial para manter os estoques de água, a qualidade do solo, a biodiversidade e a estabilidade do clima (FIORAVANTI, 2004).

Neste cenário mundial, o Mercosul, antecipadamente, comprometeu-se com a denominada “Estratégia de Biodiversidade do Mercosul”, idealizada na 8ª Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica (COP-8), e acordada entre Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, em março de 2006 Curitiba, PR. Este documento estabeleceu as diretrizes e linhas de ação prioritárias para a integração das políticas e legislações da área ambiental no bloco. Sendo assim, as ações de conservação da Biodiversidade e o uso sustentável dos recursos naturais tornam-se dependentes da cooperação entre os governos, o setor privado e a sociedade civil (TEIXEIRA, 2006).

Neste contexto este projeto justifica-se. O estado de estresse, o qual é amplamente reconhecido como um biomarcador de estresse ambiental (BERTO; LOPES, 2019), está diretamente relacionado com a distribuição e densidade de coccídios, os quais torna-se também biomarcadores ecológicos. Desta forma, este trabalho potencialmente revelará e/ou constatará as áreas mais e menos impactadas na região do Médio Paraíba, aquelas prioritárias para preservação e conservação, tais como aquelas no entorno do Parque Nacional do Itatiaia, o qual uma é uma Unidade de Conservação de proteção integral classificado pelo Ministério do Meio Ambiente como área de prioridade extremamente alta para a conservação da

biodiversidade, mas que possui muita áreas desflorestadas para atividades de agricultura, pecuária e urbanização no seu entorno (ICMBIO, 2019).

Além disso, o modelo de estudo previsto neste projeto poderá ser aplicado em outros países do Mercosul, principalmente, aqueles signatários da “Estratégia de Biodiversidade do Mercosul”. De antemão, tem-se um contato prévio com o Prof. Jorge Manuel Cárdenas da Asociación Peruana de Helmintología e Invertebrados Afines (APHIA), o qual demonstrou um interesse em colaborar neste projeto e aplicá-lo no Peru. Este poderia ser o coordenador do Mercosul, ou outro professor da UNRC indicado e aprovado pelo Colegiado do PPGCTIA.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Biodiversidade refere-se à variedade de vida no planeta, ou à propriedade dos ecossistemas serem distintos. Engloba as plantas, os animais, os microrganismos e os processos ecológicos em uma unidade funcional. Neste contexto, o Brasil ocupa posição de destaque dentre os países com maior biodiversidade por abrigar alguns dos biomas com a maior riqueza de espécies da fauna mundial e, também, com a mais alta taxa de endemismo. A Mata Atlântica e o Cerrado estão entre os principais biomas brasileiros, sendo relacionados na lista dos 25 hotspots (áreas mais importantes para preservar a biodiversidade do planeta) da Terra (MMA, 2019). Em particular, a Mata Atlântica está entre as cinco primeiras colocada na lista dos hotspots mundiais, pois, sua área remanescente é inferior a 8% da sua extensão original (SIMON et al., 2008).

A perda e fragmentação de habitats e a biopirataria são as principais ameaças a biodiversidade da Mata Atlântica, as quais, além dos impactos diretos a fauna, flora e microbiota, estão diretamente associados ao estado de estresse e imunidade dos animais silvestres e, portanto, indiretamente favorecem a transmissão e susceptibilidade destes animais aos parasitas. Neste contexto, surge a importância do conhecimento sobre os parasitas das aves silvestres, principalmente de alguns grupos pouco estudados, como os protozoários coccídios (Chromista: Miozoa: Eimeriidae), os quais são de extrema importância, tanto em termos de biodiversidade, quanto em sua dinâmica e especificidade (BERTO; LOPES, 2013; 2019).

A identificação taxonômica das espécies de coccídios é feita, primariamente, através do estudo morfológico e morfométrico das formas exógenas isoladas de amostras fecais de seus respectivos hospedeiros, as quais são denominadas de oocistos. Cada oocisto é constituído por um número determinado de unidades infectantes denominados esporozoítos, os quais podem estar inseridos em outra estrutura importante para identificação, denominada esporocisto (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2014a).

Em tempos modernos, relatos e descrições de espécies de coccídios são relativamente frequentes. Duszynski et al. (2004) validaram e agruparam centenas de espécies em diversas famílias e ordens da classe Aves, entretanto inúmeras destas espécies precisam ser redescritas ou melhor caracterizadas para gerar um estudo taxonômico que classifique efetivamente as espécies (DUSZYNSKI et al., 2004; BERTO et al. 2011).

Outro ponto que deve direcionar a identificação das espécies de coccídios é a distribuição geográfica original das aves silvestres; no entanto, deve-se considerar a possibilidade de transmissão/dispersão de coccídios além da distribuição geográfica de seus hospedeiros. Em outras palavras, apesar dos coccídios descritos de aves que habitam regiões geograficamente isoladas e bem delimitadas permanecerem igualmente isolados, a maioria das aves apresenta uma grande distribuição geográfica, podendo ser simpátricas com outras aves de mesma família e, assim, promovendo à transmissão entre aves simpátricas e o surgimento de novos hospedeiros. Além disso, o tráfico ilegal de aves silvestres (biopirataria), o comércio legal, criações de aves exóticas próximas ao ambiente silvestre, reintrodução de aves por Centros de Triagem, etc. podem promover a transmissão/dispersão de coccídios entre aves não-simpátricas (DUSZYNSKI et al., 2004; BERTO et al. 2011; BERTO; LOPES, 2013; 2019).

Ainda neste pensamento, a transmissão dos coccídios é principalmente feco-oral e, portanto, inúmeros fatores devem ser considerados (FAYER, 1980). Giraudeau et al. (2014) afirmam que diferentes habitats, efeitos sazonais e condições e impactos ambientais influenciam na densidade dos coccídios e nas características dos oocistos. Esta condição dificulta ainda mais a identificação pois a morfologia, principalmente a morfometria, pode ser distinta em oocistos de mesma espécie recuperados de aves de mesma espécie, porém que habitam em ambientes distintos.

Finalmente, mediante a todos estes fatores que devem ser relacionados para a identificação morfológica de coccídios, outras abordagens podem ser realizadas para ampliar a caracterização de uma espécie de coccídio, como avaliações morfométricas e estatísticas (histogramas, regressões lineares, testes comparativos, etc.), quantificação pela contagem do número de oocistos por defecação (OoPD) o qual confere as densidades e, finalmente, métodos moleculares (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BUSH et al., 1997; TENTER et al., 2002; DOLNIK et al., 2010; BERTO et al., 2014).

O método molecular utilizado na identificação de espécies se baseia na reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual pode ser utilizada para amplificar sequências específicas de DNA ou marcadores moleculares de gênero ou família, como as seguintes regiões genômicas: (1) Os genes nucleares que codificam os RNAs ribossômicos (rRNA) 18s e 28S; (2) o espaçador interno transcrito (ITS1) do cistron ribossômico e (3) o gene mitocondrial que codifica para o citocromo c oxidase subunidade I (COX-1, COI). As análises comparativas das sequências de nucleotídeos destes marcadores, com as sequências de espécies conhecidas depositadas no “International Nucleotide Sequence Databases” (GenBank/EMBL/DDBJ), podem confirmar identificações, complementar a caracterização de uma espécie e prover dados para estudos filogenéticos (OGEDENGBE et al., 2011; BERTO et al., 2014; SILVA-CARVALHO et al., 2018).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos pontos de captura/coleta de aves/amostras fecais no PNI: A captura de aves silvestres e coleta de amostras fecais serão feitas em diversas localidades da Região do Médio Paraíba, RJ, incluindo áreas não conservadas, em reflorestamento e unidades de conservação como o Parque Nacional do Itatiaia.

Captura de aves silvestres e coleta de amostras: As capturas de aves silvestres e coleta de amostras fecais serão realizadas a cada mês. As localidades de captura serão avaliadas e caracterizadas quanto aos parâmetros de uso e cobertura do solo (atividades agroflorestais e agropecuárias, reflorestamento, vegetação florestal preservada, corpos d'água, etc.) num raio de 1 km do ponto de captura, com o auxílio de imagens de satélite fornecidas pelo software Google Earth. Os parâmetros meteorológicos médios (temperatura, umidade, pressão, radiação, chuva, etc.) de um período de 30 dias antes da captura serão obtidos do INMET (2019), utilizando os dados registrados da localidade específica ou próxima do ponto de captura. Nos locais de captura, serão utilizadas redes de neblina com diferentes dimensões de malha objetivando a captura de aves de diversos portes. A frequência de verificação das redes de neblina será de 20 minutos, conduzindo-se em sequência com a retirada manual da ave, minimizando estresse. As aves serão inicialmente mantidas em sacos de pano até que proceda-se com a identificação específica da ave (SIGRIST, 2014), anilhamento com anilhas do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE) (Anilhador Senior: Bruno Pereira Berto; Registro: 5967850) e determinação e registro dos dados ecológicos, biológicos e biométricos (massa; temperatura; comprimento total; comprimento, largura e altura do bico; comprimentos da asa, cauda e tarso; estágio de pneumatização do crânio; conteúdo de gordura acumulado; estágio da placa de incubação; estágio de desgaste das primárias; presença de ectoparasitos, como carrapatos, piolhos, etc.) (NASCIMENTO et al., 1994). Em seguida, as aves serão transferidas para caixas de papelão específicas para o transporte de aves e com diferentes dimensões para acondicionar aves de diversos portes. Estas caixas de papelão terão sido previamente forradas com papel absorvente objetivando-se obter as defecações isoladas para a metodologia de quantificação por OoPD. Após a obtenção das amostras fecais, as aves serão, em seguida, libertadas no próprio ambiente onde foram capturadas.

Processamento para detecção de corticosterona (cortisol) de penas: Durante o manejo das aves silvestres algumas penas serão recolhidas para a detecção de corticosterona de longo prazo e conferência direta do estado de estresse da ave. Para remover contaminantes da superfície, as penas serão lavadas antes da análise por imersão e agitação em um tubo de centrífuga de 50 mL preenchido com uma solução detergente diluída (1%) em água ultrapura por 30 segundos. Após secagem durante o período de noite, as penas recortadas em um frasco de cintilação. A corticosterona será extraída usando 10 mL de metanol. As amostras serão sonicadas por 30 min e depois serão incubadas em 50° C durante uma noite. A separação do extrato será por filtração a vácuo. Finalmente, as amostras serão analisadas e quantificadas por ELISA (Imunoensaio com Enzima CORT da Enzo Life Sciences CORT-ADI-901-097) (HARRIS et al., 2017).

Processamento das amostras fecais: As fezes obtidas serão transportadas em tubos de centrífuga de 15 ml contendo a relação de 1/6 de fezes para 5/6 de solução aquosa de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 2,5%. Para que os oocistos permaneçam viáveis os tubos de centrífuga serão periodicamente abertos e homogêneos assegurando constante presença de oxigênio atmosférico. No laboratório, estes tubos de centrífuga contendo o material fecal e a solução de $K_2Cr_2O_7$ a 2,5%, serão mantidos abertos em temperatura ambiente, até verificar que mais de 70% dos oocistos estejam esporulados. Após a esporulação dos oocistos, estes poderão ser separados da solução contendo as fezes e o $K_2Cr_2O_7$ pela técnica modificada de flutuação

com solução de sacarose (500g sacarose, 350ml água) via centrifugação (5min a 2.000 rpm) descrita por Sheather (1923) e modificada por Duszynski e Wilber (1997). A solução será suspensa em água destilada nos tubos de centrífuga, repetidamente, visando retirar o excesso de $K_2Cr_2O_7$. Após esse procedimento, suspender-se-á o material em solução de sacarose e, novamente, centrifugar-se-á. Depois da centrifugação, o conteúdo do tubo de centrífuga será elevado com solução de sacarose até o limite da abertura formado um menisco convergente, onde será depositada uma lamínula por 5 a 10 min. Após este período, a lamínula será retirada e colocada cuidadosamente na superfície de uma lâmina de microscópio.

Visualização dos oocistos: Utilizar-se-á microscópio em objetiva de 100X e óleo de imersão com intuito de melhorar a visualização e, conseqüentemente, maior detalhamento das formas e tamanhos das estruturas presentes no oocisto esporulado.

Quantificação dos oocistos: A quantificação de oocistos será conduzida de acordo com Dolnik et al. (2010), onde a totalidade de oocistos recuperada a partir de uma defecação é contada em lâmina de microscopia. Para evitar erros de contagem, que podem ser causados pela aglomeração de oocistos, todos os campos da lâmina serão observados. Estes resultados conferem a densidade de coccídios de um hospedeiro (BUSH et al., 1997), sendo expressos como OoPD.

Identificação das espécies: Para identificação dos oocistos recuperados utilizar-se-á como base as diretrizes e estudos morfológicos e morfométricos destacados por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014) que auxiliam na identificação e classificação dos oocistos esporulados de coccídios. De acordo com Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2011), os oocistos recuperados de um hospedeiro devem ser comparados, em detalhes, com as espécies de coccídios descritas na mesma família do hospedeiro onde os oocistos foram encontrados.

Desenho e fotomicrografia dos oocistos: Todos os oocistos das espécies identificados serão esquematizados e editados digitalmente através dos programas de editoração gráfica Corel Draw e Corel Photo-paint (Corel Corporation®). As fotomicrografias serão conduzidas com auxílio de microscópio em objetiva de 100x e óleo de imersão acoplado com câmera digital.

Isolamento dos oocistos e extração do DNA: Oocistos identificados como da mesma espécie (ou mesmo morfotipo) serão isolados em microscópio, fotomicrografados e reservados individualmente em microtubos contendo PBS (DOLNIK et al., 2009). O DNA destes espécimes será extraído utilizando o kit da QiagenDNeasy® 96 Blood&Tissue seguindo as instruções do fabricante. As amostras serão estocadas a $-20^{\circ}C$ e 3 μ l de cada extrato será subsequentemente utilizado nas ampliações por PCR.

Amplificação por PCR dos loci a serem analisados: As amostras de DNA serão empregadas em reações de polimerização em cadeia, utilizando-se iniciadores selecionados a partir de trabalhos publicados por outros autores (DOLNIK et al., 2009; YANG et al., 2014). Desta forma, serão utilizados iniciadores para amplificação das regiões de DNA ribossomal, 18S e 28S e do gene mitocondrial COX1.

Sequenciamento e análise filogenética: Os fragmentos amplificados serão sequenciados pela empresa especializada Ludwig Biotec e as sequências obtidas serão submetidas a uma análise comparativa com as sequencias de espécies conhecidas já depositadas no GenBank utilizando o “Basic Local Alignment

Search Tool” (BLAST). As árvores filogenéticas serão construídas com os coccídios depositados para o mesmo gene no GenBank. O alinhamento e análise de parcimônia serão conduzidos pelo software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, version 7, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA). A história evolutiva será inferida utilizando os métodos Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) e Maximum Parsimony (MP) e as distâncias serão calculadas usando o método Tamura-Nei. As análises de Bootstrap serão conduzidas utilizando 1.000 repetições para avaliar a confiabilidade das topologias inferidas na árvore.

Estudo ecológico/estatístico: O estudo estatístico realizado consiste-se inicialmente em representar graficamente os valores observados quanto aos diâmetros maior e menor, índice morfométrico e suas respectivas frequências. Testes paramétricos descritivos, análise de variância (ANOVA) e regressão linear, serão realizados com base em Sampaio (2002) e Berto et al. (2014), para relacionar as medidas dos oocistos esporulados de mesmas ou diferentes espécies e suas respectivas aves hospedeiras, além da correlação das densidades e medidas dos oocistos com os dados ecológicos, biológicos e biométricos dos hospedeiros. Os resultados de densidade (OoPD) serão submetidos a transformação logarítmica antes da aplicação da ANOVA.

6. CRONOGRAMA

Este projeto e as demais atividades do doutorado serão desenvolvidos no prazo de quatro anos seguindo o seguinte cronograma (Tabela 1):

Tabela 1. Cronograma de desenvolvimento do projeto, de Março de 2020 à Fevereiro de 2024.

Atividades/ Quadrimestre	2020			2021			2022			2023	
	1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	Jan	Fev
Créditos em disciplinas	x	x	x								
Levantamento bibliográfico	x	x	x	x	x	x					
Captura de aves e coleta de amostras	x	x	x	x	x	x					
Processamento das amostras	x	x	x	x	x	x					
Identificação e quantificação dos parasitas	x	x	x	x	x	x					
Estudo estatístico/ ecológico				x	x	x					
Análise e discussão dos resultados				x	x	x	x	x	x		
Publicação em periódicos e trabalhos de congressos				x	x	x	x	x	x	x	x
Entrega da Tese										x	
Defesa da Tese											x

7. VIABILIDADE ECONÔMICA

O desenvolvimento deste trabalho será realizado nas instalações vinculadas ao Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC), no Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas

e da Saúde, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e no Núcleo de Monitoramento Ambiental (NUMA), do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro *campus* Duque de Caxias (IFRJ CDUC). O laboratório contém equipamentos e materiais permanentes para o desenvolvimento do trabalho e possui recursos financiados por dois projetos aprovados e financiados pela FAPERJ e CNPq, intitulados: “Taxonomia e ecologia de coccídios de aves silvestres do sudeste brasileiro” (Edital 10/2016 – JCNE – Jovem Cientista do Nosso Estado); e “Taxonomia e ecologia de coccídios de aves silvestres do sudeste brasileiro” (Chamada CNPq N° 12/2016 – PQ – Bolsas de Produtividade em Pesquisa). A expectativa de base orçamentária consta na Tabela 2.

Tabela 2. Planilha de custos referente ao presente projeto de doutorado.

Atividades	Material e/ou serviço	Categoria	Valor previsto (R\$)
Captura de aves e coleta de amostras	Rede de neblina; Tubos cônicos para coleta de fezes e penas; sacos e caixa de papelão para contenção, etc	Material de consumo	1000,00
Processamento das amostras	Solução saturada de sacarose; dicromato de potássio 2,5%; Reagentes para extração e amplificação de DNA, como kits de extração e purificação, enzimas, primers, etc.	Material de consumo	3000,00
Microscopia	Lâminas e lamínulas para microscopia; óleo de imersão.	Material de consumo	500,00
Organização e elaboração de trabalhos	Cartuchos de impressora; Papel A4; Clipes de papel; Grampeador; Grampos; Pastas.	Material de consumo	500,00
Total			5.000,00

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTO, B. P.; FLAUSINO, W.; McINTOSH, D.; TEIXEIRA-FILHO, W. L.; LOPES, C. W. G. Coccidia of New World passerine birds (Aves: Passeriformes): a review of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae). *Systematic Parasitology*, v. 80, p. 159-204, 2011.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Distribution and Dispersion of Coccidia in Wild Passerines of the Americas. In: RUIZ, L.; IGLESIAS, F. *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. New York: Nova Science Publishers, 2013. p. 47-66.
- BERTO, B. P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C. W. G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, n. 1, p. 1-15, 2014.
- BERTO, B. P.; LOPES, C. W. G. Coccidia of wild birds as ecological biomarkers: Some approaches on parasite-host-environment interaction. *Journal of Parasitology*, 2019. [no prelo]
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of parasitology*, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.

- DOLNIK, O. V.; DOLNIK, V. R.; BAIRLEN, F. The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea*, v. 98, n. 1, p. 97-103, 2010.
- DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology*, v. 83, n. 2, p. 333-336, 1997.
- DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L.; UPTON, S. *The Coccidia of the World*, 2004. Disponível em <<http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>>. Acesso em: 30 mai. 2019.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. *Veterinary Parasitology*, v. 6, p. 75 -103, 1980.
- FIORAVANTI, C. O capitalismo verde: Ações de conservação só frutificarão com visão de lucro no longo prazo, 2004. Disponível em <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2004/12/01/o-capitalismo-verde>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- GIRAUDEAU, M.; MOUSEL, M.; EARL, S.; MCGRAW, K. Parasites in the city: degree of urbanization predicts poxvirus and coccidian infections in house finches (*Haemorrhous mexicanus*). *PloS one*, v. 9, n. 2, e86747, 2014.
- HARRIS, C. M.; MADLIGER, C. L.; LOVE, O. P. An evaluation of feather corticosterone as a biomarker of fitness and an ecologically relevant stressor during breeding in the wild. *Oecologia*, v. 183, n. 4, p. 987-996, 2017.
- ICMBIO. Parque Nacional do Itatiaia. Disponível em <<http://www.icmbio.gov.br/parnaitatiaia>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 08 set. 2019.
- MARTINS, F. O capitalismo como aliado do meio ambiente, 2009. Disponível em <<https://www.gazetadopovo.com.br/vida-e-cidadania/colunistas/fernando-martins/o-capitalismo-como-aliado-do-meio-ambiente-c0vudu1nrhw0sl3h2b5p0183y>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- MMA. Conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm*, Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade>>. Acesso em: 30 set. 2019.
- NASCIMENTO, I. L. S.; NASCIMENTO, J. L. X.; ANTAS, P. T. Z. Manual de Anilhamento de Aves no Brasil. 2ª ed. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, p. 146. 1994.
- OGEDENGBE, JD, HANNER RH, BARTA JR. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology*, v. 41, p. 843–850, 2011.
- SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2ª ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2002. 265p.
- SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology*, v. 36, p. 266-275, 1923.
- SIGRIST, T. Guia de Campo: Avifauna Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Avis Brasilis, 2014. 608 p.

- SILVA-CARVALHO, L. M.; PASTURA, D. G. N.; RODRIGUES, M. B.; GOMES, J. V.; OLIVEIRA, M. S.; SIQUEIRA, P. B.; OLIVEIRA, J. L. G.; SOARES, S. S.; OLIVEIRA, A. A.; LIMA, V. M.; FERREIRA, I.; BERTO, B. P. *Isospora sagittulae* McQuiston & Capparella, 1992 (Apicomplexa: Eimeriidae) from antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae) in the Amazon and Atlantic Forest of Brazil: with notes on its distribution and dispersion in the Neotropical region. *Parasitology Research*, v. 117, p. 2635-2641, 2018.
- SIMON, J. E.; PERES, J.; RUSCHI, P. A. A importância da Serra das Torres para a conservação de aves no estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil. *Revista Científica FAESA*, v. 4, n. 1, p. 47-62, 2008.
- TEIXEIRA, G. Mercosul terá estratégia de biodiversidade para o bloco, 2006. Disponível em <<https://www.mma.gov.br/informma/item/3186-mercosul-tera-estrategia-de-biodiversidade-para-o-bloco>>. Acesso em: 10 out. 2019.
- TENTER, A.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, R. C. A.; CONRAD, P. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal of Parasitology*, v. 32, p. 505–616, 2002.
- YANG, R.; BRICE, B.; RYAN, U. *Isospora anthochaerae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a Red wattlebird (*Anthochaera carunculata*) (Passeriformes: Meliphagidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, v. 140, p. 1-7, 2014.
- YANG, R.; BRICE, B.; ELLOIT, A.; RYAN, U. *Isospora serinuse* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from a domestic canary (*Serinus canaria* forma domestica) (Passeriformes: Fringillidae) in Western Australia. *Experimental Parasitology*, v. 159, p. 59-66, 2015.
- YANG, R.; BRICE, B.; ELLOIT, A.; RYAN, U. Morphological and molecular characterization of *Eimeria labbeana*-like (Apicomplexa: Eimeriidae) in a domestic pigeon (*Columba livia domestica*, Gmelin, 1789) in Australia. *Experimental Parasitology*, v. 166, p. 124-130, 2016.