

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

TAXONOMIA E SISTEMÁTICA DE *Tyzzeria*
ALLEN, 1936 (CHROMISTA: APICOMPLEXA):
CARACTERIZAÇÃO DE MORFOTIPOS E
POSICIONAMENTO FILOGENÉTICO DO
GÊNERO BASEADO EM EVIDÊNCIAS
MOLECULARES

CARLOS NEI ORTÚZAR FERREIRA

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**TAXONOMIA E SISTEMÁTICA DE *Tyzzeria* ALLEN, 1936
(CHROMISTA: APICOMPLEXA): CARACTERIZAÇÃO DE
MORFOTIPOS E POSICIONAMENTO FILOGENÉTICO DO
GÊNERO BASEADO EM EVIDÊNCIAS MOLECULARES**

CARLOS NEI ORTÚZAR FERREIRA

Sob a orientação do professor
Dr. Bruno Pereira Berto

e Co-orientação de
Dr^a. Viviane Moreira de Lima e Dr^a. Mariana de Souza Oliveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biologia Animal**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Área de concentração: Biodiversidade Animal.

Seropédica, RJ
Setembro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

077t

Ortúzar Ferreira, Carlos Nei, 1997-

Taxonomia e sistemática de *Tyzzeria* Allen, 1936 (Chromista: Apicomplexa): caracterização de morfotipos e posicionamento filogenético do gênero baseado em evidências moleculares / Carlos Nei Ortúzar Ferreira.

- Seropédica-RJ, 2024.

205 f.: il.

Orientador: Bruno Pereira Berto.

Coorientadora: Viviane Moreira de Lima.

Coorientadora: Mariana de Souza Oliveira.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal

1. parasitologia. 2. coccídios. 3. anseriformes. 4. filogenia. 5. diversidade. I. Pereira Berto, Bruno, 1984-, orient. II. Moreira de Lima, Viviane, 1974-, coorient. III. de Souza Oliveira, Mariana, 1993-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal.

V. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, o primeiro cientista que conheci. O meu primeiro exemplo, a quem devo meu deslumbre inicial à Ciência e quem, de certa maneira, forjou-me para a vida acadêmica. Outrora garoto, eu, que de devaneios a sonhos, vislumbrava ser cientista um dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida, pela saúde e vitalidade que carrego e a tudo que concerne ao meu estado de bem-estar e paz de espírito. Enfim, tudo para que eu possa continuar realizando com diligência, afinco e primor as atribuições a mim conferidas, nas minhas atividades laborais; e o mais importante: sem perder a paixão (pelos coccídios) que me move.

Agradeço imensamente a todos os amigos e familiares que contribuíram para o êxito da minha jornada acadêmica, sempre me incentivando a buscar meus sonhos. Agradeço a minha avó Alda d'Almeida Ferreira, ao meu pai Elvino Ferreira, minha mãe Sandra Sofia Ortúzar Cossich, meus tios Cristina d'Almeida Ferreira Ribeiro Mendes, Roberto d'Almeida Ferreira e José Alberto Ribeiro Mendes que participaram significativamente na minha criação e, conseqüentemente, formação. Agradeço as minhas irmãs Alda d'Almeida Ortúzar Ferreira e Luísa Sofia Ortúzar Cossich, e aos meus primos Vinícius Magalhães da Silva Ferreira e Manoela d'Almeida Ferreira Ribeiro Mendes pelo companheirismo e apoio de sempre.

Agradeço a todos meus amigos, em especial àqueles mais próximos nesses últimos anos: Gabriel Magalhães Tavares, Eduardo de Souza Pereira, Rodrigo Lopes Machado, Raphael Santiago Alves, Rodrigo Gredilha Duarte, Thiago Fernandes Martins, Daniel da Silva Claro e Tiago Peixoto da Silva. Obrigado por todos os conselhos e apoio.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Biologia de Coccídios, local onde me construí como cientista, especialmente na figura do meu orientador Bruno Pereira Berto, quem me iniciou na produção científica, um verdadeiro “pai científico” para mim, a quem devo todo conhecimento depositado e a responsabilidade a mim confiada para supervisionar os estagiários e alunos de Iniciação Científica do laboratório nesses últimos anos. Contumaz, não posso me furtar de agradecer nominalmente minhas coorientadoras Mariana de Souza Oliveira e Viviane Moreira de Lima pelas instruções e supervisão do meu trabalho e por prover treinamento substancial para minha capacitação, sobretudo na área de Biologia Molecular. Agradeço a todos os colegas que durante esses anos da minha estadia no laboratório, transferiram seus ensinamentos a mim e me ajudaram na rotina do processamento das amostras e nos trabalhos de campo, como Lucas de Assis Silva Andrade, Jhon Lennon Genovez Oliveira, Leandro Dorna dos Santos, Mariana Borges

Rodrigues, Lidiane Maria da Silva Carvalho, Jennifer Oliveira Melo, Guilherme Azzulini Feitosa, Carolina Mendes Sayão Caruncho, Bruno Lincoln de Oliveira Saise, Rhuan Carlos Coelho Guimarães, Ericson Ramos de Mello, Carla Maronezi, Ingridhy Almeida da Silva, Juliana Xavier Garcia de Oliveira, Lívia Paixão Lisboa Iunes e Lara Xavier Silva. A todos vocês pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade meu muito obrigado!

A todos os animais que fizeram parte da minha jornada acadêmico-científica e que inevitavelmente contribuíram para minha formação não só profissional, mas também pessoal com a contundente lembrança do dever ético que nos deve permear, sempre pautando a valorização da vida.

Aproveito para agradecer também a todas as oportunidades que me foram dadas, a todas as portas que a vida já me abriu, pelas circunstâncias que me trouxeram até aqui e pela obstinação que construí para, por mais árduas que fossem as incumbências e percalços no caminho, nunca desistir.

Por fim, agradeço imensamente a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro como instituição de ensino por prover capacitação técnica e uma formação de alta qualidade a minha pessoa.

BIOGRAFIA

Carlos Nei Ortúzar Ferreira, filho de Elvino Ferreira e Sandra Sofia Ortúzar Cossich, brasileiro, natural de Barra Mansa-RJ, nascido em 07 de agosto de 1997.

Iniciou sua formação profissional em 2016, ao ingressar no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) no primeiro semestre letivo daquele ano (2016.1). Durante a graduação, desenvolveu fascínio pela área de parasitologia animal, exercendo a função de monitor das disciplinas “Zoologia Médica e Parasitologia Animal I” no ano de 2018; e “Parasitologia Animal II” entre os anos de 2020 e 2021, ambas do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) da UFRRJ. Começou a estagiar no Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC) do Departamento de Biologia Animal (DBA) da mesma instituição, em meados de 2017, onde desempenhou por três vezes a função de bolsista de Iniciação Científica PIBIC-CNPq (2018-2019; 2020-2021 e 2021-2022, respectivamente), acumulando vasta experiência sobre taxonomia e ecologia de coccídios (Apicomplexa: Eimeriidae) de aves silvestres da Mata Atlântica do sudeste brasileiro. Entre 2021 a 2022, participou do projeto de extensão intitulado "O Mundo Secreto dos Parasitos" promovendo ações socioeducativas com crianças da rede básica de ensino do município de Seropédica-RJ, acerca de parasitos, suas parasitoses e a importância da promoção da saúde. Foi ainda, membro fundador do grupo de estudos em Parasitologia Animal da UFRRJ, "PARASITOSOMOS", vinculado ao Instituto de Veterinária (IV/UFRRJ), participando ativamente de suas atividades e reuniões até meados de 2022.

Após graduar-se como Bacharel em Medicina Veterinária em maio de 2022, (turma correspondente a 2021.2, atrasada por conta da pandemia de Covid-19), ingressou como mestrando no mês de setembro de 2022 no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal (PPGBA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS/UFRRJ).

“A utopia está para nós como tal qual o horizonte está. Aproximo-me dois passos e ele se afasta dois passos. Caminho mais dez passos em sua direção e o horizonte “corre” mais dez. Por mais que eu caminhe, jamais o alcançarei. Ora, mas então para que serve a utopia? Serve justamente para isso: para que nunca deixemos de caminhar!”

Eduardo Galeano

RESUMO

FERREIRA, Carlos Nei Ortúzar. **Taxonomia e Sistemática de *Tyzzeria* Allen, 1936 (Chromista: Apicomplexa): caracterização de morfotipos e posicionamento filogenético do gênero baseado em evidências moleculares.** 2024. 176p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Assuntos relacionados à taxonomia e sistemática de coccídios ainda possuem muitos enclaves para serem resolvidos, tanto no que tange ao levantamento da biodiversidade desses parasitos, como na organização filogenética de seus táxons. *Tyzzeria* Allen, 1936 perdura até os dias atuais como um dos poucos grupos de coccídios sem ter sua caracterização genética depositada no GenBank. Além disso, sua classificação atual dentro da família Eimeriidae Minchin, 1903 é questionável. Neste trabalho, são apresentados 4 morfotipos desse coccídio recuperados de amostras fecais de aves (Anseriformes: Anatidae) domésticas e silvestres do Brasil. O morfotipo 1, com oocistos sub esféricos medindo 13,5 x 12,0 μm , índice morfométrico de 1,1 μm , parede dupla e lisa com espessura de 1,0 μm . O morfotipo 2, com oocistos elipsoidais medindo 13,6 x 10,4 μm , índice morfométrico de 1,3 μm , parede dupla, lisa e fina com espessura de 0,8 μm . O morfotipo 3, com oocistos elipsoidais medindo 14,5 x 11,7 μm , índice morfométrico de 1,2 μm , parede dupla, grossa e levemente áspera, com espessura de 1,1 μm . E o morfotipo 4, com oocistos elipsoidais medindo 14,7 x 11,2 μm , índice morfométrico de 1,3 μm , parede dupla, grossa e muito áspera, com espessura de 1,4 μm . Levando em consideração o número amostral de oocistos analisados, parâmetros morfológicos/morfométricos, sequenciamentos realizados e aspectos de especificidade parasitária no hospedeiro; apenas o morfotipo 1 pôde ser identificado, sendo este condizente com *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963. Seus oocistos foram então isolados e sequenciados. Aqui é fornecida a primeira caracterização molecular para o gênero (a partir de oocistos dessa espécie) e as análises filogenéticas demonstram que esse gênero coccidiano está intimamente relacionado com *Schellackia* Reichenow, 1919 e outros eimerídeos de anfíbios e répteis.

Palavras chaves: parasitologia, coccídios, anseriformes, filogenia, diversidade

ABSTRACT

FERREIRA, Carlos Nei Ortúzar. **Taxonomy and Systematics of *Tyzzeria* Allen, 1936 (Chromista: Apicomplexa): characterization of morphotypes and phylogenetic position of the genus based on molecular evidence.** 2024. 176p. Dissertation (Master's in Animal Biology). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Issues related to the taxonomy and systematics of coccidia still have many enclaves to be resolved, both in terms of the survey of the biodiversity of these parasites and in the phylogenetic organization of their taxa. *Tyzzeria* Allen, 1936 remains to this day as one of the few groups of coccidia without its genetic characterization deposited in GenBank. Furthermore, its current classification within the family Eimeriidae Minchin, 1903 is questionable. In this work, we present four morphotypes of this coccidium recovered from fecal samples of domestic and wild birds (Anseriformes: Anatidae) from Brazil. Morphotype 1, with subspherical oocysts measuring 13.5 x 12.0 µm, morphometric index of 1.1 µm, double and smooth wall with a thickness of 1.0 µm. Morphotype 2, with ellipsoidal oocysts measuring 13.6 x 10.4 µm, morphometric index of 1.3 µm, double, smooth and thin wall with a thickness of 0.8 µm. Morphotype 3, with ellipsoidal oocysts measuring 14.5 x 11.7 µm, morphometric index of 1.2 µm, double, thick and slightly rough wall, with a thickness of 1.1 µm. And morphotype 4, with ellipsoidal oocysts measuring 14.7 x 11.2 µm, morphometric index of 1.3 µm, double, thick and very rough wall, with a thickness of 1.4 µm. Taking into account the sample number of oocysts analyzed, morphological/morphometric parameters, sequencing performed and aspects of parasite specificity in the host; only morphotype 1 could be identified, which was consistent with *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963. Its oocysts were then isolated and sequenced. Here, the first molecular characterization of the genus (from oocysts of this species) is provided and phylogenetic analyses demonstrate that this coccidian genus is closely related to *Schellackia* Reichenow, 1919 and other eimerids of amphibians and reptiles.

Key words: parasitology, coccidia, anseriformes, phylogeny, diversity

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Datas, locais e municípios onde cada coleta foi realizada.....	49
Tabela 2. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.....	50
Tabela 3. Quantidade de amostras obtidas por coleta.....	51
Tabela 4. Resultados de prevalência das coletas.....	69
Tabela 5. Morfologia/morfometria comparada entre as espécies de <i>Tyzzeria</i>	96
Tabela 6. Dados comparativos de morfologia e morfometria entre as várias caracterizações feitas de <i>Tyzzeria parvula</i>	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR e <i>nested</i> PCR.....	66
Quadro 2. Dados referentes à coleta 1: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	70
Quadro 3. Dados referente à coleta 2: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	71
Quadro 4. Dados referente à coleta 3: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	72
Quadro 5. Dados referente à coleta 4: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	72
Quadro 6. Dados referente à coleta 5: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	74
Quadro 7. Dados referente à coleta 6: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	75
Quadro 8. Dados referente à coleta 7: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	76
Quadro 9. Dados referente à coleta 8: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	76
Quadro 10. Dados referente à coleta 9: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	77
Quadro 11. Dados referente à coleta 10: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	78
Quadro 12. Dados referente à coleta 11: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	79
Quadro 13. Dados referente à coleta 12: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	81

Quadro 14. Dados referente à coleta 13: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	82
Quadro 15. Dados referente à coleta 14: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	83
Quadro 16. Dados referente à coleta 15: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	85
Quadro 17. Dados referente à coleta 16: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquemática da sistemática de Apicomplexa.....8
- Figura 2 – Citoesqueleto e processo de internalização de apicomplexas na célula hospedeira. Na imagem, as siglas representam: AP (apicoplasto), CA (alvéolos corticais), CO (conoide), DG (grânulos densos), ER (retículo endoplasmático), GA (aparelho de Golgi), MN (micronemas), MP (microporo), MT (mitocôndria), NU (núcleo), PC (anéis pré-conoidais), PR (anel polar), RH (roptrias) e SM (microtúbulos subpeliculares). Logo abaixo, representam-se em “a” contato primário do zoíto sem orientação; em “b” fixação seguida de reorientação apical; em “c” indução do vacúolo parasitóforo e em “d” translocação do zoíto para o vacúolo.....8
- Figura 3 – Diagrama da relação do número de esporocistos e esporozoítos por oocistos como parâmetro de identificação dos diferentes gêneros de coccídios. Aqueles marcados em vermelho, representam gêneros contestados por Duszynski et al. (2000), Ghimire (2010) e Adl et al. (2019). A marcação de * no quadrante 2:4, simboliza a existência de outros gêneros com essas características.....13
- Figura 4 – Estruturas morfológicas e aspectos morfométricos de um oocisto esporulado de Eimeriidae: (ow) largura do oocisto; (ol) comprimento do oocisto; (pg) grânulo polar; (or) resíduo de oocisto; (row) parede externa áspera ou (sow) lisa; micrópila em (mil) camada interna ou (mol) camada externa; (mc) capuz da micrópila; (sw) largura do esporocisto; (sl) comprimento do esporocisto; (sb) corpo de Stieda; (ssb) corpo de sub-Stieda; (psb) corpo de para-Stieda; (csr) resíduo de esporocisto compacto ou (dsr) difuso; (sp) esporozoíto; (prb) corpo refrátil posterior e (arb) anterior do esporozoíto; (n) núcleo de esporozoíto; e (str) estrias de esporozoítos.....14
- Figura 5 – Ilustração do ciclo de eimerídeos.....16
- Figura 6 – Desenhos esquemáticos e microscopia eletrônica de varredura de esporocistos mostrando as estruturas de excistamento dos diferentes grupos de coccídios. Em “a” fica evidenciado a abertura do esporocisto de um grupo ancestral, ao longo de uma única fenda longitudinal (*Goussia janae*, *Aggregata octopiana*). Em “b”, a abertura alternativa por suturas na parede do esporocisto composto por quatro valvas (*Cystoisospora suis*). E em “c”, mostra-se que num coccídio eimerídeo (*Eimeria tenella*), os esporozoítos são

liberados após a dissolução do tampão formado pelos corpos de Stieda e sub-Stieda.....	27
Figura 7 – Morfologia de um oocisto esporulado de <i>Tyzzeria</i> : (DM) diâmetro maior; (dm) diâmetro menor; (ep) espessura da parede do oocisto; (r) resíduo de oocisto; (e) esporozoítos.....	35
Figura 8 – Aglomeração de gansos das espécies <i>Anser anser</i> e <i>Anser cygnoides</i> . Animais com plumagem branca representam a variedade doméstica da espécie. Fotos referentes à coleta 2 (Teresópolis/RJ)	54
Figura 9 – Marrecos e patos amostrados no estudo. Fotos 2a e 2b: <i>Anas platyrhynchos</i> e <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> referentes à coleta 5 (Resende/RJ). Foto 2c: <i>Cairina moschata domestica</i> referente à coleta 6 (Resende/RJ). Fotos 2d e 2e: <i>Cairina moschata</i> , <i>C. moschata domestica</i> e <i>A. platyrhynchos domesticus</i> referentes à coleta 7 (Virgínia/MG)	55
Figura 10 – Gansos, patos e marrecos cujas fezes foram examinadas. Gansos das espécies <i>Anser cygnoides</i> e <i>Anser anser</i> (3a), patos <i>Cairina moschata domestica</i> (3b, 3c), marrecos <i>Anas platyrhynchos</i> (3d, 3f) e pato híbrido mulard (3e). Fotos 3a, 3b, 3c, 3d e 3f referentes à coleta 10 (Rio de Janeiro/RJ). Foto 3e referente à coleta 8 (Seropédica/RJ)	56
Figura 11 – Pato <i>Cairina moschata domestica</i> internado em hospital veterinário. Fotos referentes à coleta 13 (Rio de Janeiro/RJ)	57
Figura 12 – Marrecos selvagens de vida livre das espécies <i>Dendrocygna viduata</i> (5a, 5b) e <i>Amazonetta brasiliensis</i> (5c, 5d). Fotos 5a, 5b referentes às coletas 9 e 14 (Seropédica/RJ) e fotos 5c, 5d referentes à coleta 16 (Seropédica/RJ)	57
Figura 13 – Amostras incubadas para esporulação. 6a: Amostras referentes à coleta 10. As marcações com “P” nos tubos identificam amostras de patos (<i>Cairina moschata</i>), tubos marcados com “M” identificam amostras de marrecos (<i>Anas platyrhynchos</i>) e tubos com “G”, referem-se a amostras de gansos (<i>Anser anser</i> e <i>Anser cygnoides</i>). 6b: Amostras referente à coleta 14, de anatídeos silvestres da espécie <i>Dendrocygna viduata</i>	58
Figura 14 – Amostras referentes à coleta 14, de anatídeos silvestres da espécie <i>Dendrocygna viduata</i> . As fezes foram recolhidas no gramado em frente ao lago do IB, campus da UFRRJ.....	58

Figura 15 – Modelos das centrífugas utilizadas no processamento das amostras.....	60
Figura 16 – Microscópio óptico equipado com câmera digital para realização de fotomicrografias.....	61
Figura 17 – Configuração da lâmina de isolamento montada. Na figura, (A) demonstra vista "superior"; (B) vista "frontal"; ms: lâmina de microscópio, s: fita adesiva; cg: lamínula, obj: objetiva de microscópio, io: óleo de imersão, ooc: gota com oocistos.....	63
Figura 18 – Equipamentos utilizados para isolamento dos oocistos.....	64
Figura 19 – Amostras contendo oocistos de <i>Tyzzeria</i> isolados em solução de lise.....	64
Figura 20 – Amostras dos isolados acrescidas com beads de zircônia.....	65
Figura 21 – Utilização da eletroforese em gel de agarose e avaliação dos resultados da PCR.....	67
Figura 22 – Desenho de linha do morfotipo 1 (<i>Tyzzeria parvula</i>)	87
Figura 23 – Fotomicrografias do morfotipo 1 (<i>Tyzzeria parvula</i>). Barra de escala: 5 μm	88
Figura 24 – Fotomicrografias do morfotipo 1 (<i>Tyzzeria parvula</i>). Barra de escala: 5 μm	89
Figura 25 – Desenho de linha do morfotipo 2.....	90
Figura 26 – Fotomicrografias do morfotipo 2. Barra de escala: 5 μm	91
Figura 27 – Desenho de linha do morfotipo 3.....	92
Figura 28 – Fotomicrografias do morfotipo 3. Barra de escala: 5 μm	93
Figura 29 – Desenho de linha do morfotipo 4.....	94
Figura 30 – Fotomicrografias do morfotipo 4. Barra de escala: 5 μm	95
Figura 31 – Análise filogenética de <i>Tyzzeria parvula</i> inferida por análise bayesiana para um <i>locus</i> (CRYSSU) do gene da subunidade menor (18S) do RNA ribossomal. Os comprimentos dos ramos correspondem às estimativas posteriores médias de distâncias evolutivas (barra de escala: 0.2). Os rótulos dos ramos nos nós mostram probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana e valores de bootstrap derivados da	

análise de máxima verossimilhança. Uma ameba do gênero <i>Acanthamoeba</i> Volkonsky, 1931 foi usada como grupo externo.....	103
Figura 32 – Foco do cladograma em maior ampliação demonstrando o posicionamento filogenético de <i>Tyzzeria parvula</i> próximo de <i>Eimeria ranae</i> , <i>Eimeria arnyi</i> , <i>Schellackia orientalis</i> , <i>Caryospora-Like</i> sp., entre outros.....	104
Figura 33 – Exemplificação de polimorfismo observado no morfotipo 1 (<i>Tyzzeria parvula</i>)	128

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivos Gerais.....	5
2.2 Objetivos Específicos.....	5
3 REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 Os coccídios (Chromista: Apicomplexa: Coccidia)	6
3.1.1 Definição, classificação e biologia parasitária	6
3.1.2 Diversidade e um breve histórico	9
3.1.3 Morfologia e identificação	11
3.1.4 Ciclo biológico (Apicomplexa: Eimeriidae)	14
3.1.5 Especificidade parasitária	16
3.1.6 Grupos ancestrais e relações evolutivas	20
3.2 Coccídios do gênero <i>Tyzzeria</i> Allen, 1936	28
3.2.1 Histórico de descrição do gênero e suas espécies	28
3.2.2 Classificação taxonômica	34
3.2.3 Morfologia	34
3.2.4 Listagem de espécies, demais hospedeiros e locais relatados	35
3.2.5 Descrições das espécies	38
3.2.5.1 <i>Tyzzeria perniciosa</i> Allen, 1936	38
3.2.5.2 <i>Tyzzeria natrix</i> (Matubayasi, 1936) Matubayasi, 1937	39
3.2.5.3 <i>Tyzzeria allенаe</i> Chakravarty & Basu, 1946	40
3.2.5.4 <i>Tyzzeria peromysci</i> Levine & Ivens, 1960	40
3.2.5.5 <i>Tyzzeria parvula</i> (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963	41

3.2.5.6	<i>Tyzzeria pellerdyi</i> Bhatia & Pande, 1966.....	44
3.2.5.7	<i>Tyzzeria chenicusae</i> Ray & Sarkar, 1967.....	45
3.2.5.8	<i>Tyzzeria typhlopisi</i> Ovezmukhamedov, 1968.....	45
3.2.5.9	<i>Tyzzeria galli</i> Fernando & Remmler, 1973.....	46
3.2.5.10	<i>Tyzzeria boae</i> Lainson & Paperna, 1994.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	Levantamento bibliográfico.....	48
4.2	Permissões e licenças.....	48
4.3	Origem e coleta das amostras.....	49
4.4	Processamento das amostras.....	59
4.5	Caracterizações morfológica.....	60
4.6	Caracterização morfométrica.....	61
4.7	Isolamento dos oocistos.....	62
4.8	Biologia molecular.....	64
4.8.1	Extração do DNA.....	65
4.8.2	PCR e <i>nested</i> PCR.....	66
4.8.3	Detecção do produto amplificado.....	66
4.8.4	Purificação do produto amplificado.....	67
4.9	Análises das sequências de DNA.....	67
5	RESULTADOS.....	69
5.1	Prevalência, densidade parasitária e identificações.....	69
5.2	Caracterizações morfológica/morfométrica dos morfotipos encontrados.....	87
5.2.1	Morfotipo 1.....	87
5.2.2	Morfotipo 2.....	90

5.2.3 Morfotipo 3	92
5.2.4 Morfotipo 4	94
5.3 Comparação de dados morfométricos e morfológicos de <i>Tyzzeria</i> spp.....	96
5.4 Caracterização molecular de <i>Tyzzeria parvula</i>	102
6 DISCUSSÃO	105
6.1 Considerações gerais sobre a sistemática dos coccídios e inferências moleculares.....	105
6.2 Análises filogenéticas e evidências sobre o posicionamento do gênero.....	123
6.3 Considerações sobre os polimorfismos observados.....	127
6.4 Implicações para a identificação dos morfotipos encontrados.....	131
6.5 Comentários críticos sobre a validade de <i>Tyzzeria</i> spp.....	135
7 CONCLUSÃO	147
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
9 ANEXOS	176
9.1 Certificado da CEUA.....	176
9.2 Artigos publicados no período de vigência do mestrado.....	177

1 INTRODUÇÃO

Catalogar e descrever as coisas ao nosso entorno, com o intuito de compreender melhor o meio que nos cerca, talvez tenha sido uma das práticas mais primitivas da humanidade. Algo muito mais imprescindível quanto imaginamos, uma ocupação tão primordial como outros hábitos de sobrevivência (e.g. caçar, construir utensílios, abrigar-se, comunicar-se). De fato, é difícil conceber uma mera organização tribal onde a padronização de nomes se fizesse desnecessária. Conhecer e denominar nomes a plantas ou animais (sejam esses presas ou predadores), repassando essas informações adiante, representava uma tarefa crucial para nossos antepassados. Por esse motivo, há quem diga que a taxonomia seja a “profissão mais antiga do mundo” (MINELLI, 2005; SOLTIS, 2007; COSTELLO, 2020).

A imensurável diversidade de seres vivos encontrados no planeta Terra, é algo que desperta fascínio desde as civilizações mais longínquas que se tem registro, com pensadores históricos já se debruçando sobre o tema e propondo formas de organizar a natureza de acordo com critérios pré-estabelecidos. Aristóteles (384-322 a.C.), talvez tenha sido o primeiro grande naturalista da humanidade, separando os animais em diferentes grupos de acordo com suas estruturas e comportamentos observados; e sendo responsável direto pela descrição de inúmeros desses materiais biológicos analisados. Uma das suas divisões, por exemplo, discriminava os animais entre *enaima* (ou com sangue) e *anaima* (ou sem sangue), refletindo o que atualmente entendemos como animais vertebrados e invertebrados, respectivamente. Seu discípulo, Teofrasto (370-285 a.C.), também seguindo a tradição aristotélica, descreveu centenas de plantas num compilado denominado *Historia Plantarum* (ASIMOV, 1966; MAYR, 1982; RODRIGUES; HIDALGO, 2022). Mas foi só depois, quase dois milênios mais tarde, que Carl Nilsson Linnaeus (1707-1778), com suas obras *Systema Naturae* e *Species Plantarum*, revolucionou verdadeiramente a sistematização desse conhecimento acerca da biodiversidade ao propor um modelo hierárquico de organização e padronizar a nomenclatura científica, dando moldes à classificação moderna tal qual a conhecemos hoje (MAYR, 1982; RAPINI, 2004).

Diante disso, fizeram-se necessárias a criação de normatizações, como o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, conhecido por ICZN (sua sigla em inglês) ou o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN), atualmente denominado Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (ICN). Existe ainda o Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos (ICNP), anteriormente Código Internacional de

Nomenclatura de Bactérias (ICNB). Esses tratados são convenções internacionais regidas por seus respectivos comitês, cuja função é de estabelecer as diretrizes para a nomenclatura científica relacionada aos grupos de seres vivos a eles designados. Além disso, os surgimentos e desenvolvimento de áreas dentro da Biologia, como a Taxonomia e a Sistemática, concretizaram-se cada vez mais (PAPAVERO, 1994; AMORIM, 2002).

Ou seja, a sistematização do conhecimento biológico tornou-se, essencialmente, um preceito básico da aplicação biológica, com taxonomistas e sistematas destinados a organizar toda a diversidade de seres vivos catalogados até os dias atuais. E embora indissociáveis, Taxonomia e Sistemática representam conceitos distintos entre si, com cada uma possuindo atribuições próprias. A Taxonomia é o ramo da Biologia que define os grupos de organismos biológicos, responsável por descrevê-los conforme suas características e nomeá-los, possibilitando assim, identificações subsequentes. Já a Sistemática está mais associada ao estudo comparativo entre esses organismos com o objetivo de reconstruir seu histórico evolutivo a partir do parentesco entre diversos grupos, dedicando-se a sistematizar todo esse conhecimento classificado previamente; e organizar os grupos de acordo com suas relações de proximidade, orientada por similaridades entre eles. Em outras palavras, a Taxonomia classifica e identifica, buscando delinear as diferenças para distinguir e separar as unidades (leia-se espécies), enquanto a Sistemática organiza os táxons, buscando encontrar as similaridades para agrupá-los à luz da história evolutiva (MAYR, 1968; SMALL, 1989; INGLIS, 1991; CHRISTOFFERSEN, 1995).

Nesse sentido, a Parasitologia figura hoje entre as áreas mais promissoras para se inventariar a biodiversidade, com a descrição de novas espécies ou mesmo a reorganização de grupos taxonômicos, sendo comumente frequentes. Exemplos não faltam, sejam eles no âmbito da helmintologia, acarologia, entomologia, protozoologia, entre outras áreas (GARDNER; CAMPBELL, 1992; POULIN, 2014; OKAMURA et al., 2018). De acordo com Morand (2015), mais da metade de todos organismos existentes são parasitos; e endossando essa concepção, segundo Carlson et al. (2020), o parasitismo é indiscutivelmente o modo de vida animal com a maior riqueza de espécies na Terra. Contudo, para Poulin (2014) não podemos estimar de fato a quantidade de espécies de parasitos existentes, seja em termos relativos ou absolutos. As taxas de descoberta de espécies parasitárias não mostram sinais de desaceleração e espécies crípticas, denotam um fator complicador adicional, tornando assim, infrutíferos quaisquer métodos de projeção.

A Coccidiologia, uma vertente da Protozoologia dedicada ao estudo dos coccídios, também merece destaque nesse cenário. Isso porque os coccídios correspondem a um dos grupos mais diversos de endoparasitos dentro da Parasitologia Animal. E esse interesse se justifica não apenas pelo potencial de descobertas, mas como também pela subestimada amostragem relacionada a esse grupo. Em trabalho recente, intitulado “Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done”, Duszynski (2021) discorre sobre a biodiversidade coccidiana apontando as limitadas amostragens feitas em hospedeiros vertebrados no mundo inteiro, sobretudo no que diz respeito à fauna silvestre. O autor em uma projeção conservadora (ao assumir a possibilidade da existência de apenas duas espécies coccidianas por hospedeiro), traça uma estimativa de que eventualmente possam existir 135.000 novas espécies a serem descobertas a partir de hospedeiros nunca antes examinados. Nesta mesma linha de raciocínio, para se ter uma ideia, em levantamento feito por Berto e Lopes (2013), os autores afirmaram que apenas 3% das aves da ordem Passeriformes foram examinadas para coccídios; e isso considerando apenas aves do Novo Mundo. De lá pra cá, num recorte de pouco mais de 10 anos, inúmeras outras espécies de coccídios já foram descritas; mas ainda assim, essa diversidade parece longe de encontrar seu panorama ideal de catalogação; inclusive pelo fato de novas espécies de aves terem sido descritas nesse hiato de tempo (PACHECO et al., 2021), representando assim potenciais novos hospedeiros para amostragem (BERTO; LOPES, 2020).

Com isso, a Coccidiologia contém um vasto caminho abrangendo assuntos taxonômicos e sistemáticos; e diante dessa complexidade de biodiversidade, a organização da sistemática dos táxons, torna-se, por vezes, um desafio. Podemos citar muitas alterações e descobertas relacionadas a isso nos últimos anos. Temos o reposicionamento de grupos como o caso do gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 que foi reagrupado com as gregarinas (CARRENO et al., 1999; BARTA; THOMPSON, 2006). Outros trabalhos ressuscitando gêneros como *Eumonospora* Allen, 1933 (CHOU et al., 2020) e *Cystoisospora* (Frenkel, 1977) (BARTA et al., 2005). Temos ainda, trabalhos como o de Barta et al. (2005) reduzindo o gênero *Atoxoplasma* (Garnham, 1950) como sinonímia de *Isospora* Schneider, 1881 ou o de Berto et al. (2023) estabelecendo sinonímias para algumas espécies de *Isospora*. Redescrições de *Isospora* spp., conforme apresentado por Oliveira et al. (2021) e Ortúzar-Ferreira et al. (2021), outros trabalhos que complementam a caracterização de espécies de *Eimeria* Schneider, 1875 e *Isospora* (OLIVEIRA et al., 2021b; ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2022) e ainda, inúmeras

descrições de novas espécies. Destaco aqui, trabalhos onde várias espécies foram descritas de uma única vez. A saber: Modrý et al. (2000); Berto et al. (2009) e McAllister et al. (2017).

Dentre os inúmeros táxons que os coccídios englobam, destaca-se a família Eimeriidae Minchin, 1903 por ser a mais numerosa em termos de espécies (VOTÝPKA et al., 2016). Uma das bases de classificação dos eimerídeos concerne ao padrão morfológico de seus oocistos que possuem esporocistos contendo estruturas de excistamento chamadas de corpos de Stieda e sub-Stieda (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014).

Tyzzeria Allen, 1936 corresponde a um gênero de coccídio onde 10 espécies estão descritas, sendo relatadas para uma vasta gama de hospedeiros (entre aves, répteis e mamíferos), embora, suas espécies mais bem fundamentadas estejam descritas em aves da ordem Anseriformes Wagler, 1831, família Anatidae Vigors, 1825 (DUSZYNSKI et al., 1998; BERTO, 2008). Compreende também um grupo negligenciado em estudos parasitários, haja vista a pouca informação encontrada a seu respeito frente a outros grupos (e.g. *Eimeria*). Isso se reflete no fato de, ainda hoje, este gênero perdurar sem uma caracterização genética estabelecida (ADL et al., 2019). Outro fato intrigante, diz respeito a sua classificação atual na família Eimeriidae (UPTON, 2000; BERTO, 2008). É curioso perceber como seu padrão morfológico destoa dos demais gêneros que integram essa família, tendo em vista que esporocistos são ausentes em seus oocistos. Assim, esse conjunto de fatores (morfologia singular e ausência de caracterização molecular), lançam dúvidas sobre sua classificação.

Para melhor se inferir sobre a filogenia dos táxons, é sempre desejável que se tenha a caracterização mais completa possível de um organismo, juntando dados morfológicos e moleculares; e com os coccídios isso não é diferente. São muitos os autores que aconselham a aplicação de técnicas moleculares como um complemento importante (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2014). Tendo isso em vista, este trabalho se propôs a caracterizar oocistos de *Tyzzeria* recuperados de amostras fecais de anatídeos domésticos e silvestres; além de fornecer a primeira caracterização molecular de *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963, sendo esta, a primeira para o gênero.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Realizar coletas de amostras fecais de anatídeos domésticos e silvestres (Aves: Anseriformes) para pesquisa de oocistos coccidianos de *Tyzzeria*; a fim de identificá-los morfológicamente, morfometricamente e molecularmente e, conseqüentemente, fornecer a primeira caracterização molecular e posicionamento filogenético do gênero.

2.2. Objetivos Específicos

- Coletar amostras fecais de anatídeos domésticos ou silvestres (gansos, patos, cisnes e marrecos) com o intuito de encontrar oocistos de coccídios do gênero *Tyzzeria*;
- Avaliar a prevalência quantificando o número de hospedeiros positivos encontrados no levantamento;
- Estimar a densidade parasitária contabilizando o número de oocistos encontrados por amostra fecal individual (OoPD – oocisto por defecação);
- Identificar morfológicamente e morfometricamente de maneira inequívoca os oocistos encontrados, com a captação de fotomicrografias, para posteriormente realizar o isolamento dos mesmos;
- Extrair o DNA dos esporozoítos contidos nos oocistos previamente identificados morfológicamente/morfometricamente;
- Amplificar o material genético disponível utilizando a técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction);
- Sequenciar regiões dos genes nucleares, usando marcadores que codificam o RNA ribossômico (rRNA) 18S;
- Comparar os resultados dos sequenciamentos genéticos com outras sequências de espécies coccidianas depositadas no GenBank visando a caracterização molecular e análises filogenéticas para posicionamento do táxon.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Os coccídios (Chromista: Apicomplexa: Coccidia)

3.1.1 Definição, classificação e biologia parasitária

Os coccídios são microrganismos unicelulares, eucariontes e heterotróficos, parasitos obrigatórios de metazoários, capazes de formar oocistos, sendo popularmente classificados como protozoários (LEVINE, 1985; LONG, 1990). Entretanto, o termo “protozoário” é controverso, tendo em vista que reúne inúmeros organismos sem relações evolutivas entre si, considerado assim um grupo misto, muito heterogêneo e polifilético (sem um ancestral comum a todos os indivíduos) (ROTHSCHIL, 1989; SCHLEGEL; MEISTERFELD, 2003; ADL et al., 2005). Dessa forma, atualmente, a classificação taxonômica mais bem aceita, define-os como cromistas apicomplexas, pertencentes a subclasse Coccidia Leuckart, 1879, ordem Eimeriida Léger, 1911 (RUGGIERO et al., 2015).

Chromista Cavalier-Smith, 1981 compreende um reino que engloba tanto seres eucariontes autotróficos fotossintetizantes (algas) como heterotróficos (protozoários), sendo assim, bastante diverso e aplicado a vários filos (CAVALIER-SMITH, 2000; CAVALIER-SMITH, 2010). Incluem-se nele, representantes bem conhecidos, como: algas marinhas, dinoflagelados, oomicetos como *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876) (causador da praga da batata ou do tomate), *Paramecium* Müller, 1773 (protozoário ciliado de vida livre) e parasitos de importância médica como *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) Nicolle & Manceaux, 1909 (agente da toxoplasmose) e *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (agente da malária) (RUGGIERO et al., 2015; CAVALIER-SMITH, 2018). Ao que parece, à luz da evolução, o ancestral comum apresentava cloroplastos derivados de um processo de endossimbiose secundária, com os atuais cromistas não fotossintetizantes perdendo secundariamente esta condição (CAVALIER-SMITH, 2000; CAVALIER-SMITH, 2010).

Dentro dos cromistas está inserido o filo Miozoa Cavalier-Smith, 1987, que por sua vez abarca o infra-filo Apicomplexa Levine, 1970 (CAVALIER-SMITH et al., 2004; RUGGIERO et al., 2015). Os apicomplexas são todos parasitos intracelulares obrigatórios; e são assim chamados, porque dispõem de um complexo apical, na extremidade anterior de seu citoesqueleto, para realizar a invasão de uma célula hospedeira (figura 1) (PORTMAN; ŠLAPETA, 2004; MORRISON, 2009; SOUZA; BELFORT JR., 2014; VOTÝPKA et al.,

2016). Integram ao complexo apical, diversas estruturas e organelas altamente especializadas que irão funcionar integradamente durante o parasitismo. Tais como: os anéis apicais, anéis polares, o conoide, microtúbulos subpeliculares, micronemas, róptrias e grânulos densos. Inicialmente, o parasito se liga a moléculas de superfície da célula hospedeira e há um ancoramento celular. Todo esse processo de adesão é dependente de proteínas secretadas pelas micronemas e róptrias, sendo a secreção das róptrias importante também para a formação do vacúolo parasitóforo. Durante seu deslocamento, o parasito (que não dispõe de flagelos, cílios ou outras estruturas locomotoras), executa movimentos de torção e extensão do corpo celular projetando o conoide para fora de maneira intermitente. E após a invasão celular, são secretadas as proteínas dos grânulos densos que ajudam a estabilizar o vacúolo parasitóforo e formam a rede intravacuolar (figura 2). Em apicomplexa, a unidade celular de cada indivíduo é denominada “zoíto”. (PORTMAN; ŠLAPETA, 2004; SOUZA; BELFORT JR., 2014).

Além do mais, taxonomicamente, os coccídios pertencem a classe Coccidiomorpha Doflein, 1901 (antiga classe Conoidasida Levine, 1988) que é assim caracterizada por englobar todos os apicomplexas que possuem o conoide completo. A subclasse Coccidia possui entre suas ordens, a ordem Eimeriida que antigamente era denominada Eucoccidiorida Léger & Duboscq, 1910 e comumente chamada por muitos autores de “coccidia” (de onde deriva o nome aportuguesado “coccídio”) (JIRKŮ et al., 2009). Sendo assim, os “coccídios verdadeiros” estão alocados nessa ordem; e se diferem dos demais grupos por apresentarem desenvolvimento de gametas independentes num ciclo evolutivo marcado pelas etapas de merogonia, gametogonia e esporogonia (BARTA, 2001; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2014; MEHLHORN, 2015). Integram a Eimeriida, famílias importantes de coccídios como Eimeriidae (homoxenos em sua maioria) e Sarcocystidae Poche, 1913 (coccídios heteronexos formadores de cistos). Por fim, outro aspecto notável, diretamente ligado a esse grupo é o fato de estarem intimamente relacionados ao parasitismo intestinal de seus hospedeiros metazoários, sobretudo no desenvolvimento gametogônico; embora muitas espécies sejam capazes de parasitar outros órgãos e tecidos (ciclos extra-intestinais) (LEVINE, 1985; LONG, 1990; MEHLHORN, 2015; TAYLOR et al., 2017; DUBEY, 2020).

Portanto, em síntese, coccídios são cromistas parasitários intracelulares obrigatórios que dispõem de um complexo apical, com conoide completo, apresentando um ciclo dividido em merogonia, gametogonia e esporogonia; sendo capazes de, ao final dele, formar oocistos decorrentes de um processo gametogônico independente, para assim, assegurar sua propagação e transmissão para outros hospedeiros.

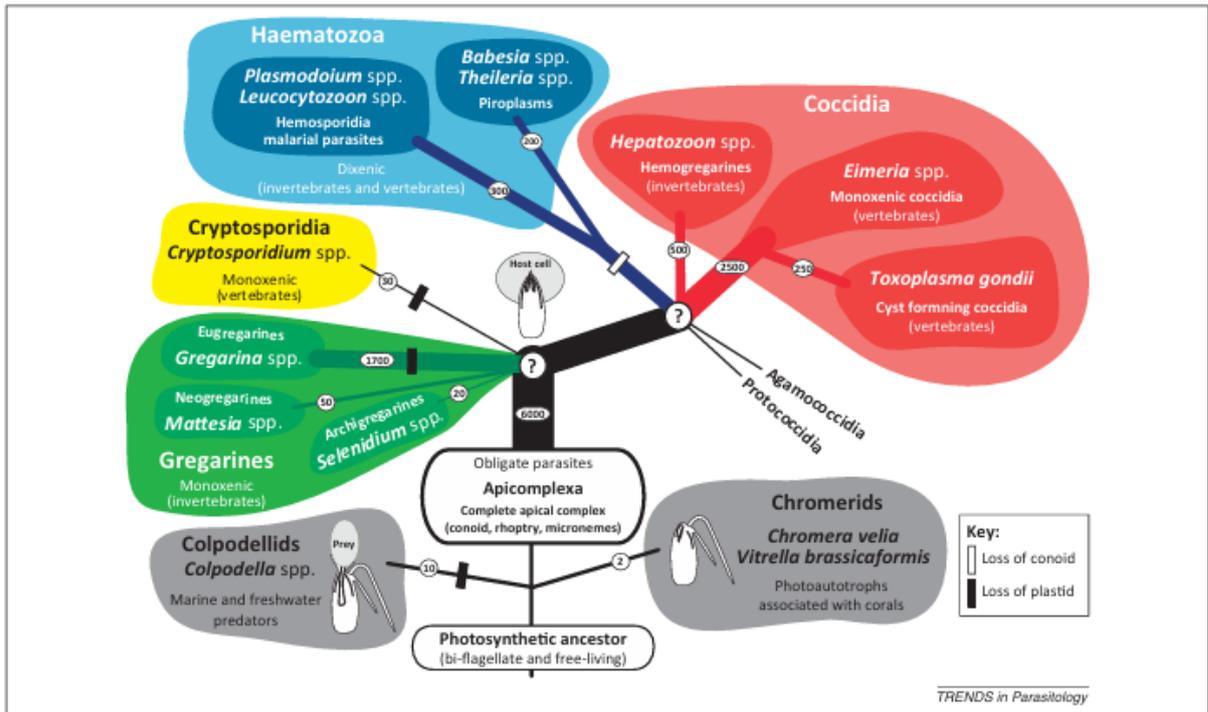


Figura 1 – Esquematização da sistemática de Apicomplexa. Fonte: Portman e Šlapeta (2004).

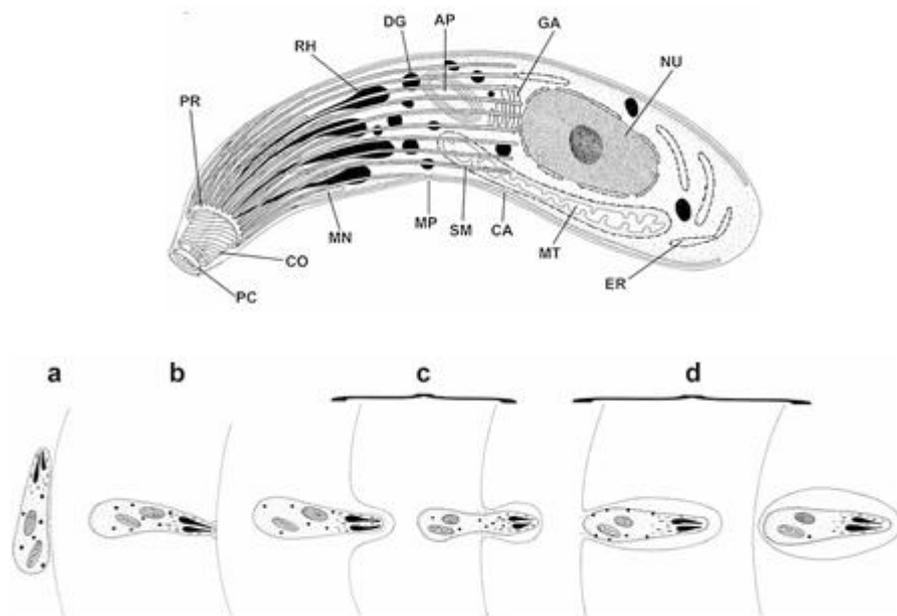


Figura 2 – Citoesqueleto e processo de internalização de apicomplexas na célula hospedeira. Na imagem, as siglas representam: AP (apicoplasto), CA (alvéolos corticais), CO (conoide), DG (grânulos densos), ER (retículo endoplasmático), GA (aparelho de Golgi), MN (micronemas), MP (microporo), MT (mitocôndria), NU (núcleo), PC (anéis pré-conoidais), PR (anel polar), RH (roptrias) e SM (microtúbulos subpeliculares). Logo abaixo, representam-se em “a” contato primário do zoíto sem

orientação; em “b” fixação seguida de reorientação apical; em “c” indução do vacúolo parasitóforo e em “d” translocação do zoíto para o vacúolo. Fonte: Votýpka et al. (2016).

3.1.2 Diversidade e um breve histórico

O tema acerca da biodiversidade de coccídios (e protozoários de uma maneira geral) é algo instigante e já pautou diversas discussões entre os estudiosos. Nos primórdios da protozoologia, quando os protozoários começaram a ser estudados, uma organização básica, os separavam de acordo com seus meios de locomoção. Assim, foram agrupados os ciliados, flagelados e os rizópodes (aqueles que se utilizam de pseudópodes). Porém, existia um vasto grupo que carecia de estruturas locomotoras, sendo denominado de esporozoários. Os esporozoários logo despertaram atenção especial por serem todos parasitos intracelulares obrigatórios e com isso, começaram a ser estudados mais a fundo. E é neste último grupo onde os coccídios se inserem (LEVINE et al., 1980; CHURCHILL, 1989; POLJANSKY, 1992). Cabe salientar que, como já supracitado, o termo “protozoário” é uma aplicação genérica a vários grupos (muita das vezes sem correlação entre si) e por isso, atualmente, sem validade taxonômica (CHURCHILL, 1989; POLJANSKY, 1992).

Em 1980, pesquisadores do Comitê de Sistemática e Evolução da Sociedade de Protozoólogos, em um extenso trabalho de revisão, afirmaram que à época, o sub-reino Protozoa Goldfuss, 1818 detinha mais de 65.000 espécies nomeadas, das quais mais da metade eram fósseis e aproximadamente 10.000 parasitos. Entre as espécies vivas, incluíam cerca de 250 rizópodes parasitários e 11.300 de vida livre; 1.800 flagelados parasitários e 5.100 de vida livre; 2.500 ciliados parasitários e 4.700 de vida livre; e 5.600 “Sporozoa” parasitos (incluindo Apicomplexa Levine, 1970; Microspora Sprague, 1977; Myxozoa Grassé, 1970 e Ascetospora Sprague, 1979). E ainda assim, os autores previram que esses números seriam assustadoramente maiores nas décadas seguintes, dada a inexploração da área (LEVINE et al., 1980). Já em 1988, Levine em seu artigo “Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa”, contabilizou que, para o então filo Apicomplexa existiam 4.516 espécies nomeadas distribuídas em 339 gêneros, mas considerou que o número de espécies crescia progressivamente. Como ficou demonstrado pelo autor, somente em Eimeriorina Léger, 1911 (antiga subordem), entre os anos 1950 a 1987, o número de espécies saltou de 610 para 1.771 (LEVINE, 1988). Segundo Tenter et al. (2002), no início do século XXI o número de protozoários pode ter ultrapassado a marca de 100.000 espécies.

É curioso perceber que os coccídios figuram entre os primeiros microrganismos a serem visualizados em microscopia. Isso porque, em 1674, Anton van Leeuwenhoek, conhecido como o “pai da microbiologia”, observou em um microscópio rudimentar, estruturas globulares extraídas da bile de um coelho. Hoje em dia, acredita-se que na verdade, essas se tratavam de oocistos de *Eimeria stiedae* (Lindemann, 1865) Kisskalt & Hartmann, 1907, uma das principais espécies de coccídios que acometem coelhos, notadamente caracterizada por um ciclo extra intestinal no epitélio hepático e ductos biliares (LEVINE, 1973; DUSZYNSKI et al., 1998b; BERTO, 2010). A primeira descrição publicada de um estágio coccidiano por Hake em 1839 sugeriu que os oocistos não esporulados de *E. stiedae* eram glóbulos de pús em fígados de coelho (LEVINE, 1973; DUSZYNSKI et al., 1998b). Isso se justifica, pois, quando os coccídios foram reconhecidos pela primeira vez como protozoários, seus complexos ciclos de vida eram desconhecidos, por isso, estudos anteriores colocaram o estágio exógeno (oocisto) em um gênero e os estágios endógenos (merontes, gametócitos) em gêneros, famílias ou mesmo subordens diferentes (DOBELL, 1922; LEVINE, 1982; DUSZYNSKI et al., 1998b). Esses aspectos sobre a biologia dos coccídios só foram desvendados com os estudos pioneiros de Tyzzer (1929) e Tyzzer et al. (1932) ao investigar sobre a coccidiose em aves domésticas, traçando as bases conceituais do ciclo desses organismos, com cada vez mais novos estudos se sucedendo posteriormente (BERTO, 2010).

Eimeriida é a ordem mais diversa dentro da subclasse Coccidia (JIRKŮ et al., 2009). Para se ter uma ideia, em uma estimativa feita por Duszynski et al. (2000) essa ordem possuía nos anos 2000, mais de 2.000 espécies registradas; e segundo apontou Votýpka et al. (2016), só para o gênero *Eimeria* são aproximadamente 1.700 espécies descritas. Esse número é indubitavelmente maior nos dias atuais. As estimativas da diversidade de coccídios sugerem que mesmo nos hospedeiros mais estudados, como os roedores, apenas cerca de 8% do total esperado de espécies de coccídios seja conhecido (TENTER et al. 2002; JIRKŮ et al., 2009). Existem muitos enclaves sobre a biodiversidade coccidiana, com muitos grupos hospedeiros pouco investigados. Conforme dito por Duszynski et al. (2007), especialmente, animais ectotérmicos são muito pouco estudados a esse respeito, com o verte menos explorado sendo os hospedeiros anfíbios. Berto et al. (2014) também afirma que *Eimeria* é o gênero com maior biodiversidade dentro Eimeriida, sendo incrivelmente relatada para todas as classes de vertebrados e muitos grupos de invertebrados.

Nessa mesma linha, com base apenas nas características morfológicas dos oocistos, Levine (1962) estimou que poderiam haver 2.654.736 oocistos esporulados estruturalmente

diferentes (espécies) somente em *Eimeria*. A verdade é que estimar toda essa diversidade com alguma precisão, torna-se uma tarefa hercúlea, praticamente inviável. Isso porque, existem oocistos de espécies hospedeiras não relacionadas que parecem quase idênticos em tamanho e morfologia (DUSZYNSKI et al., 1998b); e em outros casos, existem espécies coccidianas altamente polimórficas, produzindo oocistos que variam muito em tamanho e aparência (DUSZYNSKI, 1971; PARKER; DUSZYNSKI, 1986; ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2024). Segundo Berto et al. (2010) e Ghimire (2010) há ainda o problema do pseudoparasitismo que pode levar à descrição equivocada de muitas espécies coccidianas.

Os levantamentos mais recentes que se têm na literatura, dão conta de que a biodiversidade de coccídios é muito negligenciada ainda nos dias atuais. Morrison (2009) em seu trabalho de revisão “Evolution of the Apicomplexa: where are we now?” afirma que os apicomplexas detêm cerca de 6.000 espécies nomeadas, mas talvez apenas 0,1% do número total de espécies tenham sido registradas até o momento (com um total estimado em torno de 1,2 a 10 milhões). Em outro artigo de revisão, Duszynski (2021) tece longos comentários acerca da biodiversidade coccidiana inventariada até o momento. A sub amostragem é chocante! O autor concentrou seus esforços em apenas 12 grupos de vertebrados (sendo 7 de mamíferos, 4 de répteis e 1 de anfíbios), os quais estudou significativamente nas últimas décadas. Esses vertebrados totalizam juntos 15.225 espécies, das quais apenas 899 (5,8%) foram examinadas em algum momento para coccídios (DUSZYNSKI, 2021).

Sendo assim, todos esses dados apresentados permitem traçar um panorama das possibilidades e desafios de se trabalhar com taxonomia de coccídios. Além disso, como apontado por Bandoni e Duszynski (1988), um obstáculo adicional diz respeito a preservação desse material taxonômico, uma vez que os oocistos não se preservam bem ao longo do tempo, impossibilitando assim, estudos comparativos entre espécimes de diferentes coleções, tal como fazem os taxonomistas de metazoários ou botânicos.

3.1.3 Morfologia e identificação

Uma das maneiras mais seguras e confiáveis de se identificar coccídios é através da caracterização morfológica e morfométrica de seus oocistos (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BERTO et al., 2014). Desde o final do século XIX, quando as espécies coccidianas começaram a ser descritas, suas descrições se basearam, primordialmente, em aspectos morfológicos de

oocistos esporulados. Os oocistos correspondem a estruturas exógenas do ciclo de replicação desses cromistas (análogas a ovos de helmintos) que lhes conferem resistência ambiental, protegendo assim os esporozoítos, que são as formas evolutivas encontradas nesses estágios. Os oocistos podem ser recuperados pelas fezes ou urina do hospedeiro (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2014).

De uma maneira preliminar, a distinção dos diferentes gêneros de coccídios pode ser feita mediante a observação da configuração interna do oocisto, pela relação do número de esporocistos e esporozoítos presentes dentro de um oocisto esporulado (figura 3). Estruturalmente, emprega-se uma divisão entre oocisto, esporocisto e esporozoíto. Os oocistos revestem tudo, sendo a barreira mais externa de proteção. Os esporocistos são revestidos pelo oocisto, mas possuem os esporozoítos no seu interior. Os esporozoítos são a “unidade biológica”, o organismo vivo propriamente dito. Alguns gêneros são poliesporocísticos, isto é, possuem vários esporocistos (e.g. *Eimeria*); já outros, sequer os possuem (e.g. *Tyzzeria*) (KHEYSIN, 1972; BERTO et al., 2014; MEHLHORN, 2015).

De acordo com Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014), especialmente oocistos eimerídeos conferem detalhamento morfológico suficiente para se identificar satisfatoriamente um coccídio ao seu nível específico, isto é, à nível de espécie. Isso é possível ao se atentar às chaves dicotômicas e proceder a morfologia/morfometria comparada com as possíveis espécies esperadas para cada grupo hospedeiro. Por exemplo, o oocisto, que pode conter inúmeras formas e tamanhos a depender da espécie, é formado por uma parede bicamada (interna e externa) onde a camada externa pode apresentar também diferentes texturas, variando entre graus de aspereza, rugosidade e até ser completamente lisa. Pode apresentar micrópilas que são descontinuidades da parede de uma das camadas, que por sua vez podem ser acompanhadas por um capuz polar. O oocisto pode ter em seu interior, grânulos polares ou resíduos do oocisto. O esporocisto também pode variar em tamanho e formato a depender da espécie. Estão inseridos nele, os corpos de Stieda, sub-Stieda e para-Stieda (caracteres taxonômicos cruciais). Os esporocistos podem apresentar também resíduos do esporocisto e comportam os esporozoítos. Os esporozoítos, por sua vez, têm um formato vermiforme e são dotados de corpos refráteis anteriores e posteriores, um núcleo central e do complexo apical (figura 4).

Embora a morfologia continue sendo ainda a base de identificação, as técnicas moleculares tem tido cada vez mais aplicabilidade nos dias atuais (TENTER et al., 2002; MORRISON, 2008; BERTO et al., 2014).

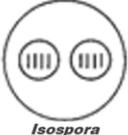
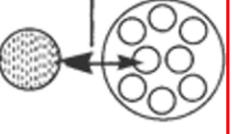
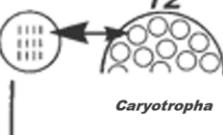
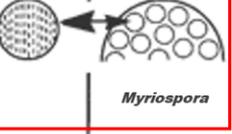
Número de esporocistos por oocisto	Número de esporozoítos por esporocisto						
	1	2	3	4	8	16	n
0				 <i>Cryptosporidium</i>	 <i>Pfeifferinella</i> <i>Schellackia</i> <i>Tyzzeria</i>		 <i>Lankesterella</i>
1				 <i>Mantonella</i>	 <i>Caryospora</i> <i>Eumonospora</i>	 <i>Silvatoshellina</i>	
2		 <i>Cyclospora</i>		 <i>Isospora</i> <i>Cystoisospora</i> <i>Toxoplasma</i> <i>Sarcocystis*</i>	 <i>Dorisiella</i>		
4		 <i>Acroeimeria</i> <i>Calyptospora</i> <i>Choleoimeria</i> <i>Eimeria</i>		 <i>Wenyonella</i>			 <i>Angeiocystis</i>
8		 <i>Octosporella</i>				 <i>Yakimovella</i>	
16		 <i>Hoarella</i>		 <i>Pythonella</i>			
n	 <i>Barroussia</i> <i>Echinospora</i>	 <i>Merocystis</i> <i>Pseudoklossia</i>	 <i>Aggregata</i>		 <i>Caryotropha</i>	 <i>Myriospora</i>	

Figura 3 – Diagrama da relação do número de esporocistos e esporozoítos por oocistos como parâmetro de identificação dos diferentes gêneros de coccídios. Aqueles marcados em vermelho, representam

gêneros contestados por Duszynski et al. (2000), Ghimire (2010) e Adl et al. (2019). A marcação de * no quadrante 2:4, simboliza a existência de outros gêneros com as mesmas características. Fonte: adaptado de Mehlhorn (2015).

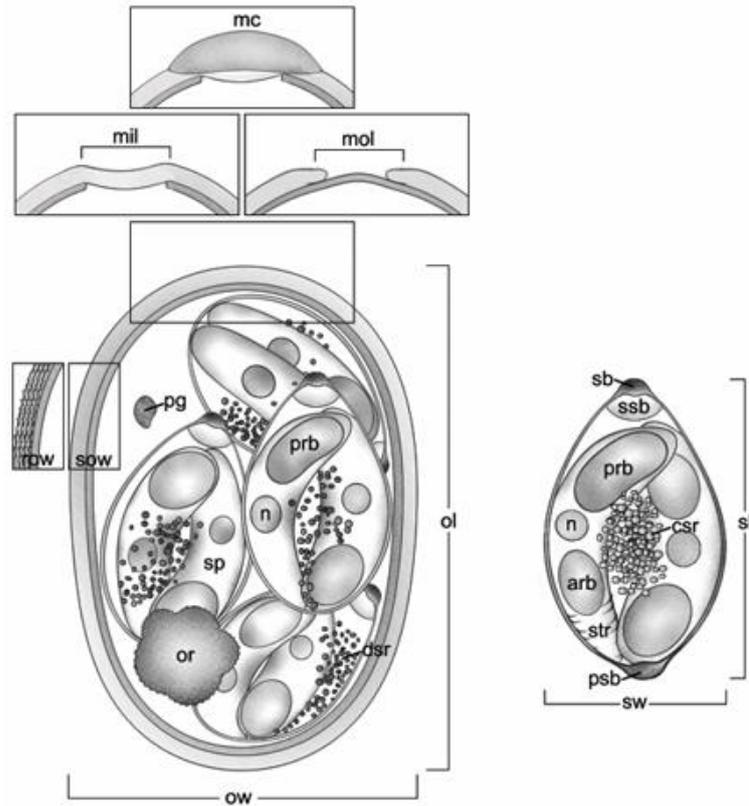


Figura 4 – Estruturas morfológicas e aspectos morfométricos de um oocisto esporulado de Eimeriidae: (ow) largura do oocisto; (ol) comprimento do oocisto; (pg) grânulo polar; (or) resíduo de oocisto; (row) parede externa áspera ou (sow) lisa; micrópila em (mil) camada interna ou (mol) camada externa; (mc) capuz da micrópila; (sw) largura do esporocisto; (sl) comprimento do esporocisto; (sb) corpo de Stieda; (ssb) corpo de sub-Stieda; (psb) corpo de para-Stieda; (csr) resíduo de esporocisto compacto ou (dsr) difuso; (sp) esporozoíto; (prb) corpo refrátil posterior e (arb) anterior do esporozoíto; (n) núcleo de esporozoíto; e (str) estrias de esporozoítos. Fonte: Berto et al. (2014).

3.1.4 Ciclo biológico dos coccídios (Apicomplexa: Eimeriidae)

Os coccídios, por serem bastante diversos, podem apresentar diferentes ciclos biológicos a depender do grupo estudado. Aqui, será focado aspectos sobre ciclo de Eimeriidae, família onde o gênero *Tyzzeria* está situado.

Os eimerídeos possuem um ciclo biológico homoxeno (mas há exceções), onde todo o parasitismo se dá num único hospedeiro, sendo marcado pelas fases de merogonia, gametogonia e esporogonia (figura 5). O hospedeiro parasitado elimina, junto às fezes, os oocistos (estágios exógenos do parasito) no meio ambiente. Inicialmente, esses oocistos se encontram não esporulados e não infectantes (imaturos), pois não concluíram a meiose esporogônica; sendo então caracterizados como um conteúdo amorfo e compacto (denominado de esporoblasto), revestido pela parede do oocisto. Sob condições ideais de umidade, temperatura e oxigenação do meio externo, sofrem o processo de esporogonia (ou esporulação), ocorrendo a maturação das estruturas internas do oocisto com desenvolvimento pleno dos esporozoítos. É através dessa etapa que os oocistos se tornam infectantes aos seus hospedeiros e que é possível identificar morfologicamente as espécies (LEVINE, 1961; KHEYSIN, 1972; LONG, 1990; GARDINER et al., 1998; TAYLOR et al., 2017; DUBEY, 2020).

No ambiente contaminado, o oocisto é então ingerido por um hospedeiro susceptível (transmissão feco-oral) e dentro do organismo animal, passará pelo trato digestório até seu completo excistamento e liberação dos esporozoítos. Em aves, por exemplo, através de ações mecânicas da moela, a parede do oocisto é rompida liberando então os esporocistos. Estes sofrerão a ação química de sais biliares e enzimas como a tripsina, rompendo-se e liberando os esporozoítos no lúmen intestinal (ALLEN; FETTERER, 2002). Esses esporozoítos, por sua vez, vão invadir os enterócitos da mucosa intestinal e lá assumem a forma de trofozoítos (forma arredondada) onde posteriormente irão crescer e aumentar de tamanho formando os merontes. No interior da célula, essa massa celular que constitui o meronte sofre o processo de cariocinese (divisões mitóticas do núcleo) e citocinese (divisões mitóticas do citoplasma), gerando assim, várias formas celulares individualizadas, denominadas merozoítos. Assim, ao final do processo, haverá um meronte contendo vários merozoítos no seu interior. Essa etapa corresponde a reprodução assexuada desse Chromista, denominada de merogonia (KHEYSIN, 1972; LONG, 1990; GARDINER et al., 1998; BOWMAN, 2010; TAYLOR et al., 2017).

Esses merontes hipertrofiam cada vez mais a célula (dada a sucessiva multiplicação dos merozoítos) até romperem-na e com isso, liberarem os merozoítos no lúmen. Estes, por sua vez, irão parasitar outros enterócitos podendo dar continuidade ao ciclo assexuado (formando merontes de 2^a, 3^a e 4^a geração) aumentando, conseqüentemente, cada vez mais a parasitemia do hospedeiro. Entretanto, eles também podem se diferenciar em gametócitos que são formas celulares com divisões meióticas, direcionadas à formação de gametas. Isso nada mais é do que a gametogonia, início da reprodução sexuada do ciclo. Nesse processo, há o desenvolvimento

de macrogametócitos e microgametócitos. O macrogametócito possui um macrogameta (gameta feminino) no seu interior que é sésil, já o microgametócito possui vários microgametas (gametas masculinos) no seu interior que são flagelados e móveis. Dessa forma, são os microgametas que irão de encontro ao macrogameta, ocorrendo assim, a fertilização (singamia). Da fertilização se originará um zigoto que posteriormente se transformará no oocisto que será excretado novamente pelas fezes, dando continuidade ao ciclo. A capacidade de formar oocistos como diapausa do ciclo, é uma importante adaptação evolutiva, pois garante-lhes resistência ambiental e sobrevivência num meio hostil, bem como, propiciam sua dispersão para alcançar novos hospedeiros (FAYER, 1980). Portanto, merogonia e gametogonia são denominadas fases endógenas do ciclo e a esporogonia fase exógena. (LEVINE, 1961; KHEYSIN, 1972; LONG, 1990; GARDINER et al., 1998; TAYLOR et al., 2017; DUBEY, 2020).

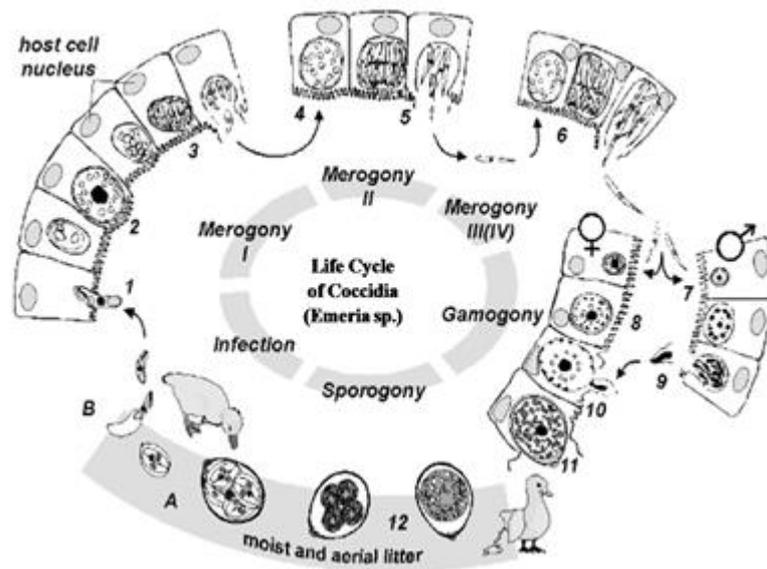


Figura 5 – Ilustração do ciclo de eimerídeos. Fonte: Abebe e Gugsá (2018).

3.1.5 Especificidade parasitária

Em parasitologia, o conceito de especificidade é de extrema relevância pois compreender o ciclo, conhecer os hospedeiros e as interações ecológicas envolvidas, revelam a dinâmica completa da biologia de um parasito, sendo inclusive, muito valioso para traçar estratégias de cunho sanitário e epidemiológico (BUSH et al., 1997; BOWMAN, 2010). Atribui-se o termo estenoxeno para parasitos com alta especificidade parasitária, isto é, àqueles altamente especializados a um determinado grupo de hospedeiros, capazes de parasitar um

grupo restrito apenas. Já o termo eurixeno é atribuído a parasitos com baixa especificidade, capazes de parasitar uma gama maior de hospedeiros, sendo assim, menos específicos e mais generalistas. Existe ainda o termo oligoxeno para parasitos cujos hospedeiros possuem um grau de parentesco próximo, geralmente para a mesma família de hospedeiros (e.g. cão e lobo) (LONG, 1990; MONTEIRO, 2017).

Com isso em mente, é impossível estabelecer um padrão de especificidade comum a todos coccídios, tendo em vista a diversidade de grupos no qual o termo se refere (MARQUARDT, 1981). Os eimerídeos costumam ser mais restritivos, com cada espécie sendo específica a determinados grupos de hospedeiros, porém, sobretudo para coccídios que perfazem ciclos heteroxenos, como os sarcocistídeos, essa dinâmica costuma variar, envolvendo hospedeiros intermediários e definitivos bem diferentes. Segundo Fayer (1980), várias espécies de *Sarcocystis* Lankester, 1882 possuem uma faixa estreita de hospedeiros intermediários e uma ampla gama de hospedeiros definitivos, já as espécies de *Frenkelia* Biocca, 1968 parecem ter uma ampla gama de hospedeiros intermediários e uma estreita gama de hospedeiros definitivos. Long (1990) também reforçou esses argumentos acerca de *Sarcocystis* mostrando que principalmente as espécies que parasitam mamíferos de grande porte, exibem um grau notável de especificidade para seus hospedeiros intermediários, sendo mais específicas a esse tipo de hospedeiro. Outro exemplo, *Toxoplasma gondii*, pode parasitar praticamente todo animal de sangue quente, embora só complete seu ciclo em felídeos (FAYER, 1980; MARQUARDT, 1981; LONG, 1990; SOUZA; BELFORT JR., 2014).

Em se tratando dos eimerídeos, especificamente, este aspecto de especificidade parasitária chama muita atenção. Isto ocorre porque este grupo coccidiano é geralmente específico ao nível de família dos seus hospedeiros e, em alguns casos, ao nível de gênero (LONG; MILLARD, 1979; MARQUARDT, 1981; LONG; JOYNER, 1984; DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BERTO et al., 2014). Assim, por exemplo, uma espécie de *Eimeria* que parasita a galinha doméstica (pertencente à família Phasianidae Vigors, 1825) não é esperada para a galinha d'Angola (pertencente à família Numididae Reichenbach, 1850). Existem vários trabalhos que discorrem sobre esse assunto (JOYNER; LONG, 1974; VETTERLING, 1976; LONG; MILLARD, 1979; BARTA et al., 1997; VRBA; PAKANDL, 2015). De acordo com Joyner e Long (1974) em trabalho intitulado "The Specific Characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl", *Eimeria* spp. possuem forte especificidade com seus hospedeiros, sendo incomum a extrapolação de uma espécie parasitando um grupo de hospedeiros fora do mesmo gênero, podendo até haver excistamento e invasão celular no

hospedeiro externo, mas o ciclo tende a não se completar pois o coccídio não consegue desenvolver satisfatoriamente alguns de seus estágios essenciais, sejam eles na merogonia, gametogonia ou esporogonia. Assim, a infecção natural fora do seu grupo específico de hospedeiros torna-se inviável. Long e Millard (1979) também demonstraram isso em seu trabalho " Rejection of *Eimeria* by foreign hosts", onde oocistos de *E. maxima* Tyzzer, 1929 (espécie da galinha) inoculados em galinhas d'Angola não se desenvolveram, esporozoítos de *E. tenella* (Tyzzer, 1929) (espécie da galinha) apresentaram baixa infectividade após 48 h de contato in vitro com macrófagos peritoneais de galinhas d'Angola e perus; e esporozoítos de *E. grenieri* Yvoré & Aycardi, 1967 (espécie da galinha d'Angola) foram destruídos por macrófagos retirados de galinhas comuns. Além disso, Yvoré e Aycardi (1967) não foram capazes de transmitir *E. grenieri* para galinhas domésticas ou perus; e as tentativas experimentais de transmissão de *E. numidae* Pellérdy, 1962 (espécie da galinha d'Angola) por Pellérdy (1962) não resultaram em infecções em galinhas domésticas. As tentativas de Johnson (1923) de inocular *E. tenella* em patos de 4 meses de idade não tiveram sucesso. Outra tentativa malsucedida inclui Tyzzer (1929) que não conseguiu infectar galinhas com *E. meleagridis* Tyzzer, 1927 de perus; e perus com *E. acervulina* Tyzzer, 1929 de galinhas. Tiboldy (1933) também descobriu que *Eimeria* spp. de patos, gansos e galinhas eram estritamente específicas do hospedeiro.

Para o gênero *Tyzzeria*, estudos também já foram feitos nesse sentido. Nieschulz (1947) foi o primeiro a utilizar transmissão cruzada para testar a especificidade parasitária de *T. parvula*. Depois Klimeš (1963) e Svanbaev e Rakhmatullina (1967) realizaram estudos com infecção experimental de *T. parvula* em marrecos *Anas platyrhynchos* Linnaeus, 1758. Nenhum desses autores obtiveram sucesso nos seus testes e verificaram, portanto, que essa espécie coccidiana era restrita aos gansos. Posteriormente, Berto et al. (2007) realizaram o teste de susceptibilidade de *T. parvula* nos anatíneos *Cairina moschata* (Linnaeus, 1758) e *A. platyrhynchos*, livres de coccídios, com o propósito de verificar novamente a especificidade desse Chromista. Para tal, os autores inocularam por via oral 500µl de solução concentrada contendo oocistos esporulados em 1 pato (*C. moschata*) e 1 marreco (*A. platyrhynchos*). Pela estimativa apresentada pelos autores, em 10µl de solução, foram contabilizados em média 31 oocistos; o que totalizou aproximadamente 1550 oocistos e 12400 esporozoítos (já que cada oocisto possui 8 esporozoítos) inoculados por animal. Diariamente, por um período superior a 10 dias após a infecção (visto que o período pré-patente varia entre 4 a 5 dias), exames de fezes foram realizados para atestar a eliminação de oocistos. Contudo, oocistos não foram eliminados

em nenhuma das aves, configurando assim mais uma vez resultado negativo e corroborando com trabalhos anteriores. Este, por sua vez, foi o primeiro trabalho a apontar que *C. moschata* também não é susceptível a infecção por *T. parvula* (BERTO et al., 2007; BERTO, 2008).

Dessa forma, ao que se tem registro na literatura, *Tyzzeria* spp. relacionadas a aves apresentam uma especificidade a nível de subfamília de seus hospedeiros. A família Anatidae (que integra patos, gansos, marrecos e cisnes) possui subfamílias como Anserinae Vigors, 1825 (onde se encontram os gansos e cisnes) e Anatinae Vigors, 1825 (onde se encontram patos e marrecos) (SICK, 1997). Assim, *T. parvula*, uma espécie típica de ganso, fica restrita à subfamília Anserinae, enquanto *Tyzzeria pernicioso* Allen, 1936, uma espécie típica de marrecos, já é restrita à subfamília Anatinae (BERTO, 2008).

Alguns autores consideram que a base para essa especificidade parasitária está mais relacionada com a imunidade dos hospedeiros. De fato, há alguns trabalhos onde a administração de imunossupressores propiciou o desenvolvimento de espécies eimerianas fora dos seus hospedeiros habituais. Todd et al. (1971) descobriram que *E. vermiformis* Ernst, Chobotar & Hammond, 1971 de camundongos adentrou no epitélio intestinal de rato, mas não sofreu divisão nuclear, a menos que os ratos fossem tratados com dexametasona, caso em que se desenvolveram merontes e os oocistos foram eliminados. McLoughlin (1969) obteve desenvolvimento completo de *E. meleagridis* Tyzzer 1929 (de perus) em galinhas tratadas com dexametasona. No entanto, esse mesmo autor, também utilizando tal fármaco, não conseguiu obter o desenvolvimento de *E. tenella* (de galinhas) em perus; e Fitzgerald e Mansfield (1972) não conseguiram obter o desenvolvimento de *E. stiedae* (de coelhos) em cordeiros. Esses indícios mostram que a imunidade do hospedeiro pode até desempenhar algum papel na especificidade do parasito, mas certamente outros fatores mais determinantes, também estão envolvidos (FAYER, 1980).

Para Marquardt (1981) existe um forte componente genético na especificidade coccidiana, o que explicaria o possível parasitismo girando apenas entre hospedeiros aparentados. Este autor se aprofunda ainda mais, afirmando que a capacidade de crescimento do parasito depende da sua sinalização à célula hospedeira onde através de reações bioquímicas, esta passará a produzir o que o parasito necessita. Há um sinal primorosamente codificado que o parasito envia à célula hospedeira que de alguma forma ativa o genoma celular. Em alguns casos, a célula hospedeira não consegue receber esse sinal pois o coccídio está no hospedeiro errado. Por fim, segundo aponta Dubey (2020), a falta de variação nas transcriptomas do

parasito, independentemente da imunocompetência do hospedeiro ou do histórico de exposição, indica uma falta de plasticidade que poderia limitar o seu potencial de mudança entre hospedeiros, explicando em parte a elevada especificidade de hospedeiro para muitas espécies de *Eimeria*. Dessa forma, essa alta especificidade está diretamente relacionada à decodificação molecular da interação célula-parasito.

3.1.6 Grupos ancestrais e relações evolutivas

O estudo da evolução nos permite entender como se deu o surgimento da abundante diversidade de seres vivos que encontramos atualmente. Um pressuposto crucial para esse entendimento é o de que todos os organismos, de alguma forma, descendam de uma ancestralidade comum, que ao longo do tempo passou por extenuantes e sucessivas mudanças de caracteres hereditários, culminando assim numa vasta variedade de espécies. Ou seja, uma forma evolutiva primordial que, permeada por fatores não aleatórios (como a seleção natural) ou aleatórios (como a deriva genética), pôde acumular diversas alterações genóticas e fenóticas que resultaram em múltiplas ramificações, dando origem a diversos grupos de seres vivos. Entretanto, para muitos desses grupos bióticos, ainda nos dias de hoje, a compreensão plena de como esse processo evolutivo se deu ou as circunstâncias que condicionaram a ele, continuam obscuras ou mesmo confusas (MAYR, 2001; KUTSCHERA; NIKLAS, 2004; FUTUYAMA, 2005).

Tendo isso em vista, análises comparativas entre diferentes grupos de organismos a despeito de aspectos biológicos, morfológicos ou fisiológicos, podem trazer pistas sobre uma ancestralidade, ressaltando evidências quanto a suas relações evolutivas. Com isso, a cladística (também chamada de sistemática filogenética), busca inferir sobre essas relações de parentesco; e para melhor interpretar os dados, nomeia os caracteres de acordo com a cronologia de surgimento dos mesmos. Por exemplo, dentro do processo evolutivo o termo plesiomorfia se refere a uma estrutura ou condição mais antiga, original, que foi alterada resultando em outra mais recente. Por outro lado, apomorfia é a estrutura ou condição derivada, mais recente em uma série de transformações surgidas por modificações de uma condição mais antiga. Há ainda os termos sinapomorfia e simplesiomorfia que designam caracteres compartilhados. Sinapomorfia é quando todas espécies do grupo analisado compartilham uma apomorfia, já simplesiomorfia é quando todas espécies do grupo analisado compartilham uma plesiomorfia. Autapomorfias são casos particulares em que uma sinapomorfia é compartilhada no cladograma

por um único táxon terminal. Arqueomorfas são as condições apomórficas de caracteres de um grupo, mas que são sinapomórficas para um nível mais abrangente de generalidade. E por fim, homoplasia é quando uma mesma condição apomórfica surge mais de uma vez, independentemente (AMORIM, 2002; FUTUYAMA, 2005). Com esses conceitos em mente, podemos agora explicar melhor sobre a evolução dos coccídios.

Os apicomplexas são classificados junto com ciliados e dinoflagelados dentro do superfilo Alveolata Cavalier-Smith, 1991. Entretanto, os apicomplexas são organismos puramente parasitários, portanto, a transição da predação para o parasitismo intracelular é provavelmente a característica mais marcante na sua evolução (KOPEČNÁ et al., 2006). A radiação evolutiva dos apicomplexas é datada do período Pré-Cambriano (ESCALANTE; AYALA, 1995; KOPEČNÁ et al., 2006), quando se supõe que organismos multicelulares tenham surgido. Isto claramente antecede o aparecimento dos vertebrados e, muito provavelmente, também dos invertebrados (LYNCH, 1999; KOPEČNÁ et al., 2006).

Indiscutivelmente, os apicomplexas são muito bem sucedidos evolutivamente, dada a sua alta diversidade, especialização em hospedeiros, complexidade de ciclos e biologia. São organismos encontrados em todos os tipos de ambientes e parasitam todos os tipos de metazoários, envolvendo inclusive, teias tróficas entre predadores, presas e vetores em seus ciclos. Incluem-se no infra-filo Apicomplexa, diversos grupos morfologicamente e ecologicamente distintos, como: gregarinas, criptosporídios, coccídios, hemosporídios e piroplasmas. A maioria dos apicomplexas possui uma organela única chamada apicoplasto, que é um plastídio não fotossintético altamente reduzido, que retém poucas funções essenciais para a sobrevivência do parasito. O infra filo evoluiu de um flagelado fotossintético, com os apicomplexas formando um grupo irmão a cromistas marinhos e de água doce de vida livre (VOTÝPKA et al., 2016).

Dentro dos apicomplexas, temos classes como Coccidiomorpha e Gregarinomorpha Grassé, 1953 (RUGGIERO et al., 2015; BRANDS, 2024). Esses dois táxons, traçam entre si, um salto evolutivo importante. Estamos falando agora de dois grupos: das gregarinas (inseridas dentro de Gregarinomorpha) e dos coccídios (inseridos dentro de Coccidiomorpha). As gregarinas, representam nesse caso um grupo ancestral, guardando consigo plesiomorfias (BERTO et al., 2014). Uma dessas plesiomorfias mais importante é a sizígia. A sizígia corresponde a um tipo de reprodução sexuada primitiva, onde a formação dos gametócitos é dependente de um contato íntimo entre o macro e microgametócito, mediante a um

emparelhamento celular dos trofozoítos, onde uma parede gametocística se forma ao redor do par de gametócitos que então começa a produzir os gametas. A reprodução por sizígia tem uma capacidade limitada de produzir microgametas, e esses gametócitos maduros possuem uma localização extracelular, mas adjacente à célula hospedeira (epicelular). Por outro lado, os coccídios desenvolveram uma gametogonia mais vantajosa evolutivamente. Isso porque o seu desenvolvimento gametogônico é independente, com macrogametócitos e microgametócitos podendo se formar em células separadas e distantes entre si. Seus gametócitos são intracelulares e, nesse caso, a singamia entre os gametas é perfeitamente viável pois o microgametócito é capaz de produzir números significativamente maiores de microgametas que irão percorrer o caminho ao encontro do macrogameta. Além do mais, essa apomorfia garante-lhes uma maior variabilidade genética, assegurando de forma mais eficiente a perpetuação de novas gerações. Outra diferença biológica entre esses dois grupos é que as gregarinas, ao contrário dos coccídios, são parasitos extracelulares na sua grande maioria (LEVINE, 1988b,c; COX, 1994; TENTER et al., 2002; BARTA, 2001; BERTO et al., 2014; VOTÝPKA et al., 2016).

As gregarinas são subdivididas ainda em arquigregarinas, eugregarinas e neogregarinas. As arquigregarinas são o grupo mais basal, sendo encontradas apenas em ambientes aquáticos, parasitando vermes marinhos, por exemplo. Delas, evoluíram as eugregarinas que são o grupo mais diversificado (tanto em número de espécies como em alcance de hospedeiros), sendo encontrado tanto em ambientes aquáticos como terrestres. E as neogregarinas, foram o último grupo a surgir, sendo encontradas exclusivamente em invertebrados terrestres (LEANDER, 2008; VOTÝPKA et al., 2016). Segundo Cox (1994), seus ciclos biológicos são essencialmente semelhantes, mas em arquigregarinas e neogregarinas uma fase esquizogônica (reprodução assexuada) precede a gametogonia e isso está ausente em eugregarinas. Com isso, Wenyon (1926) considerou agrupar as arquigregarinas e neogregarinas como “esquizogregarinas”. Todavia, Grassé (1953) argumentou que as arquigregarinas, como grupo ancestral, deram origem às eugregarinas que perderam a esquizogonia e que esta condição foi secundariamente readquirida pelas neogregarinas. Ainda segundo Cox (1994), a ligação das arquigregarinas com as neogregarinas não é sustentável pois existem grandes diferenças entre os dois grupos, incluindo o fato das arquigregarinas serem predominantemente extracelulares, enquanto as neogregarinas são intracelulares. Os ciclos de vida das gregarinas sugerem que elas sejam parasitos menos evoluídos, pois também é observado que seus esporozoítos tendem a ser retidos no corpo do hospedeiro até serem liberados quando ele morre e se decompõe, um método de disseminação muito dispendioso. Este método de dispersão parece eficaz apenas quando os

hospedeiros vivem em contato próximo uns aos outros (WENYON, 1926; LEVINE, 1985; COX, 1994).

Apesar da reprodução assexuada já ser observada em algumas espécies de gregarinas, essa condição só foi se estabelecer em sua plenitude em Coccidiomorpha. Essa característica biológica reprodutiva, permitiu-lhes uma rápida multiplicação e um aumento efetivo da parasitemia no hospedeiro. E dentro de Coccidiomorpha, podemos notar também grupos mais ancestrais aos coccídios, denominados protococcídios. Os protococcídios, por sua vez, estão alocados dentro da ordem Adeleida Léger, 1911 que contempla famílias como Adeleidae Mesnil, 1903; Aggregatidae Labbé, 1899; Haemogregarinidae Neveu-Lemaire, 1901; Hepatozoidae Wenyon, 1926; entre outras (RUGGIERO et al., 2015; BRANDS, 2024). Os protococcídios, também chamados de “coccídios primitivos”, são notadamente conhecidos por parasitarem invertebrados e compartilham com as gregarinas a sizígia. Dessa forma, os protococcídios têm uma simplesiomorfia com as gregarinas (LEVINE, 1985; COX, 1994; UPTON, 2000; BARTA et al., 2012; BERTO et al., 2014). De particular curiosidade é o fato de que, enquanto alguns protococcídios permaneceram homoxenos, outros adotaram ciclos de vida heteroxenos envolvendo vertebrados e invertebrados. Barta (1989) sugere que esses heteroxenos evoluíram de homoxenos que já parasitavam invertebrados. É curioso perceber que essa dualidade de ciclo também é observada nos “coccídios superiores”.

Cabe salientar que, diferentemente dos “coccídios superiores”, as gregarinas e os protococcídios são bem menos estudados. E isso se dá por razões óbvias: coccídios superiores despertam interesse/preocupação médica e zootécnica, tendo em vista que estão diretamente relacionados à impactos socioeconômicos em larga escala na produção animal mundial, além de apresentarem espécies que parasitam humanos. Com isso, esses grupos ancestrais, por não terem essas implicações, muitas vezes, ficam fadados ao esquecimento, com muitas lacunas ainda a serem preenchidas sobre biologia, diversidade, entre outras coisas (LEVINE, 1985; COX, 1994; KOPEČNÁ et al., 2006).

Evolutivamente, os “coccídios superiores” (ou simplesmente coccídios) se encontram apenas na ordem Eimeriida, estando mais associados ao parasitismo de vertebrados. Apresentam grupos que perfazem ciclos heteroxenos, como àqueles pertencentes às famílias Sarcocystidae e Calyptosporidae Overstreet, Hawkins & Fournie, 1984 e outros homoxenos, como na família Eimeriidae. Uma característica que unifica essas famílias dentro de Eimeriida, é o fato desses apicomplexas não apresentarem mais sizígia em um ciclo bem delimitado com

merogonia, gametogonia e esporogonia; sendo, portanto, essa, uma sinapomorfia entre todos os coccídios (LEVINE, 1985; COX, 1994; UPTON, 2000; BARTA et al., 2012; BERTO et al., 2014).

Um caso interessante que desperta curiosidade é o da família Cryptosporidiidae Léger, 1911, gênero *Cryptosporidium*. Antigamente, este grupo era tido como um coccídio bem singular e único (XIAO et al., 2004), com um ciclo homoxeno similar ao dos eimerídeos, porém com localização epicelular e um parasitismo intracelular extra citoplasmático (ficam aderidos na superfície dos enterócitos ou entre as microvilosidades da planura estriada adentrando as criptas intestinais) (BARTA; THOMPSON, 2006; BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ et al., 2015). Entretanto, estudos das últimas décadas, ancorados principalmente na biologia molecular, evidenciaram que na verdade esse grupo de Apicomplexa está intimamente mais relacionado com as gregarinas do que com os coccídios (CARRENO et al., 1999; BARTA; THOMPSON, 2006). Além disso, descobertas a respeito da sua biologia também foram feitas, trazendo à tona novas evidências, como o fato de *Cryptosporidium* ser intracelular facultativo, podendo apresentar uma fase de vida livre no lúmen intestinal ou externamente em ambientes aquáticos e biofilmes (CLODE et al., 2015; ALDEYARBI; KARANIS, 2016). Observa-se também que estes apresentam uma esporogonia endógena, com seus oocistos já sendo eliminados esporulados no ambiente, embora isso também aconteça com alguns coccídios sarcocistídeos. Além disso, ficou demonstrado por Aldeyarbi e Karanis (2016) que *Cryptosporidium parvum* Tyzzer, 1912 pode gerar oocistos de dois tipos: os de parede fina ou de parede espessa. Os de parede fina, provavelmente se rompem dentro do próprio hospedeiro causando autoinfecção, já os de parede espessa são eliminados nas fezes contaminando o ambiente. Com isso, *Cryptosporidium* possui características semelhantes tanto às gregarinas como aos coccídios superiores. Barta e Thompson (2006) revelaram semelhanças entre suas organelas de alimentação e a localização epicitoplasmática com as gregarinas, entretanto, a gametogonia em *Cryptosporidium* não ocorre por sизígia e eles também apresentam merogonia, gametogonia e esporogonia como componentes do seu ciclo. Estas características biológicas são apoiadas pela filogenia, com *Cryptosporidium* formando um clado distinto entre gregarinas e coccídios (CARRENO et al., 1999; XIAO et al., 2004; BARTA; THOMPSON, 2006; BARTA et al., 2012; BERTO et al., 2014; CLODE et al., 2015). Dessa forma, atualmente esse gênero é pertencente a classe Gregarinomorpha, ordem Cryptogregarida Cavalier-Smith, 2014 (RUGGIERO et al., 2015; BRANDS, 2024).

Essas relações evolutivas, refletem-se não apenas em aspectos biológicos do ciclo de vida, mas também em características morfológicas dos oocistos, na conformação e compartimentalização das suas estruturas físicas de excistamento. A parede do oocisto é dupla, formada por duas camadas, uma mais externa de constituição lipídica (conferindo impermeabilidade) e outra mais interna constituída de aminoácidos, carboidratos e glicoproteínas. Isso faz dela extremamente resistente no ambiente, sendo inclusive impermeável a muitos produtos de limpeza (BELLI et al., 2006; MAI et al., 2009). Porém, toda essa resistência tem que ser quebrada no momento de excistamento, possibilitando a saída dos esporozoítos, e conseqüentemente dando seqüência ao ciclo biológico. E nesse sentido, os diferentes grupos coccidianos adotaram diferentes adaptações evolutivas.

Nos grupos mais ancestrais, essas estruturas tendem a ser mais rudimentares, mas à medida que vamos progredindo na evolução coccidiana essas estruturas tornam-se mais especializadas e aprimoradas (figura 6). Oocistos de protococcídios, por exemplo, apresentam suas paredes fixadas por fissuras. De acordo com Berto et al. (2010) o protococcídio do gênero *Adelea* Schneider, 1875 possui oocistos em formato discóide, semelhante ao “vidro de relógio”, com seus esporocistos apresentando fissuras. *Barroussia* Schneider, 1885, que também parasita invertebrados, tem oocistos cujos esporocistos são formados por duas valvas unidas por uma sutura longitudinal, e que se abrem como um bivalve. É curioso perceber como alguns coccídios guardam semelhanças com esses grupos. *Acroeimeria* Paperna & Landsberg, 1989, *Choleoeimeria* Paperna & Landsberg, 1989 (ambos parasitos de répteis) e *Goussia* Labbé, 1896 (parasito de anfíbios e peixes), possuem paredes de seus esporocistos compostas por duas placas unidas por uma sutura longitudinal (fig. 6a). Adicionalmente, dados de filogenia molecular em combinação com os padrões morfológicos observados, destacaram a semelhança filogenética desses gêneros com *Barroussia* (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014).

Oocistos de coccídios de peixes, diferem dos coccídios de hospedeiros terrestres por terem uma parede mais membranosa e macia (PAPERNA, 1995). Por exemplo, oocistos de Calyptosporidae (outro grupo de coccídios de peixes) apresentam esporocistos que possuem características distintas como sutura longitudinal, extensão posterior e *sporopodia* capitado ou acapitado (BERTO et al., 2014). Segundo Paperna (1995), a grande variabilidade em estrutura, relações parasito-hospedeiro e biologia entre os coccídios de peixes, indica uma origem polifilética. Conforme explica o autor, essa diversidade pode representar um menor grau de especialização evolutiva, em comparação com a elevada conformidade estrutural e de desenvolvimento observada em coccídios eimerídeos homoxenos de aves e mamíferos. O

desenvolvimento heteroxeno de alguns desses coccídios, pode servir como mais uma prova de um nível inferior de especialização, seguindo a postulação de Landau (1982) de que os coccídios homoxenos se originaram de formas heteroxenas ancestrais.

Muitas das características estruturais e de desenvolvimento encontradas nesses coccídios, também ocorrem em coccídios de hospedeiros invertebrados ou de vertebrados inferiores, bem como nos coccídios heteroxenos formadores de cistos (*Sarcocystidae*), de vertebrados superiores. Essas semelhanças podem ser notadas em *Sarcocystis* e *Cystoisospora*, como: oocisto frágil; esporocistos valvulados sem corpo de Stieda que se rompem ao longo das linhas suturais; corpos cristalinos em esporozoítos e merozoítos em vez de corpos refráteis; uma parede fotovoltáica que seja multicamada ou tenha funis ou invaginações; endodiogenia como um estágio no desenvolvimento merogônico e endopoligenia como a principal forma de merogonia (PELSTER, 1973; DUBEY, 1977; FERGUSON et al. 1980; PAPERNA, 1995). Os coccídios sarcocistídeos, por sua vez, desenvolveram uma abertura alternativa de seus esporocistos, realizada por suturas na parede do esporocisto que é composto por quatro valvas (fig. 6b). Essa é uma sinapomorfia da família *Sarcocystidae* (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014; VOTÝPKA et al., 2016).

Segundo Paperna (1995) e Jirků et al. (2002), a ausência de verdadeiros “corpos formadores de parede” durante o desenvolvimento zigótico, a presença de véus membranáceos e paredes finas dos oocistos, configuram traços de grupos ancestrais. Jirků et al. (2009) explica que os macrogametócitos de coccídios de peixes e anfíbios geralmente não têm corpos formadores de parede típicos, e nenhuma organela envolvida na formação da parede do oocisto foi identificada com clareza. Em eimerídeos, à nível estrutural, durante a sequência completa de desenvolvimento do macrogametócito até a formação do oocisto, uma característica notável é o surgimento de grânulos densos em macrogametócitos avançados, que desaparecem posteriormente como consequência da sua participação na formação da parede oocística. Em geral, a distinção dos corpos formadores de parede em macrogametócitos coccidianos parece estar diretamente correlacionada com a espessura da parede do oocisto, o que explica sua menor proeminência em coccídios de peixes e anfíbios, que normalmente têm uma parede de oocisto muito fina.

Neste sentido, os eimerídeos parecem corresponder ao grupo mais avançado evolutivamente. Seus esporocistos dispõem ainda de uma estrutura altamente adaptada para realizar o excistamento de seus esporozoítos, denominado corpo de Stieda (que pode ou não

estar associado a uma segunda estrutura chamada de corpo de sub-Stieda). Esse processo de excistamento se dá através dos corpos de Stieda e sub-Stieda, que funcionam como tampas, com refinados encaixes que se abrem, por onde, após a dissolução deles, os esporozoítos atravessam a parede esporocística até se excistarem por completo (fig. 6c). A título de comparação, essas estruturas podem ser equiparadas a opérculos de ovos de alguns helmintos, sendo uma estrutura de direcionamento para promover a saída de dentro de uma parede tão resistente. Dessa forma, para muitos estudiosos o corpo de Stieda seria uma autapomorfia de coccídios de família Eimeriidae, entretanto alguns gêneros com a sistemática incerta foram tradicionalmente alocados nessa família (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014). Além disso, nos últimos tempos, com a aplicação de análises moleculares, muitos grupos coccidianos se mostram parafiléticos. Com isso, não há um consenso entre os especialistas sobre a origem e organização sistemática de muitos grupos; isso será melhor debatido no tópico 6.1 da discussão.

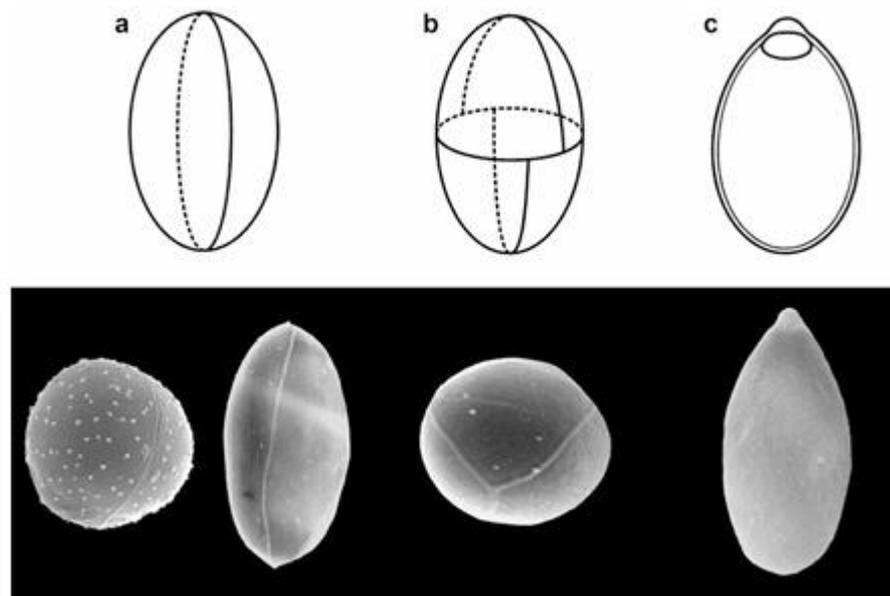


Figura 6 – Desenhos esquemáticos e microscopia eletrônica de varredura de esporocistos mostrando as estruturas de excistamento dos diferentes grupos de coccídios. Em “a” fica evidenciado a abertura do esporocisto de um grupo ancestral, ao longo de uma única fenda longitudinal (*Goussia janae*, *Aggregata octopiana*). Em “b”, a abertura alternativa por suturas na parede do esporocisto composto por quatro valvas (*Cystoisospora suis*). E em “c”, mostra-se que num coccídio eimerídeo (*Eimeria tenella*), os esporozoítos são liberados após a dissolução do tampão formado pelos corpos de Stieda e sub-Stieda. Fonte: Fonte: Votýpka et al. (2016).

3.2 Coccídios do gênero *Tyzzeria* Allen, 1936

3.2.1 Histórico de descrição do gênero e suas espécies

Este gênero foi estabelecido em 1936 por Ena Alida Allen (1875-1954), zoóloga e parasitologista estadunidense. Na ocasião, a pesquisadora recebeu o intestino delgado de um jovem pato de Pequim *Anas platyrhynchos domesticus* (sinonímia *A. boschas*), oriundo de Long Island (Nova Iorque), em 27 de agosto de 1935. No material analisado, foram encontrados oocistos com um padrão morfológico que se assemelhava com os gêneros *Pfeifferinella* Wasielewski, 1904 e *Schellackia* por serem octazóicos (conterem 8 esporozoítos situados diretamente dentro do oocisto), sem esporocisto. Porém, adaptando as chaves de identificação para a sub família Cryptosporidiinae Hoare, 1933 sugerida por Hoare (1933), e embasando-se em aspectos biológicos, Allen justificou a proposição do novo gênero que foi alocado dentro da família Eimeriidae, sub família Cryptosporidiinae. Segundo a autora, *Tyzzeria* se diferenciava de ambos os gêneros por perfazer seu ciclo, estritamente intestinal, num único hospedeiro, que nesse caso é um vertebrado (pato). Em contrapartida, *Schellackia* é um coccídio com um ciclo sanguíneo que contempla dois hospedeiros, sendo um deles invertebrado (artrópode vetor). E em *Pfeifferinella* que também parasita invertebrados (moluscos), é observado ainda um tubo de fertilização em seus gametócitos maduros, característica essa inexistente em *Tyzzeria* (HOARE, 1933; ALLEN, 1936).

A espécie tipo foi *Tyzzeria perniciososa* Allen, 1936, descrita como altamente patogênica, fato este que denotava também sua relevância econômica. A espécie teve ainda seu ciclo de vida estudado, com a caracterização de seus estágios endógenos. A autora também pontuou que os oocistos desse novo coccídio eram de tamanhos bem pequenos, assim a espécie poderia passar facilmente despercebida em exames sem uma devida atenção no diagnóstico coproparasitológico (ALLEN, 1936).

O gênero homenageia Edward Ernest Tyzzer (1875-1965), prestigiado patologista e parasitologista estadunidense com uma carreira que abrangeu 40 anos; e que concentrou esforços em muitas frentes, mas que ganhou célebre destaque na protozoologia, com notáveis contribuições sobre coccídios de galinhas. Tyzzer descreveu inúmeras novas espécies de importância para a sanidade avícola, como: *E. acervulina*; *E. maxima*; *E. tenella* e *E. mitis* Tyzzer, 1929. Ele ainda foi responsável por descrever os gêneros *Cryptosporidium* e *Histomonas* Tyzzer, 1920. Além dessa homenagem, Tyzzer também foi agraciado em outras

descrições de espécies como: *Bartonella tyzzeri* Weinman & Pinkerton, 1938; *Cryptosporidium tyzzeri* Levine, 1961 e *Eimeria tyzzeri* Yakimoff & Rastegaieff, 1931 (WILLIAMS, 2013).

No mesmo ano, em novembro de 1936, uma segunda espécie de *Tyzzeria* foi descrita: *Tyzzeria natrix* (Matubayasi, 1936) Matubayasi, 1937, dessa vez tendo como hospedeiro *Rhabdophis tigrinus* (Boie, 1826), uma serpente da família Colubridae Oppel, 1811, na província de Chiba, no Japão. Entretanto, desconhecendo o trabalho de Allen, ao descrever esta espécie, o cientista japonês Hisakiti Matubayasi relata a ocorrência de oocistos distintos, avaliando aspectos morfológicos e, sobretudo, biológicos do ciclo desse coccídio. Propõe-se então a criação de um novo gênero, nomeando-o *Koidzumiella* Matubayasi, 1936 em homenagem a Koidzumi (importante pesquisador japonês), com a espécie tipo sendo *Koidzumiella natrix* Matubayasi, 1936. Matubayasi também descreveu oocistos que abrigavam diretamente 8 esporozoítos, cujos esporocistos eram ausentes, alocando o gênero também na família Eimeriidae (MATUBAYASI, 1936). Mas no ano seguinte, este mesmo autor publicou outro trabalho, intitulado “Studies on parasitic protozoa in Japan II. Coccidia parasitic in snakes; with special remarks on *Tyzzeria* (*Koidzumiella*) *natrix*, parasitic in *Natrix tigrina*” reconhecendo, portanto, seu equívoco inicial: “Enquanto meu artigo estava no prelo, o artigo de Allen chegou em minhas mãos [...] fiquei convencido que os gêneros *Koidzumiella* e *Tyzzeria* representam um único e mesmo gênero.” (MATUBAYASI, 1937, p. 01). Dessa forma, pela lei da prioridade taxonômica, o nome válido para a espécie passou a ser *Tyzzeria natrix*, sendo o gênero *Koidzumiella* uma sinonímia de *Tyzzeria* (MATUBAYASI, 1937). Há de se destacar, contudo, que Duszynski et al. (1998) acreditam que esse coccídio é resultado de uma esporulação anormal de alguma espécie de *Isospora* ou *Caryospora* Léger, 1904.

Uma nova espécie foi descrita, apenas 10 anos mais tarde: *Tyzzeria allенаe* Chakravarty & Basu, 1946. Um fato curioso é que em sua descrição original, o nome atribuído foi “*T. alleni*”, entretanto, como o nome se propôs a homenagear Ena A. Allen, descritora do gênero (e uma mulher) seu epíteto específico se encontrava grosseiramente inapropriado. Este erro foi então corrigido (emend. Pellérdy, 1974), substituindo a declinação “i” por “ae”, conforme preconizado pelas regras internacionais de nomenclatura quando se objetiva homenagear uma figura feminina (PELLÉRDY, 1974; DUSZYNSKI et al. 1998). Esta espécie foi descrita parasitando o ganso-pigmeu de algodão *Nettapus coromandelianus* (Gmelin, 1789) em Calcutá, na Índia. Chakravarty e Basu (1946) diferenciaram-na das outras espécies congêneres alegando que *T. allенаe* diferenciava-se na forma, tamanho dos oocistos, estrutura dos esporozoítos e

outros caracteres. Um ponto interessante é que esta espécie, diferentemente das outras, foi reportada parasitando o intestino grosso da ave (CHAKRAVARTY; BASU, 1946).

Depois, em 1960, Norman Levine e Virginia Ivens descreveram uma nova espécie para o gênero, a primeira parasitando mamíferos. *Tyzzeria peromysci* Levine & Ivens, 1960 foi descrita a partir de conteúdos fecais, extraídos de necropsias, de roedores selvagens das espécies *Peromyscus leucopus* (Rafinesque, 1818) e *P. maniculatus* Wagner, 1845; capturados durante a primavera e verão de 1958, em Illinois, nos Estados Unidos. O nome específico da espécie foi dado em homenagem ao seu hospedeiro, fazendo menção ao seu epíteto genérico. Os autores não conseguiram estudar mais a fundo sobre a biologia desse parasito, pois não encontraram estágios endógenos nos tratos intestinais dos animais. Os autores observaram sutis diferenças entre os oocistos dos dois hospedeiros, mas que não justificaram a descrição de duas espécies (LEVINE; IVENS, 1960). De acordo com Duszynski et al. (1998) e Berto (2008), possivelmente, trata-se de uma descrição errônea a partir de oocistos de coccídios de invertebrados (e.g. *Pfeifferinella*) ingeridos pelo roedor.

Um momento de particular relevância ocorreu no ano de 1963, quando Klimeš tratou de corrigir um erro histórico e descrever *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963. Essa espécie, na verdade já tinha sido observada em fezes de gansos *Anser anser* Linnaeus, 1758 por Kotlán em 1933 na Hungria; algo que precede até mesmo a criação do gênero em 1936. Porém, Kotlán não reconhecendo a existência de um novo gênero a denominou como *Eimeria parvula* Kotlán, 1933 (KOTLÁN, 1933). Naquela época, dados confiáveis sobre coccidioses em Anseriformes eram escassos e muito se especulava ainda sobre a questão de especificidade parasitária, com as atenções se voltando principalmente para as espécies de *Eimeria* no diagnóstico de coccidioses em aves domésticas. Aspectos patológicos diferenciais e desenvolvimento dos estágios endógenos eram muito frisados, com a caracterização morfológica sendo menos acurada em alguns casos. Havia um debate sobre a possibilidade de que as espécies que infectavam galinhas também pudessem infectar outras aves, como patos e gansos. Este fato gerava uma certa confusão entre os autores, isso fica evidente nos manuscritos de Kotlán (KOTLÁN, 1932; KOTLÁN, 1933). Um ano antes, Kotlán (1932) já havia descrito uma espécie de anatídeos, denominada *Eimeria anseris* Kotlán, 1932. O próprio Kotlán, um ano depois em outro artigo, reconheceu que essa sua descrição se tratava na verdade de duas espécies onde ele as separou como *E. anseris* e *E. parvula* (KOTLÁN, 1933). Segundo Duszynski et al. (1998), todas essas espécies podem ser consideradas como sinônimas de *T.*

parvula. Entretanto, outros autores consideram válida essa separação, colocando *E. anseris* como uma espécie à parte (KLIMEŠ, 1963; GAJADHAR et al., 1983).

Outro caso que dificultou a taxonomia do gênero, foi a descrição de *Tyzzeria anseris* Nieschulz, 1947 anos antes. Na verdade, *T. anseris* é outra sinonímia de *T. parvula* (KLIMEŠ, 1963; DUSZYNSKI et al. 1998). Isso aconteceu porque quando Nieschulz (1947) encontrou este mesmo coccídio em gansos na Holanda, *T. parvula* ainda não tinha sido estabelecida por Klimeš (1963). Assim, não tendo essa referência prévia, mas já conhecendo o trabalho de Allen, Nieschulz ao observar o padrão morfológico dos oocistos, classificou-os como *Tyzzeria* e nomeou a espécie. Esse autor fez ainda observações bastante pertinentes ao afirmar que *T. anseris* e *T. perniciosa*, se assemelhavam muito em tamanho e forma (embora tivesse relatado que esta última fosse menor). Somente após sua infecção experimental em pato ter obtido resultados negativos, ele chegou à conclusão de que não se tratava de “*Tyzzeria* de patos” (*T. perniciosa*) e, conseqüentemente, designou o coccídio como uma espécie independente para gansos (NIESCHULZ, 1947; KLIMEŠ, 1963).

Klimeš, havia acumulado observações, de coletas ocasionais, feitas por ele mesmo desde 1953. Ele coletou amostras fecais de gansos *Anser anser domesticus* (Linnaeus, 1758) em diferentes localidades na Tchecoslováquia. Assim como Kotlán e Nieschulz, ele observou oocistos pequenos, esféricos, sem esporocistos e octazóicos. E, revisando artigos anteriores, em um trabalho primoroso, chegou à conclusão que os coccídios analisados por esses autores se tratavam da mesma espécie. Suas considerações foram contundentes:

Em nenhum dos casos, por mim observados, encontrei oocistos de *E. parvula*. Mesmo quando encontrei oocistos esféricos correspondentes a eles, no que diz respeito ao tamanho, eles não esporularam ou, se o fizeram, provaram não ser *Eimeria*, mas *Tyzzeria*. Ninguém, exceto Kotlán, descreveu *E. parvula* com mais detalhes e, portanto, a sua existência pode ser considerada duvidosa. Ao comparar afirmações da literatura de Kotlán (1933) e Nieschulz (1947), podemos constatar uma conformidade absoluta com as propriedades de *E. parvula* e *T. anseris*. Todas as descrições concordam quanto ao formato dos oocistos, às paredes dos oocistos, à micrópila e ao tamanho [...] A única diferença reside no fato de que Kotlán classifica os oocistos como *Eimeria*, enquanto Nieschulz os classifica como *Tyzzeria*, pois descobriu que eles não formavam esporocistos. Kotlán, em seu artigo, não descreveu a esporulação ou o tempo de esporulação, nem o corpo residual relativamente grande e marcante, embora ele tivesse oocistos esporulados dessa espécie, uma vez que os infectou e determinou o ciclo intravital como sendo de 5 dias. Além disso, Kotlán tirou fotos desses oocistos. Fica claro nas figuras de seu artigo que 8 esporozoítos livres, e não 4 esporocistos, são formados no oocisto (KLIMEŠ, 1963, p. 441).

A exemplo de Nieschulz, Klimeš também constatou por experiência própria que *T. parvula* era transmissível apenas entre gansos, permitindo sua distinção com *T. perniciosa*. Além disso, ele pondera para outros fatores:

T. parvula difere de *T. perniciosa* por suas dimensões um pouco maiores e um ciclo endógeno um pouco mais curto. Tem alta no quinto dia, enquanto *T. perniciosa* aparece pela primeira vez no sexto dia. *T. parvula* ataca, sobretudo, a parte superficial das vilosidades e é menos patogênica. *T. perniciosa* penetra profundamente na submucosa e é muito patogênica. (KLIMEŠ, 1963, p. 443).

Dessa forma, *T. parvula* é mais uma espécie a parasitar aves da ordem Anseriformes, que só devidamente nomeada 30 anos após seu primeiro avistamento cientificamente reportado (KLIMEŠ, 1963).

A próxima espécie a ser descrita foi *Tyzzeria pellerdyi* Bhatia & Pande, 1966, novamente na Índia, mas agora na cidade de Gorakhpur. Em novembro de 1965, anatídeos das espécies *Spatula querquedula* (Linnaeus, 1758), *Mareca strepera* (Linnaeus, 1758) e *Aythya nyroca* (Güldenstädt, 1770) foram examinados quanto ao conteúdo cloacal e exames histopatológicos post mortem. Nas duas últimas espécies hospedeiras, foram constatados oocistos dessa nova espécie coccidiana (BHATIA; PANDE, 1966). Cabe sublinhar que Duszynski et al. (1998) também consideram essa espécie como uma sinonímia de *T. parvula*, porém outros autores ainda, trazem-na separadamente em trabalhos e revisões (GAJADHAR et al., 1983; DUBEY, 2020).

No ano seguinte, mais uma espécie foi descrita: *Tyzzeria chenicusae* Ray & Sarkar, 1967. Esta foi descrita, novamente, a partir de amostras do anatídeo *N. coromandelianus*, também na Índia. Os autores apenas diferiram-na das outras espécies pela medição dos oocistos e tempo de esporulação (RAY; SARKAR, 1967). Pellérdy (1974) sugeriu a correção dessa espécie para *Eimeria chenicusae* (Ray & Sarkar, 1967). Duszynski et al. (1998) e Berto (2008) também apontam que *T. chenicusae* seria uma sinonímia de *E. chenicusae*. Porém, em alguns outros trabalhos, autores persistem em classificá-la como *Tyzzeria* (GAJADHAR et al., 1983; DUBEY, 2020).

Tyzzeria typhlopsi Ovezmukhamedov, 1968 foi outra espécie descrita a partir de serpentes, no Turquemenistão. Seu hospedeiro tipo foi *Xerotyphlops vermicularis* Merrem, 1820. Amostras fecais foram obtidas de coletas realizadas nos meses de março, abril, julho e

outubro de 1966 no deserto de Kara-kuma, no vale de Telzhen e nas montanhas Konet-Dag (OVEZMUKHAMEDOV, 1968). De acordo com Duszynski et al. (1998), os oocistos na qual a descrição foi baseada representam, muito provavelmente, oocistos degenerados de *Eimeria typhlopsi* Ovezmukhamedov, 1968 que tiveram seus esporocistos colapsados, liberando assim os esporozoítos livres no interior dos oocistos.

No início da década seguinte, uma nova espécie foi descrita: *Tyzzeria galli* Fernando & Remmler, 1973. Mais uma espécie a ser descrita em aves, mas dessa vez em Galliformes. Seu hospedeiro tipo foi *Gallus lafayettei* Lesson, 1831. Alguns espécimes dessa ave, que habitavam selvas ao norte do Sri Lanka (Ceilão), foram necropsiados. Amostras de conteúdos oriundos do intestino delgado inferior, ceco e reto foram analisadas, onde se constatou oocistos desse coccídio (FERNANDO; REMMLER, 1973). Segundo Duszynski et al. (1998) e Berto (2008) essa espécie pode ter sido descrita erroneamente, fruto de uma esporulação anormal de alguma *Eimeria* ou de protococcídio de invertebrados (pseudoparasito).

A penúltima espécie a ser descrita foi *Tyzzeria chalcides* Probert, Roberts & Wilson, 1988. Esta foi outra espécie descrita em répteis, mais precisamente em *Chalcides ocellatus* (Forsskål, 1775), uma espécie de lagarto. Sua descrição foi decorrente de um exame realizado numa colônia desses lagartos que eram originários de Abu-Rawash, no Egito, trazidos para o País de Gales, no Reino Unido. No artigo, os autores forneceram uma descrição dos estágios endógenos e exógenos da espécie. De acordo com eles, foram encontrados oocistos condizentes com o gênero no conteúdo da vesícula biliar; e estágios endógenos foram observados na vesícula biliar e no epitélio do ducto biliar (PROBERT et al., 1988). Entretanto, anos mais tarde, Ball et al. (1994) comprovaram que esse coccídio, na verdade se tratava de uma espécie de *Eimeria* ao reexaminarem a sua esporogonia, demonstrando que a descrição foi decorrente de uma esporulação alterada (oocistos com esporocistos rompidos), propondo então a sua correção nomenclatural para *Eimeria chalcides* (Probert, Roberts & Wilson, 1988). Como eles mesmo argumentaram, Paperna e Landsberg (1989), já suspeitavam desse caso. Cabe ressaltar que quando Ball et al. (1994) publicaram seu trabalho, Paperna e Landsberg (1989) já tinham proposto a definição do gênero *Choleoimeria* Paperna & Landsberg, 1989 para designar *Eimeria* spp. de répteis que se desenvolviam dentro de epitélios biliares e morfologicamente não dispunham de corpo de Stieda nos seus esporocistos. Como na época, esse novo gênero não era amplamente aceito, Ball et al. (1994) mantiveram a denominação *E. chalcides*. Porém, atualmente se sabe essa separação se mostrou perfeitamente acertada (MEGÍIA-PALMA et al.,

2015), com isso, sua denominação correta se tornou *Choleoimeria chalcides* (Probert, Roberts, & Wilson, 1988).

E por fim, na década de 1990 tivemos a última espécie descrita para o gênero: *Tyzzeria boae* Lainson & Paperna, 1994. Esta é mais uma espécie descrita em serpentes, dessa vez a partir de amostras de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758; sendo também a primeira espécie descrita no continente sul-americano, mais precisamente no Brasil. Um fato interessante é que a espécie foi descrita a partir do rim da serpente, sendo, portanto, mais uma a apresentar ciclo extra intestinal. Os autores descreveram em detalhes os estágios de merogonia e gametogonia observados nas células de túbulos renais, além dos oocistos provenientes do conteúdo cloacal (LAINSON; PAPERNA, 1994). Vale frisar que Duszynski et al. (1998) lançam dúvida sobre sua validade e sugerem que esse coccídio pode ser alguma espécie do gênero *Klossiella* Smith & Johnson, 1902 ou de algum outro coccídio mal identificado.

3.2.2 Classificação taxonômica

Atualmente este gênero coccidiano está inserido dentro da família Eimeriidae (LEVINE, 1988b,c; UPTON, 2000; BERTO, 2008; RUGGIERO et al., 2015; VOTÝPKA et al., 2016; BRANDS, 2024) e segue a seguinte classificação:

- Domínio Eukaryota Chatton, 1925
- Reino Chromista Cavalier-Smith, 1981
- Filo Miozoa Cavalier-Smith, 1987
- Infracilo Apicomplexa Levine, 1970
- Superclasse Sporozoa Leuckart, 1879
- Classe Coccidiomorpha Doflein, 1901
- Subclasse Coccidia Leuckart, 1879
- Ordem Eimeriida Léger, 1911
- Família Eimeriidae Minchin, 1903
- Gênero *Tyzzeria* Allen, 1936

3.2.3 Morfologia

Oocistos de parede dupla (bicamada) contendo 8 esporozoítos livres no seu interior juntos ao resíduo do oocisto que pode variar de pequenas esférulas mais dispersas ou agregadas, formando um corpo residual compacto. Esporocistos são ausentes. Esporozoítos são vermiformes, com a extremidade anterior mais afilada e a extremidade posterior mais arredondada; apresentando corpo refrátil e um núcleo central (figura 7) (ALLEN, 1936; LEVINE, 1961; BERTO, 2008; DUBEY, 2020).

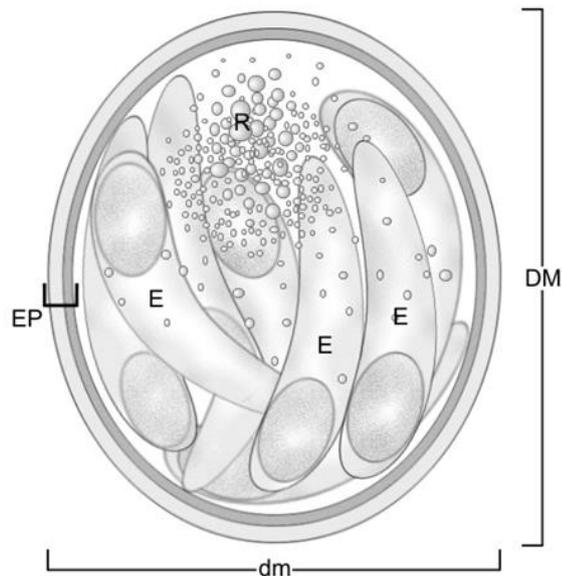


Figura 7 – Morfologia de um oocisto esporulado de *Tyzzeria*: (DM) diâmetro maior; (dm) diâmetro menor; (ep) espessura da parede do oocisto; (r) resíduo de oocisto; (e) esporozoítos. Fonte: Berto (2008).

3.2.4 Listagem de espécies, demais hospedeiros e locais relatados

Atualmente, este gênero consta com 10 espécies, sendo elas: (1) *Tyzzeria allenae*; (2) *Tyzzeria boae*; (3) *Tyzzeria chenicusae*; (4) *Tyzzeria galli*; (5) *Tyzzeria natrrix*; (6) *Tyzzeria parvula*; (7) *Tyzzeria pellerdyi*; (8) *Tyzzeria perniciososa*; (9) *Tyzzeria peromysci* e (10) *Tyzzeria typhlopisi*. (DUSZYNSKI et al., 1998; BERTO, 2008; GHIMIRE, 2010).

As espécies *T. boae*, *T. chenicusae*, *T. galli*, *T. natrrix*, *T. peromysci* e *T. typhlopisi*, apenas foram relatadas nos respectivos hospedeiros e localidades de suas descrições originais (já citados antecipadamente no tópico 3.2.1). *Tyzzeria allenae* foi mencionada ainda num registro de Mandal (1970), mas sendo registrada novamente para Calcutá, na Índia e para seu hospedeiro já conhecido. Por outro lado, *T. pellerdyi*, *T. parvula* e *T. perniciososa* possuem

registros diversos, sobretudo essas duas últimas (GAJADHAR et al., 1983; DUSZYNSKI et al., 1998).

Tyzzeria parvula, ainda com o nome posteriormente invalidado, *T. anseris*, foi relatada no Canadá e nos Estados Unidos para outros hospedeiros. Foi encontrada em *Cygnus columbianus* (Ord, 1815) na Baía de Chesapeake (no estado de Maryland); em *Anser albifrons frontalis* (Scopoli, 1769) nas localidades de Área de Vida Selvagem Trimble (Missouri) e nos Refúgios de Vida Selvagem de Sacramento e Lago Tule (ambos na Califórnia). Também inclui *Anser caerulescens caerulescens* (Linnaeus, 1758) no Fort Severn e Weenusk (em Ontário) e Refúgio de Vida Selvagem do Lago Tule (na Califórnia); e *A. c. atlanticus* (Linnaeus, 1758) na Área Nacional de Vida Selvagem Cap Tourmente (Quebec) e Pea Island (Carolina do Norte). A essa lista integram *A. rossii* Cassin, 1861 nos Refúgios de Vida Selvagem de Merced e Lago Tule (ambos na Califórnia). *Branta canadensis interior* (Linnaeus, 1758) em Pea Island (Carolina do Norte), na Baía de Chesapeake (Maryland), no Refúgio de Vida Selvagem de Seney (Michigan), em Horseshoe Lake e Fort Severn (ambos em Ontário) e Owl River (em Manitoba). Na outra subespécie, *B. c. moffitti*, tem-se registros para os Refúgios de Vida Selvagem Malheur (Oregon) e do Lago Tule (Califórnia). Já para *Branta hutchinsii taverneri* (Richardson, 1832), há registros no Refúgio de Vida Selvagem de Sacramento (Califórnia); e para *B. h. minima* nos Refúgios de Vida Selvagem do Lago Lower Klamath (Oregon) e Sacramento (Califórnia). Para *Branta bernicla hrota* (Linnaeus, 1758), registro em Île aux Pommés (Quebec) (FARR, 1952; LEVINE, 1951; HANSON et al., 1957).

Mais tarde, e Skene et al. (1981) também relataram *T. parvula* para *B. canadensis*, mas dessa vez, no Kortright Waterfowl Park em Guelph, Ontário, Canadá. Greiner et al. (1981) registraram *T. parvula* para *B. h. leucopareia* (Delacour, 1951) numa área perto de Crescent City, Califórnia; em gansos de cativeiro em Patuxent Wildlife Research Center (Maryland) e Amchitka Island (Alaska); e em gansos de vida livre em Buldir (Alaska). Gajadhar et al. (1983) apontam que Nieschulz (1947) tinha registrado essa espécie também em *C. olor* (Gmelin, 1789). *T. parvula* também já foi relatada na Rússia (RAKHMATULLINA; SVANBAEV, 1967; SHIBALOVA; MOROZOVA, 1979), na China (DAI et al., 2004) e no Iraque, na Província de Nínive (ABDULLA, 2010).

Recentemente, novos hospedeiros e localidades para *T. parvula* foram registrados. Dolnik e Loonen (2007) relataram sua ocorrência para *B. leucopsis* (Bechstein, 1803), em

Spitsbergen, na Noruega; e Berto et al. (2008) para *A. cygnoides* (Linnaeus, 1758) em Seropédica, estado de Rio de Janeiro, Brasil.

Em relação aos seus registros para *A. anser*, além dos relatos de Kotlán (1933), Nieschulz (1947) e Klimeš (1963) na Europa; Farr e Wehr (1952) também já haviam observado essa espécie em Maryland (Estados Unidos), depois Černá (1956) observou *T. parvula* em gansos dessa espécie na Tchecoslováquia novamente; Golemansky (1961) e Arnaudov (1969) registraram-na para Bulgária, Arnastauskiene (1967) para a Lituânia, Pellérdy (1974) para a Alemanha; e Chauve (1988) fez registros para o sudoeste da França. Posteriormente, Arslan et al. (2002) relatam a espécie na Província de Kars, na Turquia. Berto et al. (2007) trazem relatos numa propriedade rural do município do Rio de Janeiro (Brasil) e Berto et al. (2008b) na zona rural do município de Rio Claro e na região metropolitana do município do Rio de Janeiro (ambos no estado do Rio de Janeiro, Brasil).

T. pellerdyi foi relatada pela primeira vez no continente americano por Bristol et al. (1981) no Condado de Hudspeth, Texas (Estados Unidos). Esse relato, traz consigo também, os seguintes novos hospedeiros para a espécie: *Anas acuta* Linnaeus, 1758; *A. carolinensis* Gmelin, 1789; *A. platyrhynchos* Linnaeus, 1758; *Mareca americana* (Gmelin, 1789); *Spatula clypeata* (Linnaeus, 1758) e *S. discors* (Linnaeus, 1766). Posteriormente, há registros para o continente europeu, com Chauve et al. (1991) reportando a ocorrência de *T. pellerdyi* em patos mulard (híbridos) em três assentamentos agrícolas em Landes, no sudoeste da França.

T. perniciosa foi relatada por Davies (1957) causando um surto de coccidiose em patos domésticos na Grã-Bretanha. Essa espécie também foi registrada por Rakhmatullina e Svanbaev (1967) em patos domésticos e selvagens na Rússia; e nesse mesmo ano, na Hungria por Versényi (1967). Lu et al. (1985), Peiyun et al. (1982) Fan e Di (1988) e Yin et al. (1988) registraram-na em Pequim, na China. Chauve et al. (1991) também registraram essa espécie em patos mulard (híbridos) em três assentamentos agrícolas em Landes, no sudoeste da França. Hsiao et al. (1996) fizeram registro em Taiwan; e Abdulla (2010) também registrou *T. perniciosa* na Província de Nínive, no Iraque.

De acordo com Duszynski et al. (1998) outros hospedeiros para essa espécie, incluem: *Anas acuta* Linnaeus, 1758; *A. fuligula* Linnaeus, 1758; *Aythya affinis* (Eyton, 1838); *Oxyura leucocephala* (Scopoli, 1769) e *Tadorna tadorna* (Linnaeus, 1758). Recentemente, Berto et al. (2022) fizeram um registro inédito de *T. perniciosa* para *A. superciliosa* Gmelin, 1789 em Perth, Austrália.

Além disso, Simms (1950) mencionou *Tyzzeria* sp. para *B. canadensis* na Carolina do Norte (Estados Unidos); Farr (1952) reportou a ocorrência de *Tyzzeria* sp. para *Anas rubripes* Brewster, 1902, *B. canadensis* e *A. c. caerulescens* nos Estados Unidos; Levine (1952) também relatou *Tyzzeria* sp. para *B. c. interior*, no sul de Illinois (Estados Unidos); Levine (1953) menciona *Tyzzeria* sp. para Anseriformes das espécies *Clangula hyemalis* (Linnaeus, 1758) e *A. caerulescens*, cujas amostras foram coletadas em expedição ao Rio Perry no Oceano Ártico, a noroeste do Canadá. Lapage (1961) reporta *Tyzzeria* sp. para *A. c. atlanticus*. Farr (1965) identificou *Tyzzeria* sp. em *Aythya affinis* Eyton, 1838 no Refúgio Nacional de Vida Selvagem do Alto Mississippi (Estados Unidos). Leibovitz (1969) relatou oocistos de *Tyzzeria* para *C. olor*, em Long Island, Estados Unidos. E há poucos anos, Brown et al. (2010) relataram ter encontrado oocistos de *Tyzzeria* sp. em *Fratercula arctica* (Linnaeus, 1758), *Branta leucopsis* (Bechstein, 1803) e *Anser erythropus* (Linnaeus, 1758) na Grã-Bretanha. Larki et al. (2018) relatou *Tyzzeria* sp. também em patos domésticos em Ahvaz, no Irã.

Adiante, são expostas detalhadamente as descrições originais de cada uma das espécies mencionadas, bem como, as descrições complementares feitas por outros autores:

3.2.5 Descrições das espécies

3.2.5.1 *Tyzzeria perniciosa* Allen, 1936

Conforme a descrição de Allen (1936): Oocistos elípticos, medindo de 10–13,3 x 9–10,8 µm. Parede do oocisto espessa, incolor e constituída por 2 camadas, sendo a externa mais fina que a interna e muito transparente, conseqüentemente pouco visível. Sem opérculo ou micrópila visível. Protoplasma do oocisto não esporulado, grosseiramente granular, preenchendo completamente o espaço delimitado pela parede. Esporozoítos em número de 8, desenvolvendo-se diretamente dentro da parede do oocisto, não havendo formação de esporocisto. Esporozoítos curvos, uma extremidade mais arredondada e mais larga que a outra, com cerca de 10 µm de comprimento por 3,5 µm de largura na extremidade maior. Massa residual grande, composta por grânulos de vários tamanhos, geralmente esféricos, exceto em oocistos mantidos por algum tempo após a esporulação, caso em que os grânulos da massa às vezes ficam um tanto dispersos.

Conforme a descrição de Chauve et al. (1991): Oocistos pequenos, quase esféricos, medindo diâmetros entre 10,2–14,3 x 9,2–13,3 µm, com médias de 12,2 x 10,6 µm.

Esporocistos ausentes, 8 esporozoítos livres e presença de um resíduo do oocisto bem desenvolvido, com contorno difuso e estrutura heterogênea.

Conforme a descrição de Berto et al. (2022): Oocistos elipsoidais, medindo 10–11 x 7–8 µm (10,7 x 7,4); com razão morfométrica de 1,4–1,5 µm (1,4). Parede do oocisto composta por duas camadas, com 0,4–0,7 µm (0,6) de espessura; camada externa lisa, com 2/3 da espessura total da parede. O resíduo do oocisto apresenta-se como grânulos de tamanhos diferentes, geralmente agrupados em uma extremidade do oocisto, medindo 2,5 µm. Presença de 8 esporozoítos, curvos e afilados na extremidade anterior, medindo 6–8 x 1–2 µm (6,9 x 1,8), com corpo refrátil posterior robusto e proeminente e sem núcleo discernível.

Hospedeiro-tipo: *Anas platyrhynchos domesticus*

Outros hospedeiros: *Anas acuta*, *A. fuligula*, *A. superciliosa*, *Aythya affinis*, *Oxyura leucocephala*, *Tadorna tadorna*, pato mula híbrido (*A. platyrhynchos* x *C. moschata*)

Sítio de infecção: intestino delgado, com invasão das camadas da mucosa e submucosa até as camadas musculares

Localidade-tipo: Estados Unidos (Rinebeck, Long Island, estado de Nova Iorque)

Outras localidades: Grã-Bretanha (não especificado) / Rússia (não especificado) / Hungria (não especificado) / China (Pequim) / França (Landes) / Taiwan (não especificado) / Iraque (Província de Nínive) / Austrália (Perth)

3.2.5.2 *Tyzzeria natrix* (Matubayasi, 1936) Matubayasi, 1937

Oocistos esféricos, de parede simples, sem micrópila e com diâmetros de 11,7 x 16,1 µm e média de 14,4 µm. Esporocistos ausentes. Oocistos imaturos com parede rígida de formato irregular, tendo protoplasma constituído por grânulos microscópicos e na área circundante (periférica) várias partículas grandes e brilhantes. Presença de um corpo residual reduzido, periférico, de formato côncavo e subsférico, formado por vários grânulos menores superficiais e localizado em uma das extremidades do feixe de esporozoítos. Esporozoítos incolores, em formato de banana, com um núcleo e um corpo refrátil. Possuem ambas as extremidades iguais em formato e largura. São agregados, mas em arranjo paralelo (embora a disposição nem sempre seja regular), em número de 8 e contidos diretamente dentro do oocisto (MATUBAYASI, 1936; 1937).

Sinonímias: *Koidzumiella natrix*; *Tyzzeria (Koidzumiella) natrix*

Hospedeiro-tipo: *Rhabdophis tigrinus*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: intestino delgado

Localidade-tipo: Japão (Hota, Província de Chiba)

Outras localidades: sem relatos

3.2.5.3 *Tyzzeria allenae* Chakravarty & Basu, 1946

Oocistos com formato oval, medindo 14,48–17,37 x 9,63–11,5 µm. Micrópila ausente, um corpo residual formando uma massa esférica compacta é observado em um dos polos do oocisto após a formação dos esporozoítos. Massa do corpo residual medindo cerca de 6,42 µm de diâmetro. Oocistos não esporulados são completamente preenchidos pela massa zigótica constituída por grande número de grânulos refráteis. Os esporozoítos aparecem inicialmente como corpos esféricos, mas logo assumem uma forma alongada com extremidades posteriores arredondadas e anteriores pontiagudas. Medem cerca de 5,35–6,48 µm em comprimento. Apresentam um núcleo central com contorno esférico, medindo 2,14 µm em diâmetro (CHAKRAVARTY; BASU, 1946).

Sinonímia: *T. alleni*

Hospedeiro-tipo: *Nettapus coromandelianus*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: intestino grosso

Localidade-tipo: Índia (área de derramamento de pesca de Bidyadhari, bairro de Calcutá, Ballygunge, Bengala Ocidental)

Outras localidades: sem relatos

3.2.5.4 *Tyzzeria peromysci* Levine & Ivens, 1960

Oocistos, recuperados de *P. leucopus*, eram elipsoidais, com parede do oocisto muito pálida amarelada, lisa e composto por uma única camada com cerca de 0,6 µm de espessura. Micrópila ausente. Mediam 14–17 x 11–12 µm, com uma média de 15,2 x 11,2 µm; e suas relações comprimento: largura variaram de 1,3–1,5 µm, com média de 1,36 µm. Um ou dois grânulos polares presentes. Esporozoítos em forma de banana, crescentes ou lanceolados, agrupados em bola sem orientação em nenhuma direção particular, às vezes com 1 ou 2 esporozoítos separados dos demais. Um resíduo de oocisto pequeno e compacto com 3–4 µm de diâmetro foi observado em alguns oocistos nos quais os esporozoítos estavam suficientemente bem separados, que pode ter sido escondido nos outros oocistos pelos esporozoítos agrupados ao seu redor (LEVINE; IVENS, 1960).

Oocistos, recuperados de *P. maniculatus*, eram elipsoidais, com parede incolor a amarelada muito pálida, lisa e composta por uma única camada com cerca de 0,6 µm de espessura. Mediam 11–14 x 9–11 µm, com uma média de 12,6 por 10,1 µm; e suas relações comprimento: largura variaram de 1,1–1,4 µm, com média de 1,24 µm. Micrópila ausente. Um ou dois grânulos polares presentes. Esporozoítos em forma de banana, forma de meia-lua ou lanceolados, com cerca de 3,5 µm de largura e 9–11 µm de comprimento. Agrupavam-se em uma bola sem orientação em nenhuma direção específica, às vezes com 1 ou 2 esporozoítos separados dos demais. Esporozoítos frequentemente com grânulos finos no citoplasma (às vezes sem citoplasma granular), exceto na região central onde está localizado o núcleo. Nenhum resíduo de oocisto foi observado, mas é possível que um pequeno resíduo tenha sido escondido dentro da bola de esporozoíto (LEVINE; IVENS, 1960).

Hospedeiro-tipo: *Peromyscus leucopus* e *P. maniculatus*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: desconhecido, o artigo menciona apenas “conteúdo intestinal”

Localidade-tipo: Estados Unidos (ambiente rural nas proximidades de Sullivan, estado de Illinois)

Outras localidades: sem relatos

3.2.5.5 *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963

Conforme a descrição de Kotlán (1933): Oocistos de formato arredondado ou elíptico-arredondado, tamanho pequeno e com diâmetros médios de 10–15 x 10–14 μm . Possuem uma parede delicada, mas sem micrópila. Na grande maioria, os tamanhos ficam entre 13 x 13 μm ou 13 x 10 μm , mas oocistos menores (11 x 10 μm) são predominantes, enquanto aqueles que atingem 15 μm são bastante raros. O esporonte preenche quase completamente o espaço do oocisto.

Conforme a descrição de Nieschulz (1947): Oocistos alongados, elípticos e incolores, com membrana moderadamente espessa e sem micrópila visível. Suas dimensões medem para o diâmetro maior, valores entre 12–16 μm , com média de 14,0 μm ; e o diâmetro menor variando de 10–12,5 μm , com média de 11,5 μm . Após a esporulação, 8 esporozoítos foram observados livremente juntos de um corpo residual bastante grande, redondo e compacto; de localização excêntrica no oocisto. Os esporozoítos ficam esticados ou curvados no oocisto; e apresentavam uma extremidade arredondada e a outra ligeiramente pontiaguda. Um vacúolo relativamente grande pode ser visto na extremidade arredondada; e situado no meio do esporozoíto, próximo à extremidade pontiaguda está o núcleo.

Conforme a descrição de Klimeš (1963): Oocistos de formato ligeiramente elíptico a esférico, pequenos, incolores, medindo em torno de 14,8 μm (12–17) no comprimento médio e 12,8 μm (11–15) na largura média; com índice de forma de 1,156 μm . A parede é lisa, fina, com uma espessura média de 0,5 μm e não apresenta micrópila. O protoplasma do oocisto não esporulado é grosseiramente granuloso e preenche completamente o oocisto. Ao final da esporulação, esporocistos não são formados e 8 esporozoítos permanecem livres. O corpo residual é relativamente grande e consiste em uma aglomeração de grânulos mais ou menos compacta. Esporozoítos com uma extremidade obtusamente arredondada; e outra bastante pontiaguda e ligeiramente curvada.

Conforme a descrição de Pellérdy (1974): Oocistos eram pequenos, esféricos a subsféricos, com tamanho médio de 14,8 μm (12–17) de diâmetro.

Conforme a descrição de Greiner et al. (1981): Os oocistos subsféricos, medindo 11–15 x 10–13 μm (13,3 x 11,7 μm), não tinham micrópila e continham 8 esporozoítos nus e um resíduo de oocisto.

Conforme a descrição de Skene et al. (1981): Oocistos pequenos, redondos, incolores, de paredes finas e sem micrópila. Mediam 11,3–15,1 x 8,7–13,9 μm , apresentando médias

morfométricas de 13,1 x 11,1 µm. Oocistos esporulados apresentando 8 esporozoítos e ausência de esporocistos.

Conforme a descrição de Chauve (1988): oocistos pequenos, esféricos a subesféricos, com parede fina, lisa e incolor. Tinham um tamanho médio de 13,2 µm. Micrópila ausente. 8 esporozoítos livres e um resíduo do oocisto foram observados.

Conforme a descrição de Berto et al. (2007): Oocistos são esféricos a subesféricos, variando de 12,4–18,0 x 10,7–15,9 µm (15,4 x 13,4 µm), índice morfométrico de 1,15 µm, com parede dupla, medindo de 0,4–0,7 µm de espessura, sendo a parte externa lisa e incolor, e a parte interna esverdeada e pálida. A micrópila está ausente, mas o resíduo do oocisto está presente contendo numerosos grânulos e esférulas. Rodeados por resíduos encontram-se 8 esporozoítos tendo uma extremidade redonda e outra fina e ligeiramente curvada.

Conforme a descrição de Berto et al. (2008): Oocistos são esféricos a subesféricos e mediam 12,4 (11–15) × 10,4 (8–12) µm. Apresentaram índice de forma de 1,2 (1,0–1,4) µm. Parede do oocisto bicamada com 0,7 µm (0,6–0,8) de espessura. O lado externo era liso e incolor, enquanto o lado interno era esverdeado e claro. Micrópilas e grânulos polares estavam ausentes. Resíduo do oocisto presente, às vezes formando uma massa de esférulas e grânulos, e outras vezes disperso. Os esporozoítos tinham uma extremidade arredondada e a outra extremidade era fina e ligeiramente curvada.

Sinonímias: *Eimeria parvula*; *Tyzzeria anseris*

Hospedeiro-tipo: *Anser anser*

Outros hospedeiros: *A. albifrons frontalis*, *A. caerulescens caerulescens*, *A. c. atlanticus*, *A. cygnoides*, *A. rossii*, *Branta canadensis interior*, *B. c. moffitti*, *B. hutchinsii taverneri*, *B. h. minima*, *B. h. leucopareia*, *B. leucopsis*, *B. bernicla hrota*, *Cygnus columbianus*, *C. olor*.

Sítio de infecção: porção posterior do intestino delgado, nas células superficiais (KOTLÁN, 1933) / terço anterior do intestino delgado com infiltrações nas vilosidades, sendo mais intensa na porção média e menos acentuada na porção posterior; desenvolvimento no ceco em casos isolados, mas apenas nas células superficiais, sem penetrar nas vilosidades (KLIMEŠ, 1963).

Localidade-tipo: Hungria (Budapeste)

Outras localidades: Holanda (não especificado) / Tchecoslováquia (não especificado) / Canadá (Île aux Pommes e Área Nacional de Vida Selvagem Cap Tourmente, estado de Quebec; Owl River, estado de Manitoba; Fort Severn, Weenusk, Horseshoe Lake e Kortright Waterfowl Park, estado de Ontário) / Estados Unidos (Amchitka Island e Buldir, estado do Alaska; Baía de Chesapeake e Patuxent Wildlife Research Center, estado de Maryland; Crescent City e Refúgios de Vida Selvagem de Merced, Lago Tule e Sacramento, estado da Califórnia; Pea Island, estado da Carolina do Norte; Refúgios de Vida Selvagem de Malheur e Lago Lower Klamath, estado de Oregon; Refúgio de Vida Selvagem de Seney, estado de Michigan; Área de Vida Selvagem Trimble, estado do Missouri) / Alemanha (não especificado) / Bulgária (não especificado) / Lituânia (não especificado) / Rússia (não especificado) / França (região sudoeste, não especificado) / China (Pequim) / Turquia (Província de Kars) / Noruega (Spitsbergen) / Brasil (municípios de Rio Claro, Rio de Janeiro e Seropédica, estado do Rio de Janeiro) / Iraque (Província de Nínive)

3.2.5.6 *Tyzzeria pellerdyi* Bhatia & Pande, 1966

Conforme a descrição de Bhatia e Pande (1966): Oocistos subesféricos/ovóides, incolores e lisos, medindo 11,0–16,0 x 8,0–11,0 μm (média de 13,0 x 10,0 μm). Apresentam parede oocística bastante desenvolvida (0,5–0,7 μm de espessura). Micrópila e capa micropilar ausentes. Esporonte grosseiramente granular, quase preenchendo os oocistos. Sem desenvolvimento esporocístico e com 8 esporozoítos. Resíduo do oocisto medindo 4,0–5,0 μm de diâmetro, sendo compacto, central ou polar, granular escuro e com glóbulos de tamanhos variados. Grânulos polares ausentes. Esporozoítos em forma de banana, com 8,0–10,0 x 1,7–2,2 μm de tamanho (média de 8,5 x 2,0 μm), apresentando um núcleo central e um glóbulo proeminente na extremidade mais larga, com a outra extremidade afilada.

Conforme a descrição de Bristol et al. (1981): Oocistos eram subesféricos a ovóides; e mediam 10 x 13 μm de diâmetro.

Conforme a descrição de Chauve et al. (1991): Oocistos não tão pequenos, mais ovóides, medindo diâmetros entre 13,3–17,3 x 10,2–14,3 μm , com médias de 15,3 x 11,8 μm . Esporocistos ausentes, 8 esporozoítos livres e presença de um resíduo do oocisto pequeno, denso, bem delimitado e de natureza homogênea.

Hospedeiro-tipo: *Mareca strepera* e *Aythya nyroca*

Outros hospedeiros: *Anas acuta*, *A. carolinensis*, *A. platyrhynchos*, *Mareca americana*, *Spatula clypeata*, *S. discors*, pato mula híbrido (*A. platyrhynchos* x *C. moschata*)

Sítio de infecção: desconhecido/não informado

Localidade-tipo: Índia (Gorakhpur, Uttar Pradesh)

Outras localidades: Estados Unidos (Condado de Hudspeth, estado do Texas) / França (Landes)

3.2.5.7 *Tyzzeria chenicusae* Ray & Sarkar, 1967

Oocistos amplamente cilíndricos, medindo tamanhos de 20,4–27,6 µm de comprimento por 14,4–20,4 µm de largura; uma média de 24,84 x 16,8 µm e índice morfométrico de 1,0–1,5 µm. Parede do oocisto com espessura de 1,4 µm, sendo a camada externa mais brilhante e escura que a interna. Ausência de micrópila. Corpo residual presente, consistindo de uma massa compacta de corpos granulares localizados em um polo do oocisto, medindo de 6–8,4 µm. Esporozoítos em forma de banana, com dimensões de 13,2–4,2 µm com a extremidade mais larga contendo um vacúolo (RAY; SARKAR, 1967).

Sinonímia: *E. chenicusae*

Hospedeiro-tipo: *N. coromandelianus*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: desconhecido/não informado

Localidade-tipo: Índia (não especificado)

Outras localidades: sem relatos

3.2.5.8 *Tyzzeria typhlopisi* Ovezmukhamedov, 1968

Oocistos de formato oval, contendo 8 esporozoítos e sem esporocistos. Suas dimensões tinham 31,5–32,4 µm de comprimento e 18,9–20,7 µm de largura. Micrópila e corpo residual ausentes. As dimensões dos esporozoítos são 12,6 x 9,0 µm e estão dispostos aleatoriamente no oocisto (OVEZMUKHAMEDOV, 1968).

Hospedeiro-tipo: *Xerocyphlops vermicularis*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: desconhecido, o artigo só menciona “conteúdo do intestino posterior”

Localidade-tipo: Turquemenistão (poços de Iner-Chage, Porsy-Kuyu e Cheltsk, no Deserto de Kara-kuma; Gyaurskaya e Vale de Telzhen, na Área de Tedzhenstroy; Germab, Terceiro Birlesik e Chuli, nas Montanhas Konet-Dag)

Outras localidades: sem relatos

3.2.5.9 *Tyzzeria galli* Fernando & Remmler, 1973

Oocistos esféricos com uma delicada parede de camada única, medindo 13,8 µm (12–15) de diâmetro. Grânulo polar presente, 8 esporozoítos circundam o resíduo do oocisto, que tem um aspecto de massa granular e aparentemente tem membrana limitante externa própria. Os esporozoítos são elipsóides, medem cerca de 4 x 2 µm e apresentam uma superfície achatada, com um polo afilado e outro arredondado, onde o núcleo é claramente visível (FERNANDO; REMMLER, 1973).

Hospedeiro-tipo: *Gallus lafayettii*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: desconhecido/não informado, o artigo só menciona “oocistos encontrados nas fezes”

Localidade-tipo: Sri Lanka (Centro-norte de Ceilão)

Outras localidades: sem relatos

3.2.5.10 *Tyzzeria boae* Lainson & Paperna, 1994

Oocistos esféricos a subsféricos, medindo 19,0 x 18,0 µm (15,0–22,5 x 15,0–21,5), com índice morfométrico de 1,0 µm (1,0–1,1). A parede do oocisto é incolor e extremamente delicada, a do oocisto esporulado tornando-se quase invisível. Não há micrópila. Oocisto não esporulado com o esporoblasto preenchendo quase todo o espaço interno do oocisto. Esporozoítos em número de 8, inicialmente dispostos próximos uns dos outros como um cacho

de bananas, mas em oocistos mais antigos frequentemente tornam-se irregularmente dispersos. Eles apresentam uma medida média de 11,0 x 1,8 μm (8,5–12,5 x 1,25–2,0) e possuem 2 corpos refráteis situados anterior e posterior ao núcleo. Uma de suas pontas é opticamente densa, na extremidade mais pontiaguda, que é presumivelmente formada pelas ultraestruturas de conoide e relacionados. Há a presença de um resíduo do oocisto esférico e volumosos, com grânulos e glóbulos, apresentando média de 15,5 x 14,8 μm (13,5–18,5 x 13,5–17,5). Ausência de corpo polar (LAINSON; PAPERNA, 1994).

Hospedeiro-tipo: *Boa constrictor*

Outros hospedeiros: sem relatos

Sítio de infecção: células epiteliais dos túbulos contorcidos distais e os túbulos coletores dos rins

Localidade-tipo: Brasil (região norte do estado do Pará)

Outras localidades: sem relatos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Levantamento bibliográfico

A obtenção de fontes e referências para a concepção desta dissertação se deu de maneira constante até que se findasse o prazo para a conclusão do mestrado. Visando um levantamento bibliográfico mais completo possível, buscou-se diversificar as áreas de busca, com procuras frequentes sendo realizadas em sites como “Google Acadêmico”, “PubMed”, “Web of Science”, “Portal de Periódicos da Capes”, “Scielo”, “Scopus” e a própria aba do Google para pesquisas. Artigos mais antigos, não disponíveis digitalmente, foram requisitados por e-mails, via COMUT (Sistema de Comutação Bibliográfica) a repositórios de bibliotecas nacionais de universidades e instituições, tais como: Fiocruz (Manguinhos), UFRJ (Museu Nacional), USP, USP (ESALQ), UNICAMP e UFRGS. Essas instituições enviaram cópias digitalizadas dos artigos solicitados.

O banco de dados do site “The Coccidia of the World”, disponível digitalmente, também foi uma fonte constante de pesquisas; e em último caso, artigos de interesse que faltavam à lista, foram conseguidos diretamente com o autor D. W. Duszynski, quem gentilmente cedeu cópias digitalizadas dos artigos requeridos.

4.2 Permissões e licenças

A realização deste trabalho, seguiu todo o protocolo ético para a amostragem dos dados obtidos. As amostras fecais oriundas de aves domésticas foram apenas coletadas após doações dos respectivos criadouros ou lojas agropecuárias, onde as aves se encontravam. Já as amostras obtidas de aves silvestres foram conseguidas após constante monitoramento até a descarga natural das mesmas no ambiente em que se encontravam (beira de lagos, gramados), sem que houvesse contenção ou manipulação dessas aves. Para tal, há uma licença em vigência na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) registrada sob o número 09/2023, e vinculada ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (anexo 1). Também há uma licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o número 84721, vinculada ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Ministério do Meio Ambiente, Governo Federal.

4.3 Origem e coleta das amostras

Para a obtenção das amostras fecais, foram realizadas coletas periódicas em locais que albergassem anatídeos, como pontos comerciais ou mesmo residências, sendo estas requisitadas e adquiridas mediante a intermediação e consentimento prévio dos proprietários dos animais e estabelecimentos. Os locais de obtenção das amostras de aves domésticas foram: lojas agropecuárias, criadouros, hotéis-fazenda, residências e hospitais veterinários. Além disso, foram realizadas coletas esporádicas de anatídeos silvestres que habitam as delimitações da área compreendida no *campus* sede da UFRRJ, em Seropédica (RJ).

Foram ao todo, realizadas 16 coletas que se estenderam entre os anos de 2022 a 2023. No total, foram inspecionados 12 locais diferentes em 6 municípios, com 5 deles situados no estado do Rio de Janeiro e 1 em Minas Gerais, todos na região sudeste do Brasil. Segue abaixo, a relação de datas e locais de cada coleta (Tabela 1) e suas respectivas coordenadas geográficas (Tabela 2):

Tabela 1. Datas, locais e municípios onde cada coleta foi realizada.

Número da coleta	Data	Local	Município
Coleta 1	28/02/2022	Criadouro Sombra e Água Fresca	Teresópolis (RJ)
Coleta 2	22/05/2022	Granja Comary (lago)	Teresópolis (RJ)
Coleta 3	15/06/2022	Sítio Lago Santa Rita	Barra Mansa (RJ)
Coleta 4	31/07/2022	Criadouro Sombra e Água Fresca	Teresópolis (RJ)
Coleta 5	02/01/2023	Hotel Fazenda Villa-Forte	Resende (RJ)
Coleta 6	02/01/2023	Hotel Fazenda 3 Pinheiros	Resende (RJ)
Coleta 7	28/01/2023	Hotel Fazenda Vale da Mantiqueira	Virgínia (MG)
Coleta 8	02/02/2023	AnimAves Loja Agropecuária	Seropédica (RJ)

Coleta 9	08/02/2023	Lago do IB (UFRRJ)	Seropédica (RJ)
Coleta 10	02/03/2023	Toca dos Bichos Loja Agropecuária	Rio de Janeiro (RJ)
Coleta 11	01/04/2023	Criadouro Sombra e Água Fresca	Teresópolis (RJ)
Coleta 12	10/06/2023	Criadouro Sombra e Água Fresca	Teresópolis (RJ)
Coleta 13	05/10/2023	Hospital Veterinário Birds & Cia	Rio de Janeiro (RJ)
Coleta 14	13/10/2023	Lago do IB (UFRRJ)	Seropédica (RJ)
Coleta 15	19/10/2023	HVPA/UFRRJ (setor de selvagens)	Seropédica (RJ)
Coleta 16	15/11/2023	Alagados do PSA/UFRRJ	Seropédica (RJ)

Tabela 2. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

Local	Coordenada geográfica
Criadouro Sombra e Água Fresca	22°27'10"S 42°59'40"W (1.063 m)
Granja Comary (lago)	22°27'06"S 42°58'36"W (897 m)
Sítio Lago Santa Rita	22°29'45"S 44°09'48"W (506 m)
Hotel Fazenda Villa-Forte	22°30'19"S 44°40'22"W (475 m)
Hotel Fazenda 3 Pinheiros	22°29'28"S 44°41'11"W (491 m)
Hotel Fazenda Vale da Mantiqueira	22°19'54"S 45°06'57"W (955 m)
AnimAves Loja Agropecuária	22°48'27"S 43°38'05"W (12 m)
Lago do IB (UFRRJ)	22°45'36"S 43°41'28"W (23 m)
Toca dos Bichos Loja Agropecuária	22°53'53"S 43°33'56"W (27 m)
Hospital Veterinário Birds & Cia	22°54'57"S 43°13'05"W (20 m)
HVPA/UFRRJ (setor de selvagens)	22°45'28"S 43°41'36"W (32 m)

As aves selecionadas para esta investigação parasitária compreenderam todas as aves da ordem Anseriformes, família Anatidae que estivessem disponíveis em cativeiro (domesticadas ou selvagens em cuidados veterinários) ou ainda, nativas de vida livre com ocorrência para as regiões de amostragens. Isto é, patos, marrecos, gansos e cisnes domésticos ou silvestres (figuras 8, 9, 10, 11, 12). Os anatídeos foram selecionados como o grupo hospedeiro de amostragem, pois conforme apontado por Duszynski et al. (1998) e Berto (2008) essas aves configuram hospedeiros típicos de *Tyzzeria*, sendo assim o grupo mais provável onde pode-se obter oocistos desses coccídios. A seguir, encontra-se a relação dos hospedeiros e o número de replicatas amostrais obtidas em cada coleta (Tabela 3):

Tabela 3. Quantidade de amostras obtidas por coleta.

Número da coleta	Número de hospedeiros	Identificação dos hospedeiros	Quantidade de amostras
Coleta 1	1	<i>Anser cygnoides</i> (Linnaeus, 1758)	10
Coleta 2	1	<i>Anser anser</i> Linnaeus, 1758 / <i>Anser cygnoides</i> (Linnaeus, 1758) / <i>A. anser domesticus</i> / <i>A. cygnoides</i> <i>domesticus</i> – amostra mista*	14
Coleta 3	1	<i>Cairina moschata</i> <i>domestica</i> (Linnaeus, 1758)	8
Coleta 4	5	<i>Anser anser</i> (Linnaeus, 1758)	47
Coleta 5	3	<i>Anas platyrhynchos</i> Linnaeus, 1758 / <i>A.</i> <i>platyrhynchos</i> <i>domesticus</i>	30

Coleta 6	3	<i>Cairina moschata domestica</i> (Linnaeus, 1758)	30
Coleta 7	2	<i>Cairina moschata</i> (Linnaeus, 1758)	13
Coleta 8	1	Pato mulard (híbrido entre <i>Cairina moschata domestica</i> x <i>Anas platyrhynchos domesticus</i>)	10
Coleta 9	3	<i>Dendrocygna viduata</i> (Linnaeus, 1766)	28
Coleta 10	4	<i>Anser anser</i> Linnaeus, 1758 / <i>Anser cygnoides</i> (Linnaeus, 1758) / <i>Cairina moschata domestica</i> (Linnaeus, 1758) / <i>Anas platyrhynchos</i> Linnaeus, 1758	40
Coleta 11	8	<i>Anser cygnoides</i> (Linnaeus, 1758)	80
Coleta 12	2	<i>Anser cygnoides</i> (Linnaeus, 1758)	20
Coleta 13	1	<i>Cairina moschata domestica</i> (Linnaeus, 1758)	2
Coleta 14	7	<i>Dendrocygna viduata</i> (Linnaeus, 1766)	64
Coleta 15	1	<i>Cairina moschata</i> (Linnaeus, 1758)	4
Coleta 16	1	<i>Amazonetta brasiliensis</i> (Gmelin, 1789)	4

Todas as amostras foram oriundas de defecações naturais, sem o uso de fármacos ou quaisquer outros meios para tal. Foram coletadas diretamente dos recintos dos animais ou nas imediações de suas instalações (gramados, áreas externas, comedouros, proximidades de lagos). Já para as amostras de anatídeos silvestres de vida livre, foi realizado monitoramento ativo do comportamento das aves, com observação à distância com auxílio de binóculos (modelo Bushnell H2O Waterproof 8 x 25 mm), até certificar-se que as aves tinham evacuado. Logo em seguida, foi feita a aproximação no local para o recolhimento do material fecal. Posteriormente, todas essas amostras de fezes coletadas foram encaminhadas ao laboratório (figuras 13, 14).

Conforme preconizado na licença da CEUA, o grau de invasividade aplicado foi categorizado como grau 1 (experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse), tendo em vista que não houve contato, manuseio ou contenção dos animais, sendo as amostras provenientes de doação dos proprietários dos animais, com os pesquisadores apenas coletando ou recebendo esses materiais.

Ao todo, foram examinados 44 anatídeos de 6 espécies diferentes e 1 híbrida, com a obtenção de 404 amostras (Tabela 3) (figuras 8, 9, 10, 11, 12). As espécies foram: o ganso-bravo *Anser anser* Linnaeus, 1758; ganso-sinaleiro *Anser cygnoides* (Linnaeus, 1758); pato-domato *Cairina moschata* (Linnaeus, 1758); pato-real *Anas platyrhynchos* Linnaeus, 1758; irerê *Dendrocygna viduata* (Linnaeus, 1766) e marreca-ananaí *Amazonetta brasiliensis* (Gmelin, 1789). Algumas dessas espécies também se encontravam na sua variedade doméstica (*A. anser domesticus*; *A. cygnoides domesticus*; *A. platyrhynchos domesticus* e *C. moschata domestica*), perceptível pela plumagem predominante branca. A espécie híbrida em questão, correspondia a um pato mulard (também conhecido popularmente como “pato mula” ou “parreco”), um híbrido entre *C. moschata domestica* e *A. platyrhynchos domesticus*. Cabe ressaltar que *C. moschata*, *D. viduata* e *A. brasiliensis* são espécies nativas do Brasil, já as outras espécies são exóticas. A seguir, são apresentadas fotos registradas dos hospedeiros nos locais de coleta:



Figura 8 – Aglomeração de gansos das espécies *Anser anser* e *Anser cygnoides*. Animais com plumagem branca representam a variedade doméstica da espécie. Fotos referentes à coleta 2 (Teresópolis/RJ). Autoria: Mariana de Souza Oliveira.



Figura 9 – Marrecos e patos amostrados no estudo. Fotos 2a e 2b: *Anas platyrhynchos* e *Anas platyrhynchos domesticus* referentes à coleta 5 (Resende/RJ). Foto 2c: *Cairina moschata domestica* referente à coleta 6 (Resende/RJ). Fotos 2d e 2e: *Cairina moschata*, *C. moschata domestica* e *A. platyrhynchos domesticus* referentes à coleta 7 (Virgínia/MG). Autoria: Carlos Nei Ortúzar Ferreira (2a, 2b, 2c) e Bruno Lincoln de Oliveira Saise (2d, 2e).

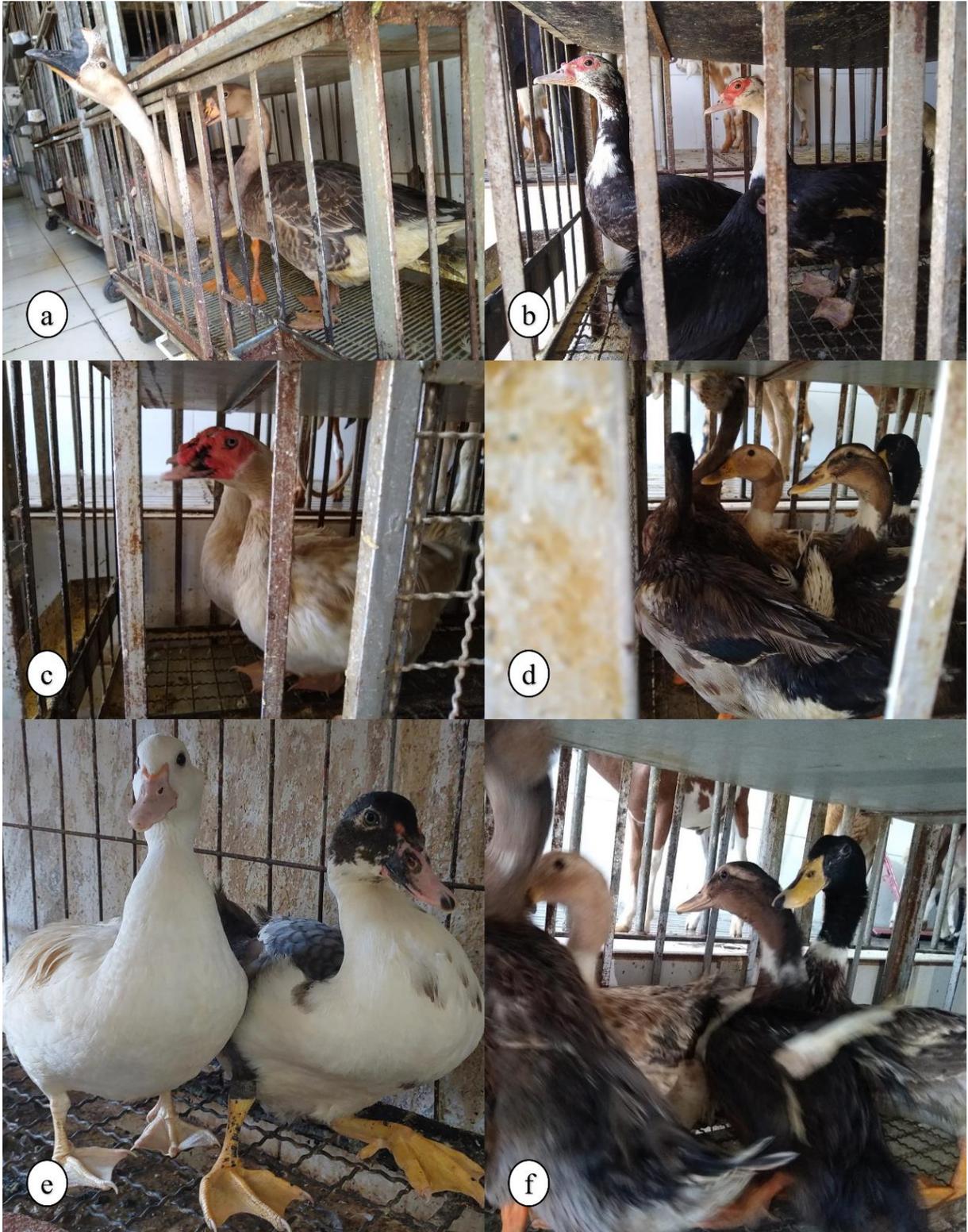


Figura 10 – Gansos, patos e marrecos cujas fezes foram examinadas. Gansos das espécies *Anser cygnoides* e *Anser anser* (3a), patos *Cairina moschata domestica* (3b, 3c), marrecos *Anas platyrhynchos* (3d, 3f) e pato híbrido mulard (3e). Fotos 3a, 3b, 3c, 3d e 3f referentes à coleta 10 (Rio de Janeiro/RJ). Foto 3e referente à coleta 8 (Seropédica/RJ). Autoria: Carlos Nei Ortúzar Ferreira.



Figura 11 – Pato *Cairina moschata domestica* internado em hospital veterinário. Fotos referentes à coleta 13 (Rio de Janeiro/RJ). Autoria: Juliana Xavier Garcia de Oliveira.



Figura 12 – Marrecos selvagens de vida livre das espécies *Dendrocygna viduata* (5a, 5b) e *Amazonetta brasiliensis* (5c, 5d). Fotos 5a, 5b referentes às coletas 9 e 14 (Seropédica/RJ) e fotos 5c, 5d referentes à coleta 16 (Seropédica/RJ). Autoria: Carlos Nei Ortúzar Ferreira.



Figura 13 – Amostras incubadas para esporulação. 6a: Amostras referentes à coleta 10. As marcações com “P” nos tubos identificam amostras de patos (*Cairina moschata*), tubos marcados com “M” identificam amostras de marrecos (*Anas platyrhynchos*) e tubos com “G”, referem-se a amostras de gansos (*Anser anser* e *Anser cygnoides*). 6b: Amostras referente à coleta 14, de anatídeos silvestres da espécie *Dendrocygna viduata*.



Figura 14 – Amostras referentes à coleta 14, de anatídeos silvestres da espécie *Dendrocygna viduata*. As fezes foram recolhidas no gramado em frente ao lago do IB, *campus* da UFRRJ.

4.4 Processamento das amostras

Toda a etapa inicial do processamento se deu nas instalações do Laboratório de Biologia de Coccídios (LABICOC), vinculado ao Departamento de Biologia Animal (DBA) e situado no anexo II (Pavilhão professor Hugo de Souza Lopes) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Esse processamento inicial, corresponde aos procedimentos que permitem a caracterização morfológica e morfométrica de um oocisto, bem como seu isolamento para análises moleculares prosseguentes.

As amostras fecais obtidas foram acomodadas em tubos Falcon (tubos de centrífuga de 15 ml) contendo uma 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 permanecessem viáveis, os tubos permaneceram incubados em bandejas na bancada do laboratório em temperatura ambiente com suas tampas desrosqueadas e sobressaltadas, sendo diariamente abertos e homogêneos durante um período de 7 dias ou até verificar-se que mais de 70% dos oocistos estivessem esporulados. Essa etapa é de importância crucial, pois assegura constante oxigenação das amostras e permite que ocorra a esporulação dos oocistos; e é somente após a esporulação que as espécies coccidianas podem ser identificadas através da caracterização morfológica e morfométrica de seus oocistos. Já a adição de solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 2,5% se justifica pelo fato de inibir o crescimento de outros microrganismos indesejados (e.g. fungos e bactérias), mantendo assim apenas os oocistos de interesse nos recipientes e impedindo situações de contaminação.

Após a esporulação, os oocistos foram recuperados das amostras pela técnica coproparasitológica denominada: método de Sheather modificado. Esta é uma técnica de centrífugo-flutuação com solução de sacarose (na proporção 1000g sacarose para 650ml água) descrita por Sheather (1923) e modificada por Duszynski e Wilber (1997). Ela consiste em, primeiramente, centrifugar as amostras em água destilada por 10 minutos à frequência de 2.500 rpm (rotações por minuto). Nessa primeira rodada, visa-se retirar o excesso de dicromato de potássio e sedimentar o conteúdo fecal no fundo do tubo, desprezando-se o sobrenadante. Depois, uma segunda rodagem em centrífuga é feita (novamente por 10 minutos à 2.500 rpm), mas desta vez com solução saturada de sacarose. Agora, pela diferença de densidade (solução saturada mais densa que o conteúdo fecal) o material fecal é suspenso no tubo, permitindo a flutuação dos oocistos. Completa-se então o tubo com mais solução saturada até formar um

menisco convergente. Por fim, acopla-se uma lamínula na “boca” do tubo e espera-se mais 15 minutos para que haja a fixação dos oocistos na lamínula. Concluído esse tempo, a lamínula é retirada e colocada cuidadosamente na superfície de uma lâmina (previamente marcada com o código da respectiva amostra) para visualização no microscópio óptico (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; BERTO et al., 2014). As centrífugas utilizadas no processamento mencionado foram as seguintes: modelo CENTRIBIO 80-2B e modelo KASVI K14-0815C (figura 15).



Figura 15 – Modelos das centrífugas utilizadas no processamento das amostras.

4.5 Caracterizações morfológica

Para cada amostra foi montada uma lâmina para análise em microscopia óptica, sendo avaliada a presença ou ausência de oocistos (prevalência). Nas lâminas positivas, foi contabilizada a quantidade total de oocistos (entre esporulados e não esporulados), para a estimativa da densidade parasitária, mensurada em oocistos por defecação (OoPD). A densidade parasitária confere uma estimativa da severidade ou patogenicidade da doença causada por uma respectiva espécie parasitária (BUSH et al. 1997; DOLNIK, 2006). Foi utilizado um microscópio modelo Olympus BX41 binocular (Olympus Optical, Tóquio, Japão). Após a observação dos oocistos, alguns foram selecionados para fotomicrografias. Foram fotomicrografados pelo menos 10 oocistos de cada lâmina, preferencialmente esporulados e bem representativos de cada morfotipo. Lâminas contendo um número inferior a esse, tiveram todos os seus oocistos registrados.

As fotomicrografias são importantes pois garantem o registro de possíveis fotossíntipos no caso de descrição de novas espécies. Elas foram realizadas por meio de uma câmera digital modelo Eureka 5.0 Bel Photonics (BEL Photonics, Monza, Itália), acoplada ao microscópio, acessando o software Bel View Capture (Versão 6.2.3.0, BEL Engineering, Monza, Itália) no computador (figura 16). Utilizou-se objetiva ocular de 100X (maior aumento) e óleo de imersão com intuito de melhorar a visualização, garantindo um maior detalhamento e nitidez das estruturas presentes nos oocistos esporulados. O óleo de imersão usado foi da marca Merck.



Figura 16 – Microscópio óptico equipado com câmera digital para realização de fotomicrografias.

Para identificação dos oocistos a nível de espécie, utilizou-se como base as diretrizes e estudos morfológicos e morfométricos destacados por Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014) que auxiliam na classificação dos oocistos esporulados de coccídios. Dessa forma, os oocistos foram comparados morfologicamente com todas as descrições de espécies contidas para a mesma família hospedeira, seguindo o padrão de especificidade parasitária “família-hospedeiro”, consolidado na literatura.

Nesse sentido, a fim de melhorar a caracterização e análise dos diferentes morfotipos observados, desenhos de linha de cada morfotipo foram feitos a mão, com lápis em pranchas de papel sulfite.

4.6 Caracterizações morfométrica

A caracterização morfométrica é um prosseguimento complementar da caracterização morfológica de um oocisto, sendo também indispensável, de modo que não é indicado

identificar uma espécie desconsiderando uma dessas etapas. Novamente, por meio do software Bel View Capture, todas as estruturas dos oocistos fotomicrografados foram medidas, tais como: diâmetro maior (DM) e menor do oocisto (dm), espessura da parede do oocisto, tamanho dos corpos residuais (ou resíduo do oocisto), diâmetros dos corpos refráteis dos esporozoítos, comprimento e largura dos esporozoítos. Assim, essa etapa nada mais é do que a mensuração de tamanho dos oocistos e suas estruturas, na grandeza de micrômetros (μm). A escala utilizada no software foi de 1280 x 960 pixels para as fotomicrografias registradas em baixa resolução; e 2592 x 1944 para fotomicrografias em alta resolução.

A partir disso, pode-se então estipular o formato de um oocisto entre esférico, subesférico, elipsóide. De acordo com Berto et al. (2014), o índice de forma de um oocisto é obtido através da relação entre as proporções do diâmetro maior (comprimento) e diâmetro menor (largura). A razão (divisão) entre os valores de cada parte gera um valor; e de acordo com o resultado a caracterização pode ser feita. Valores exatos a 1,0 (=1) configuram oocistos esféricos, já valores entre 1,0 e 1,1 (>1 e <1.1) configuram oocistos subesféricos, e ao passo que valores superiores a 1,1 (>1.1) enquadram oocistos dentro do “complexo elipsóide”.

Posteriormente, todos os oocistos visualizados foram separados em morfotipos de acordo com seus padrões. Quando possível, oocistos dos morfotipos, foram selecionados para serem isolados com destinação para a biologia molecular.

4.7 Isolamento dos oocistos

Foram isolados alguns dos oocistos, destinados para sequenciamento na biologia molecular. O isolamento consiste em recuperar da lâmina, um único ou poucos oocistos do mesmo morfotipo, individualizando-os em alíquotas sobre a lâmina de isolamento, com auxílio de uma pipeta volumétrica analítica. Para tal, foram seguidas as diretrizes de Dolnik et al. (2009), onde a lâmina de isolamento é montada com a adesivação parcial de uma lamínula estéril sobre uma lâmina. As gotas são cuidadosamente depositadas sobre a lamínula, que ao ser levada para o microscópio, é então invertida. No lado oposto da lamínula, é colocado óleo de imersão para que cada gota possa ser visualizada em detalhes para a ausência ou presença de oocistos (figura 17).

Esse procedimento é realizado em duas etapas, com os volumes trabalhados na grandeza de microlitros (μl). Primeiramente, são selecionadas as lâminas com os maiores números de

oocistos, sendo o OoPD mínimo de 50 oocistos para que o isolamento seja feito. Retira-se então a lamínula da lâmina que agora estarão separadas contendo os oocistos nos resíduos de solução. Através de uma pipeta volumétrica (regulável entre 0,2 a 2,0 μ l), retirar-se esses resíduos da lâmina/lamínula e os transfere em gotas para a superfície da lâmina de isolamento. Observa-se essas gotas no microscópio e escolhe-se uma delas contendo oocistos do mesmo morfotipo. Essa será a gota isolada, enquanto as outras serão conseqüentemente desprezadas. Todos os oocistos da gota isolada são fotomicrografados. Posteriormente, agora utilizando uma pipeta de 20 a 200 μ l, acrescenta-se 100 μ l de solução de Lise em um microtubo estéril (eppendorf) de 1,5 mililitro (ml). Utiliza-se então parte do volume dessa solução para pingar em cima da gota contendo os oocistos e sugá-la subsequentemente, recuperando-a e transferindo-a para o eppendorf logo em seguida. Por fim, o eppendorf é identificado e encaminhado para o processamento da biologia molecular, sendo armazenado em temperatura ambiente (figuras 18 e 19).

A solução de Lise utilizada tem a seguinte composição: 10 milimolares (mM) de cloreto de sódio (NaCl); 10 milimolares (mM) de cloridrato de tris (TRIS-HCl) com pH 8,0; 25 milimolares (mM) de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS). O TRIS-HCl é um agente tamponante (tampão ácido) para ajustar o pH da solução. Já o EDTA, agente quelante, inibe a ação de enzimas que venham a degradar o DNA. E o SDS é um tensoativo aniônico com propriedades anfifílicas, conferindo a ele uma ação detergente.

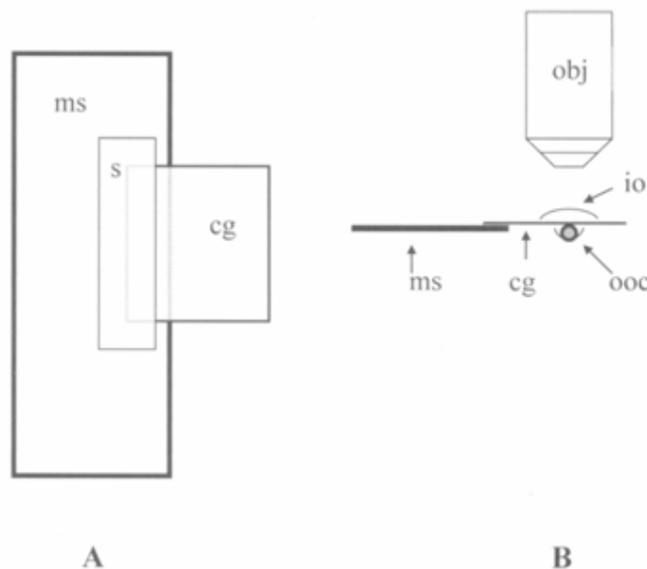


Figura 17 – Configuração da lâmina de isolamento montada. Na figura, (A) demonstra vista "superior"; (B) vista "frontal"; ms: lâmina de microscópio, s: fita adesiva; cg: lamínula, obj: objetiva de microscópio, io: óleo de imersão, ooc: gota com oocistos. Fonte: Dolnik et al. (2009).

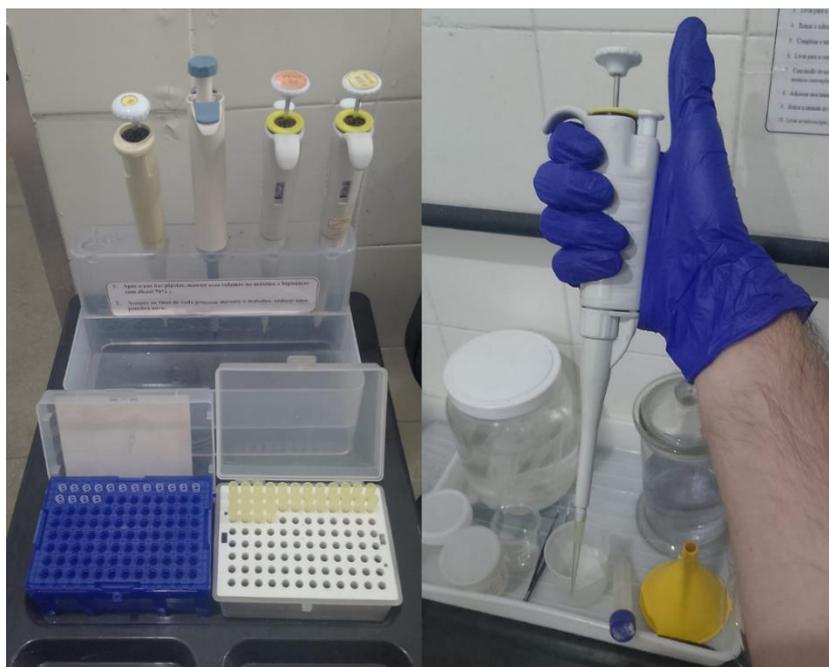


Figura 18 – Equipamentos utilizados para isolamento dos oocistos. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

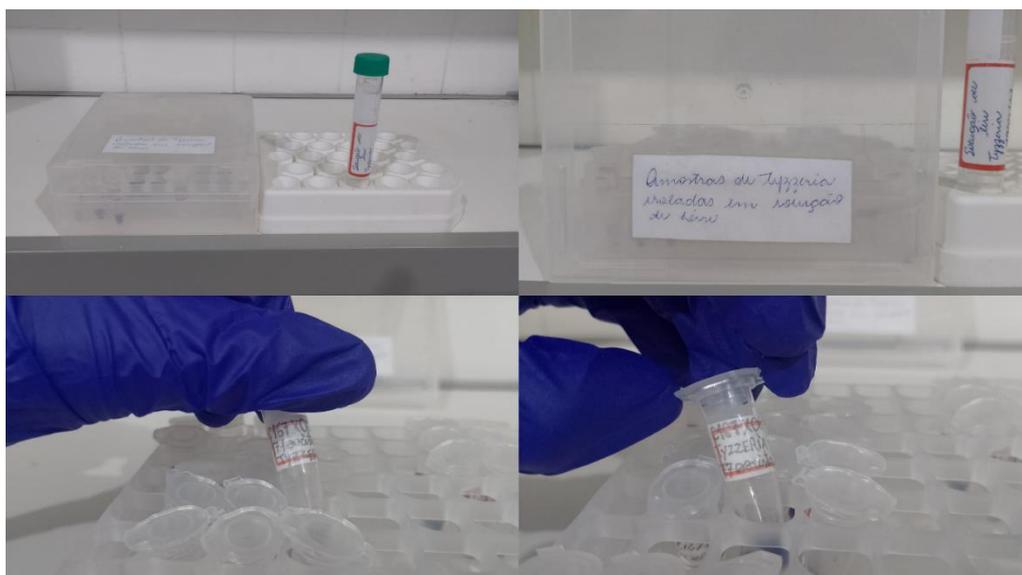


Figura 19 – Amostras contendo oocistos de *Tyzzeria* isolados em solução de Lise. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

4.8 Biologia molecular

Com os isolados em mãos, foram procedidas as etapas para extrair o DNA e realizar a técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase). A partir daqui todos os procedimentos foram

realizados no Laboratório de Genotoxicidade de Plantas (LaGeP), também situado no mesmo pavilhão do LABICOC (anexo II do ICBS).

4.8.1 Extração do DNA

Os oocistos, contidos nas amostras em 100 μ l de solução de Lise, são submetidos à extração de DNA com emprego de choque-térmico e proteinase K. Para tal, são adicionados em cada eppendorf mais 200 μ l de solução de Lise e 200 miligramas (mg) de pérolas de zircônia (Beads) (figura 20). Com o objetivo de quebrar a parede do oocisto, foram realizados ciclos que se alternavam entre choques térmicos e de atritos físicos. As amostras foram levadas ao vórtex para serem agitadas por 10 minutos, depois foram acondicionadas no freezer a -4°C por mais 10 minutos e em seguida incubadas em banho-maria a 60°C , novamente por mais 10 minutos. Todo esse processo de choque térmico e físico foi repetido por 4 vezes. Concluída esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos, depois retirou-se o sobrenadante e fez-se a transferência de cada amostra para um tubo novo. Essa metodologia foi adaptada de Funada (2009). Adiciona-se então 25 μ l de proteinase K ao tubo, levando-o novamente ao banho-maria para incubação a 60°C por 1 hora. A cada 30 minutos leva-se ao vórtex. Após a quebra de parede e a incubação com a proteinase K, foi utilizado o kit QUICK DNA (ZYMO RESEARCH), seguindo as informações do fabricante.

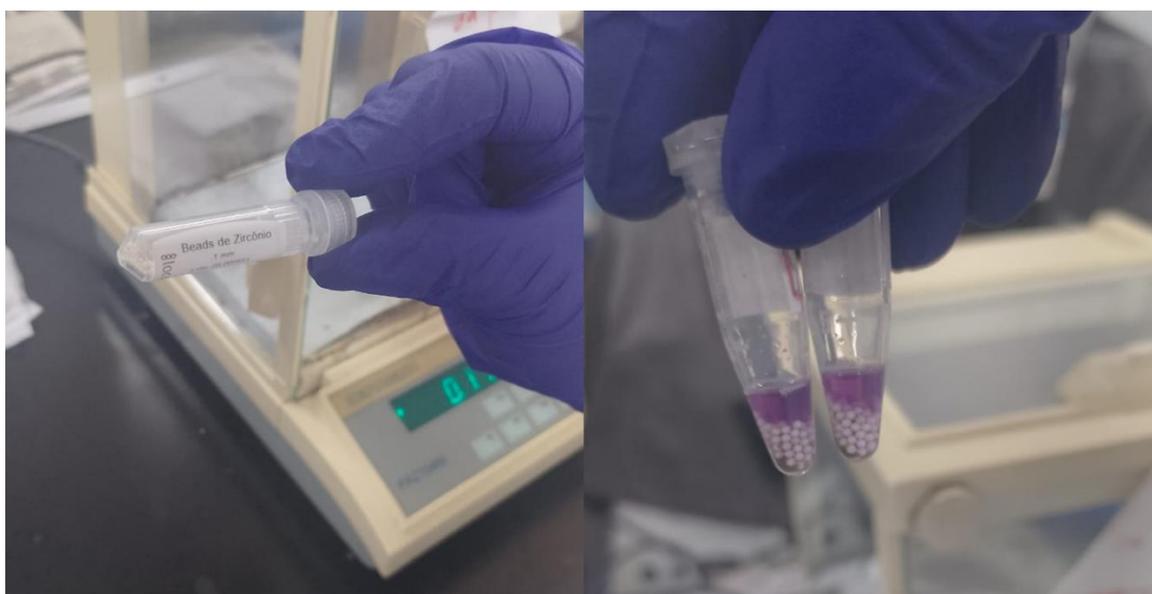


Figura 20 – Amostras dos isolados acrescidas com beads de zircônia. Fonte: Arquivo pessoal (2024).

A proteinase K é uma enzima serinoprotease de amplo espectro, comumente usada em biologia molecular para digerir proteínas ou remover a contaminação de preparações de ácido nucleico, sendo utilizada para a liberação de ácidos nucleicos, uma vez que inativa de forma muito eficaz DNases e RNases. A adição de proteinase K a preparações de ácidos nucleicos inativa rapidamente nucleases que poderiam degradar o DNA ou RNA durante a purificação. Assim, sua aplicação é altamente adequada, uma vez que a enzima é ativa na presença de produtos químicos que desnaturam e inibem proteínas, como SDS e agentes quelantes como EDTA (HILZ et al., 1975).

4.8.2 PCR e *nested* PCR

Prosseguindo, de agora em diante as amostras se encontram prontas para serem submetidas a PCR e *nested* PCR. As amostras de DNA extraído foram amplificadas pela PCR e *nested* PCR do gene codificador da subunidade menor do rRNA (CRY_SSU rRNA). Os primers e as condições utilizadas nas reações são descritos a seguir (Quadro 1):

Quadro 1. Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR e *nested* PCR.

	Primers	Sequências	Tamanho dos fragmentos	Ciclo	Referências
PCR	CRY_SSU F1	5'-GATTAAGCCATGCATGTCTAA-3'	~723	94°C 5' 35x (94°30", 54°C 45", 72° 1' 72° 5'	Pinto et al. (2021)
	CRY_SSU R1	5'-TTCCATGCTGGAGTATTCAAG3'			
<i>nested</i> PCR	CRY_SSU F2	5-CAGTTATAGTTTACTTGATAATC-3'	~631	94°C 5' 35x (94°30", 54°C 45", 72° 1' 72° 5'	
	CRY_SSU R2	5'-CCTGCTTTAAGCACTCTAATTTTC-3'			

As ampliações foram realizadas com um volume final de 25µl. A cada reação foi usado um controle negativo (água ultrapura), tanto para PCR quanto para o *nested* PCR. As reações consistiam em 0,2µM (0,25µl) para cada primer, 12,5µl de enzima GOTAq e 3µl de DNA extraído. O *nested* PCR foi realizado nas mesmas condições do PCR anterior, mas com emprego do primer CRY_SSU F2/CRY_SSU R2 e 3µl do produto da primeira reação.

4.8.3 Detecção do produto amplificado

Os fragmentos gerados nas reações de PCR e *nested* PCR foram analisados em eletroforese de cuba horizontal com gel de agarose a 1,2% previamente imersos em tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA). Uma alíquota de 3µl de cada amostra, somadas a 2µl

de GelREd e 1µl de corante blue green loading, foram adicionadas em cada poço do gel de agarose. Após a corrida, o gel foi visualizado em um trans-iluminador com luz ultravioleta. As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100pb disposto no gel juntamente com as amostras analisadas (figura 21).

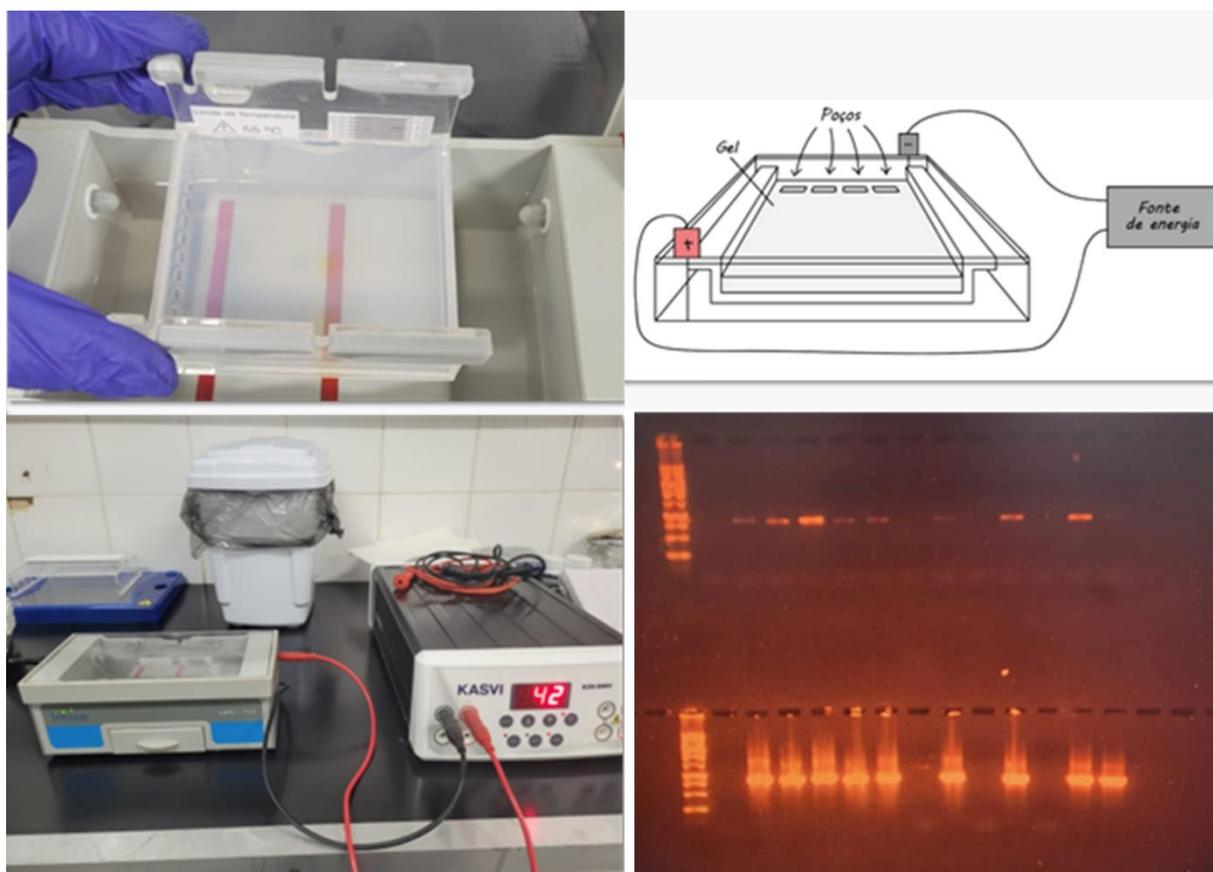


Figura 21 – Utilização da eletroforese em gel de agarose e avaliação dos resultados da PCR. Autoria: Mariana de Souza Oliveira.

4.8.4 Purificação do produto amplificado

Por fim, as amostras que apresentaram ampliações foram purificadas com kits RELIA PREP DNA, de acordo com instruções do fabricante. Após isto, foram preparadas para o sequenciamento, realizado pela ACTGene – Análises Moleculares Ltda.

4.9 Análises das sequências de DNA

Todos os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os primers de PCR forward e reverse, onde um Analisador Genético ABI-Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) foi usado para sequenciamento de Sanger. Os resultados das reações de sequenciamento foram analisados e editados através do programa Chromas 2.6. As sequências recém-geradas foram comparadas com as de outros coccídios disponíveis no banco de dados do GenBank usando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Os alinhamentos foram criados no MEGA v10.2.6 usando Clustal W ([//www.clustalw.genome.jp](http://www.clustalw.genome.jp)). Árvores filogenéticas foram construídas para espécies coccidianas com sequências de 18S adicionadas no GenBank. As relações filogenéticas foram reconstruídas usando a Inferência Bayesiana no MrBayes v3.2.7 (RONQUIST et al., 2012) e o método de máxima verossimilhança no MEGA (KUMAR et al., 2018). Os modelos evolutivos mais adequados para todas as análises filogenéticas foram selecionados pela Seleção de Modelos no MEGA. A análise de Inferência Bayesiana foi conduzida sob o modelo evolutivo GTR+G para 1.000.000 gerações, e as árvores foram resumidas após a remoção de 25% do burn-in. A análise de máxima verossimilhança foi realizada sob o modelo evolutivo TN93+G, e os valores de Bootstrap foram calculados por 1.000 réplicas para avaliar a confiabilidade de topologias de árvore inferidas. As árvores filogenéticas resultantes foram visualizadas em MrBayes e MEGA e exportadas em FigTree v1.4.4 ([//tree.bio.ed.ac.uk/](http://tree.bio.ed.ac.uk/)).

5 RESULTADOS

5.1 Prevalência, densidade parasitária e identificações

Do montante de 16 coletas realizadas, 9 estavam positivas (56,25%) para algum morfotipo de *Tyzzeria* sp. Foram elas: coleta 4, coleta 6, coleta 7, coleta 9, coleta 10, coleta 11, coleta 12, coleta 13 e coleta 14 (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados de prevalência das coletas.

Número da coleta	Hospedeiros	Prevalência	Morfotipo
Coleta 1	<i>A. cygnoides</i>	Negativa (-)	-
Coleta 2	<i>A. anser</i> / <i>A. cygnoides</i> (incluindo var. <i>domesticus</i>)	Negativa (-)	-
Coleta 3	<i>C. moschata domestica</i>	Negativa (-)	-
Coleta 4	<i>A. anser</i>	Positiva (+)	Morfotipo 1
Coleta 5	<i>A. platyrhynchos</i> (incluindo var. <i>domesticus</i>)	Negativa (-)	-
Coleta 6	<i>C. moschata domestica</i>	Positiva (+)	Morfotipo 2
Coleta 7	<i>C. moschata</i>	Positiva (+)	Morfotipos 2, 3, 4
Coleta 8	Híbrido (<i>A. platyrhynchos domesticus</i> + <i>C. moschata domestica</i>)	Negativa (-)	-
Coleta 9	<i>D. viduata</i>	Positiva (+)	Morfotipos 2, 3, 4
Coleta 10	<i>A. anser</i> / <i>A. cygnoides</i> / <i>C. moschata</i>	Positiva (+)	Morfotipo 1

<i>domestica / A. platyrhynchos</i>			
Coleta 11	<i>A. cygnoides</i>	Positiva (+)	Morfotipo 1
Coleta 12	<i>A. cygnoides</i>	Positiva (+)	Morfotipo 1
Coleta 13	<i>C. moschata domestica</i>	Positiva (+)	Morfotipos 2, 3
Coleta 14	<i>D. viduata</i>	Positiva (+)	Morfotipos 3, 4
Coleta 15	<i>C. moschata</i>	Negativa (-)	-
Coleta 16	<i>A. brasiliensis</i>	Negativa (-)	-

Foram identificados quatro morfotipos distintos do gênero. O morfotipo 1 foi encontrado apenas nas amostras dos gansos domésticos *A. anser* e *A. cygnoides*, ambos exóticos da avifauna brasileira. Já os demais morfotipos, foram observados somente nos anatídeos nativos do Brasil. Os morfotipo 2 e 3, em amostras do pato *C. moschata*, incluindo sua var. *domestica*; e na marreca selvagem *D. viduata*. E o morfotipo 4, foi observado nas espécies *C. moschata* e *D. viduata*.

Apenas oocistos esporulados foram considerados para as caracterizações morfológicas e medições. Segue abaixo, a relação de prevalência (+/-), densidade parasitária (OoPD) e morfotipos encontrados por amostras de cada uma das 16 coletas (Quadros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17):

Quadro 2. Dados referente à coleta 1: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	01					
Localidade da coleta	Criadouro Sombra e Água Fresca					
Data da coleta	28/02/2022					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01		a	17:00	-		



	<i>Anser cygnoides</i>	b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		

Quadro 3. Dados referente à coleta 2: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	02					
Localidade da coleta	Granja Comary					
Data da coleta	22/05/2022					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Anser anser</i> / <i>A. anser domesticus</i> / <i>Anser cygnoides</i> / <i>A. cygnoides domesticus</i> *amostra mista*	a	16:00	-		
		b	16:00	-		
		c	16:00	-		
		d	16:00	-		
		e	16:00	-		
		f	16:00	-		
		g	16:00	-		
		h	16:00	-		
		i	16:00	-		
		j	16:00	-		
		k	16:00	-		
		l	16:00	-		
		m	16:00	-		
		n	16:00	-		
o	16:00	-				

Quadro 4. Dados referente à coleta 3: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	03					
Localidade da coleta	Sítio Lago Santa Rita					
Data da coleta	15/06/2022					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Cairina moschata domestica</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		



Quadro 5. Dados referente à coleta 4: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	04					
Localidade da coleta	Criadouro Sombra e Água Fresca					
Data da coleta	31/07/2022					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Anser anser</i>	a	17:00	+	8	Morfotipo 1
		b	17:00	+	157	Morfotipo 1
		c	17:00	+	3	Morfotipo 1
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	+	20	Morfotipo 1
		j	17:00	+	1	Morfotipo 1
02	<i>Anser anser</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	+	6	Morfotipo 1



		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
03	<i>Anser anser</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	+	1	Morfotipo 1
04	<i>Anser anser</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	+	3	Morfotipo 1
		g	17:00	-		
		h	17:00	+	14	Morfotipo 1
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
05	<i>Anser anser</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	+	2	Morfotipo 1
		d	17:00	+	11	Morfotipo 1
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		

Quadro 6. Dados referente à coleta 5: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta		05				
Localidade da coleta		Hotel Fazenda Villa-Forte				
Data da coleta		02/01/2023				
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Anas platyrhynchos</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
02	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
03	<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		



Quadro 7. Dados referente à coleta 6: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta		06				
Localidade da coleta		Hotel Fazenda 3 Pinheiros				
Data da coleta		02/01/2023				
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Cairina moschata domestica</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	+	4	Morfotipo 2
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
02	<i>Cairina moschata domestica</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
03	<i>Cairina moschata domestica</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	+	2	Morfotipo 2
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		



Quadro 8. Dados referente à coleta 7: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	07					
Localidade da coleta	Hotel Fazenda Vale da Mantiqueira					
Data da coleta	28/01/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Cairina moschata</i>	a	8:00	-		
		b	8:00	-		
		c	8:00	+	2	Morfotipo 2
		d	8:00	-		
		e	8:00	-		
		f	8:00	-		
		g	8:00	-		
		h	8:00	-		
		i	8:00	+	46	Morfotipos 3, 4
		j	8:00	-		
02	<i>Cairina moschata</i>	a	8:00	+	241	Morfotipo 3
		b	8:00	+	289	Morfotipos 3, 4
		c	8:00	-		



Quadro 9. Dados referente à coleta 8: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	08					
Localidade da coleta	AnimAves Loja Agropecuária					
Data da coleta	02/02/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	"Pato mula" Híbrido (<i>Anas platyrhynchos domesticus</i> <i>x Cairina moschata domestica</i>)	a	13:00	-		
		b	13:00	-		
		c	13:00	-		
		d	13:00	-		
		e	13:00	-		
		f	13:00	-		
		g	13:00	-		



		h	13:00	-		
		i	13:00	-		
		j	13:00	-		

Quadro 10. Dados referente à coleta 9: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	09					
Localidade da coleta	Lago do IB, UFRuralRJ					
Data da coleta	08/02/2023					
						
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Dendrocygna viduata</i>	a	10:00	+	4	Morfotipo 2
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	+	1	Morfotipo 3
		j	10:00	-		
02	<i>Dendrocygna viduata</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	+	11	Morfotipos 3, 4
		f	10:00	-		
		g	10:00	+	3	Morfotipos 2, 3
		h	10:00	+	5	Morfotipo 3
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
03	<i>Dendrocygna viduata</i>	a	10:00	+	6	Morfotipos 3, 4
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	+	9	Morfotipo 3
		f	10:00	+	1	Morfotipo 3

		g	10:00	+	9	Morfotipo 3
		h	10:00	+	7	Morfotipos 2, 3

Quadro 11. Dados referente à coleta 10: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	10					
Localidade da coleta	Toca dos Bichos, Loja Agropecuária					
Data da coleta	02/03/2023					
						
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Anser cygnoides</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	+	5	Morfotipo 1
		d	10:00	+	1	Morfotipo 1
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	+	3	Morfotipo 1
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	+	1	Morfotipo 1
02	<i>Anser anser</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	+	1	Morfotipo 1
		d	10:00	+	3	Morfotipo 1
		e	10:00	+	16	Morfotipo 1
		f	10:00	-		
		g	10:00	+	2	Morfotipo 1
		h	10:00	+	1	Morfotipo 1
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
03	<i>Cairina moschata domestica</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		

		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		
04	<i>Anas platyrhynchos</i>	a	10:00	-		
		b	10:00	-		
		c	10:00	-		
		d	10:00	-		
		e	10:00	-		
		f	10:00	-		
		g	10:00	-		
		h	10:00	-		
		i	10:00	-		
		j	10:00	-		

Quadro 12. Dados referente à coleta 11: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	11					
Localidade da coleta	Criadouro Sombra e Água Fresca					
Data da coleta	01/04/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	+	4	Morfotipo 1
		d	17:00	+	1	Morfotipo 1
		e	17:00	+	1	Morfotipo 1
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	+	1	Morfotipo 1
02	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	+	5	Morfotipo 1
		c	17:00	+	7	Morfotipo 1
		d	17:00	-		

		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
03	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	+	1	Morfotipo 1
		f	17:00	-		
		g	17:00	+	1	Morfotipo 1
		h	17:00	+	1	Morfotipo 1
		i	17:00	+	1	Morfotipo 1
		j	17:00	+	1	Morfotipo 1
04	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
05	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
06	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		

		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
07	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		
08	<i>Anser cygnoides</i>	a	17:00	-		
		b	17:00	-		
		c	17:00	-		
		d	17:00	-		
		e	17:00	-		
		f	17:00	-		
		g	17:00	-		
		h	17:00	-		
		i	17:00	-		
		j	17:00	-		

Quadro 13. Dados referente à coleta 12: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	12					
Localidade da coleta	Criadouro Sombra e Água Fresca					
Data da coleta	10/06/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01		a	16:00	+	167	Morfotipo 1



	<i>Anser cygnoides</i>	b	16:00	+	2	Morfotipo 1
		c	16:00	+	171	Morfotipo 1
		d	16:00	+	329	Morfotipo 1
		e	16:00	+	19	Morfotipo 1
		f	16:00	+	62	Morfotipo 1
		g	16:00	+	77	Morfotipo 1
		h	16:00	+	126	Morfotipo 1
		i	16:00	+	28	Morfotipo 1
		j	16:00	+	415	Morfotipo 1
		k	16:00	-		
		l	16:00	-		
		m	16:00	-		
		n	16:00	+	5	Morfotipo 1
		o	16:00	+	16	Morfotipo 1
		p	16:00	-		
		02	<i>Anser cygnoides</i>	a	16:00	+
b	16:00			+	4	Morfotipo 1
c	16:00			+	15	Morfotipo 1
d	16:00			+	60	Morfotipo 1

Quadro 14. Dados referente à coleta 13: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	13					
Localidade da coleta	Hospital Veterinário Birds & Cia					
Data da coleta	05/10/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Cairina moschata</i>	a	09:00	-		
		b	09:00	+	15	Morfotipos 2, 3



Quadro 15. Dados referente à coleta 14: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	14					
Localidade da coleta	Lago do IB, UFRuralRJ					
Data da coleta	13/10/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Dendrocygn a viduata</i>	a	9:00	-		
		b	9:00	-		
		c	9:00	-		
		d	9:00	-		
		e	9:00	-		
		f	9:00	-		
		g	9:00	-		
		h	9:00	-		
		i	9:00	-		
		j	9:00	-		
02	<i>Dendrocygn a viduata</i>	a	9:00	-		
		b	9:00	-		
		c	9:00	-		
		d	9:00	-		
		e	9:00	-		
		f	9:00	-		
		g	9:00	-		
		h	9:00	-		
		i	9:00	-		
		j	9:00	-		
03	<i>Dendrocygn a viduata</i>	a	9:00	-		
		b	9:00	-		
		c	9:00	-		
		d	9:00	-		
		e	9:00	-		
		f	9:00	-		
		g	9:00	-		
		h	9:00	-		
		i	9:00	-		
		j	9:00	-		
04		a	9:00	+	2	Morfotipo 3



		b	9:00	+	3	Morfotipo 4
		c	9:00	-		
		d	9:00	-		
		e	9:00	-		
	<i>Dendrocygn a viduata</i>	f	9:00	+	1	Morfotipo 4
		g	9:00	+	2	Morfotipo 3
		h	9:00	-		
		i	9:00	-		
		j	9:00	-		
05	<i>Dendrocygn a viduata</i>	a	9:00	-		
		b	9:00	-		
		c	9:00	+	5	Morfotipo 4
		d	9:00	-		
		e	9:00	-		
		f	9:00	-		
		g	9:00	-		
		h	9:00	-		
		i	9:00	-		
		j	9:00	-		
06	<i>Dendrocygn a viduata</i>	a	9:00	-		
		b	9:00	-		
		c	9:00	+	3	Morfotipo 4
		d	9:00	+	11	Morfotipos 3, 4
		e	9:00	-		
		f	9:00	-		
		g	9:00	-		
		h	9:00	+	16	Morfotipo 4
		i	9:00	+	3	Morfotipo 3
		j	9:00	+	4	Morfotipo 3
07	<i>Dendrocygn a viduata</i>	a	9:00	+	2	Morfotipo 3
		b	9:00	-		
		c	9:00	-		
		d	9:00	-		

Quadro 16. Dados referente à coleta 15: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	15					
Localidade da coleta	HVPA (setor de silvestres)					
Data da coleta	19/10/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Cairina moschata</i>	a	09:00	-		
		b	09:00	-		
		c	09:00	-		
		d	09:00	-		



Quadro 17. Dados referente à coleta 16: resultados de prevalência, densidade parasitária e identificação.

Código da coleta	16					
Localidade da coleta	Alagado do PSA, UFRuralRJ					
Data da coleta	15/11/2023					
Número do hospedeiro	Espécie hospedeira	Código da amostra	Horário da coleta	(+/-)	OoPD	Morfotipo
01	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	a	09:00	-		
		b	09:00	-		
		c	09:00	-		
		d	09:00	-		



Na coleta 1, nenhuma das 10 amostras obtidas foram positivas (prevalência de 0%). Na coleta 2, também todas as 15 amostras deram negativo (prevalência de 0%). Na coleta 3, esse padrão se repetiu, com todas as 8 amostras estando negativas (prevalência de 0%). Já na coleta 4, das 46 amostras, 11 estavam positivas, representando uma prevalência de 23,9%. Todos os hospedeiros estavam parasitados. A densidade parasitária média do hospedeiro 01 foi de 18,9 (189 de OoPD total ÷ 10 amostras), a do hospedeiro 02 foi de 0,6 (6 ÷ 10), a do hospedeiro 03 foi de 0,1 (1 ÷ 10), a do hospedeiro 04 foi de 1,7 (17 ÷ 10) e a do hospedeiro 05 foi de 2,2 (13 ÷ 6). Na coleta 5, novamente nenhuma das 30 amostras foram positivas (prevalência de 0%). Na coleta 6, das 30 amostras, 2 deram positivo (prevalência de 6,6%). Apenas dois hospedeiros estavam

parasitados. O hospedeiro 01 teve uma densidade parasitária média de 0,4 ($4 \div 10$), enquanto a do hospedeiro 03 foi de 0,2 ($2 \div 10$). Na coleta 7, das 13 amostras, 4 deram positivo (prevalência de 30,7%). Todos os hospedeiros estavam parasitados. O hospedeiro 01 teve uma densidade parasitária média de 4,8 ($48 \div 10$), já o hospedeiro 02 teve uma densidade parasitária média de 176,6 ($530 \div 3$). A coleta 8 deu resultado negativo para todas as suas amostras (prevalência de 0%). A coleta 9 também deu resultado positivo, em 10 das suas 28 amostras (prevalência de 35,7%). Todos seus hospedeiros estavam parasitados. A densidade parasitária média do hospedeiro 01 foi de 0,5 ($5 \div 10$), do hospedeiro 02 foi de 1,9 ($19 \div 10$) e a do hospedeiro 03 de 4,0 ($32 \div 8$). Na coleta 10, das 40 amostras 9 deram positivo (prevalência de 22,5%). Metade dos hospedeiros avaliados estavam parasitados. O hospedeiro 01 teve densidade parasitária média de 1 ($10 \div 10$) e o hospedeiro 02 de 2,3 ($23 \div 10$). Na coleta 11, das 80 amostras, 11 deram positivo (prevalência de 13,75%), com apenas 3 hospedeiros parasitados. A densidade parasitária média do hospedeiro 01 foi de 0,7 ($7 \div 10$), do hospedeiro 02 de 1,2 ($12 \div 10$) e do hospedeiro 03 de 0,5 ($5 \div 10$). A coleta 12 positivou para 16 das 20 amostras (prevalência de 80%). O hospedeiro 01 teve densidade parasitária média de 88,5 ($1.417 \div 16$) e o hospedeiro 02 de 26,5 ($106 \div 4$). A coleta 13 teve prevalência de 50% com 1, das 2 amostras obtidas, dando positivo. O único hospedeiro (01) teve densidade parasitária média de 7,5 ($15 \div 2$). A coleta 14 positivou 11 das 64 amostras (prevalência de 17,2%). Apenas 4 hospedeiros estavam parasitados, com o hospedeiro 04 tendo uma densidade parasitária de 0,8 ($8 \div 10$), o hospedeiro 05 com 0,5 ($5 \div 10$), o hospedeiro 06 com 3,7 ($37 \div 10$) e o hospedeiro 07 com 0,5 ($2 \div 4$). E finalmente, as coletas 15 e 16 deram negativas para todas as suas 4 amostras cada, representando uma prevalência de 0% para ambas.

O morfotipo mais prevalente foi o tipo 1, sendo encontrado em 47 amostras fecais (11,6%) e 4 coletas diferentes (25%). Em seguida, aparece o morfotipo 3, sendo observado em 19 amostras (4,7%) e 4 coletas (25%). Depois, o morfotipo 4 sendo observado em 9 amostras (2,2%) e 3 coletas (18,75%). E por último, o morfotipo 2, que foi encontrado em 7 amostras (1,7%) e 4 coletas (25%). O morfotipo 1 foi identificado como *T. parvula* conforme sua caracterização prévia estabelecida na literatura científica, para seus respectivos hospedeiros. Os demais morfotipos foram registrados para hospedeiros nunca antes relatados, com alguns apresentando parede áspera, característica essa inédita, representando assim, novas espécies em potencial ou uma espécie altamente polimórfica. Isso será debatido mais profundamente no tópico 6.4 da discussão. Cada um dos morfotipos são descritos detalhadamente a seguir:

5.2 Caracterizações morfológica/morfométrica dos morfotipos encontrados

5.2.1 Morfotipo 1

Oocistos sub esféricos (n=180), medindo 11–17 x 9–14 μm (13,5 x 12,0), com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,4 μm (1,1). Parede do oocisto é dupla (bicamada interna, externa), lisa, variando entre grossa e fina, com espessura de 0,5–1,4 μm (1,0) (n=144). Micrópila ausente. Corpo residual (ou resíduo do oocisto) presente, formando uma massa compacta e arredondada (n=22), medindo 4–7 x 4–6 μm (5,0 x 4,6) com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,3 μm (1,1). O corpo residual é constituído de pequenas esférulas agregadas entre si, mas que às vezes se encontram dispersas. Esporocistos ausentes. Esporozóitos vermiformes em formato de “banana”, com corpos refráteis anteriores e posteriores; e um núcleo central. Apresentaram um comprimento de 6–10 μm (8,1) e largura de 1–3 μm (1,9) (n=53). E seus corpos refráteis (n=44) tinham diâmetros de 2–3 x 2–3 μm (2,5 x 2,2) e índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,8 μm (1,1). Este morfotipo foi compatível com a espécie *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimeš, 1963 (figuras 22, 23 e 24).



Figura 22 – Desenho de linha do morfotipo 1 (*Tyzzeria parvula*). Autor: Carlos Nei Ortúzar Ferreira



Figura 23 – Fotomicrografias do morfotipo 1 (*Tyzzeria parvula*). Barra de escala: 5 μ m.

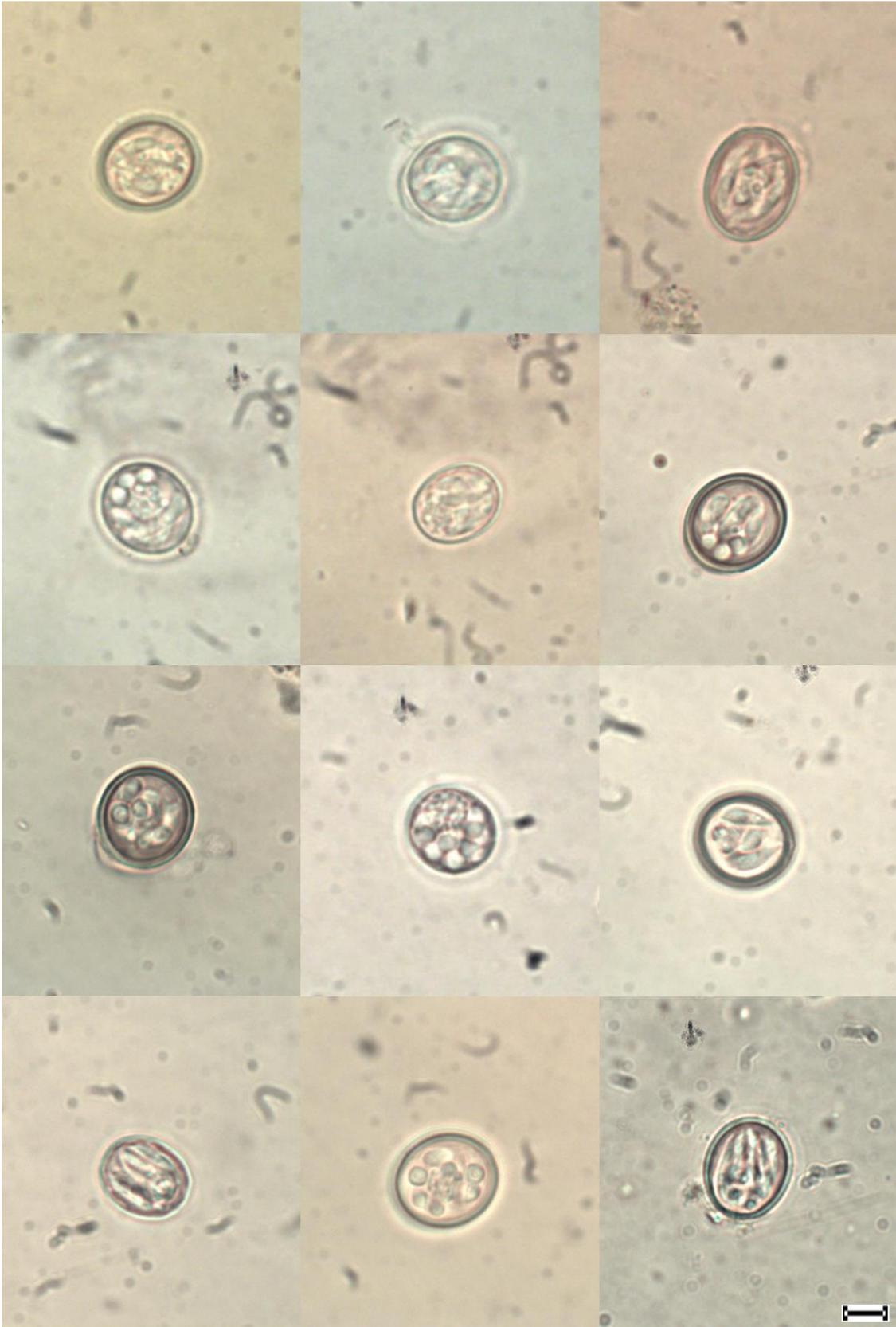


Figura 24 – Fotomicrografias do morfotipo 1 (*Tyzzeria parvula*). Barra de escala: 5 μ m.

5.2.2 Morfotipo 2

Oocistos elipsoidais (n=22), medindo 11–16 x 8–14 μm (13,6 x 10,4), com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,6 μm (1,3). Parede do oocisto é dupla (bicamada interna, externa), lisa e fina, com espessura de 0,6–1,2 μm (0,8) (n=22). Micrópila ausente. Corpo residual (ou resíduo do oocisto) presente, formando uma massa compacta e arredondada (n=3), medindo 4–6 x 4–5 μm (5,1 x 4,4) com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,4 μm (1,2). O corpo residual é constituído de pequenas esférulas agregadas entre si, mas que às vezes se encontram dispersas. Esporocistos ausentes. Esporozóitos vermiformes em formato de “banana”, com corpos refráteis anteriores e posteriores; e um núcleo central. Apresentaram um comprimento de 6–10 μm (7,4) e largura de 1–2 μm (1,5) (n=6). E seus corpos refráteis (n=11) tinham diâmetros de 2–3 x 2–3 μm (2,7 x 2,3) e índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,3 μm (1,1) (figuras 25 e 26).

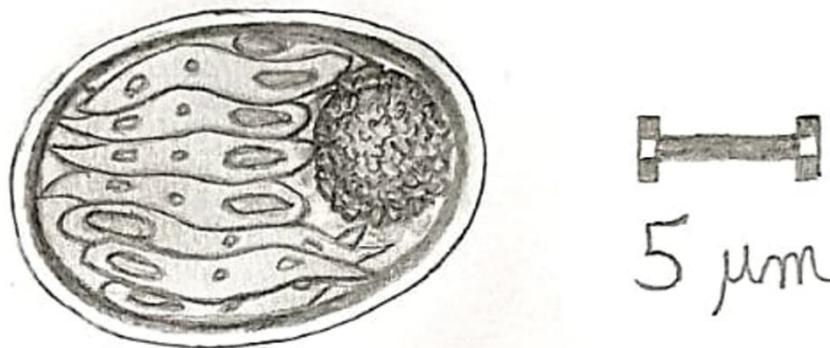


Figura 25 – Desenho de linha do morfotipo 2. Autor: Carlos Nei Ortúzar Ferreira

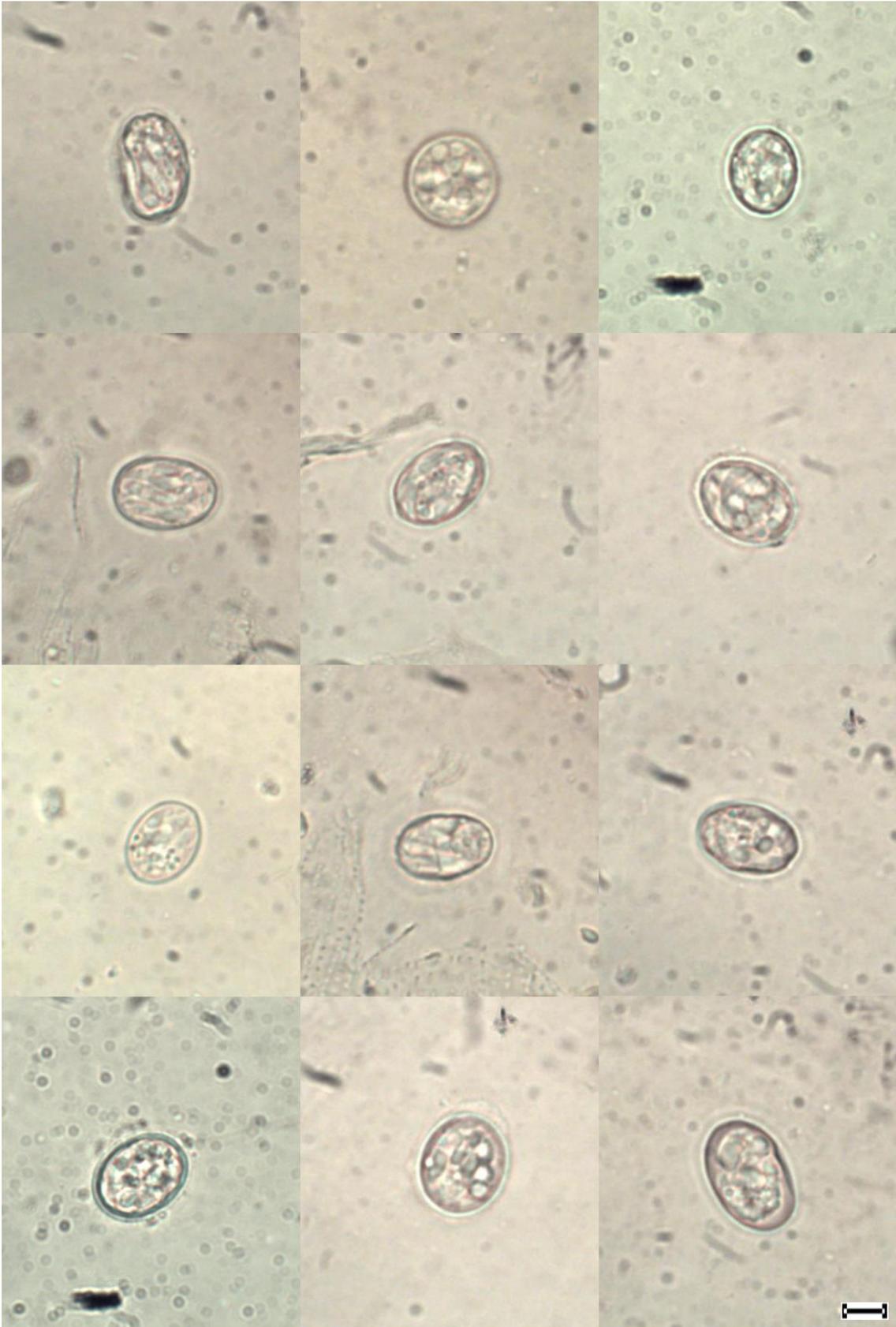


Figura 26 – Fotomicrografias do morfotipo 2. Barra de escala: 5 μm .

5.2.3 Morfotipo 3

Oocistos elipsoidais (n=58), medindo 11–18 x 10–14 μm (14,5 x 11,7), com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,7 μm (1,2). Parede do oocisto é dupla (bicamada interna, externa), grossa e ligeiramente áspera, com espessura de 0,7–1,9 μm (1,1) (n=58). Micrópila ausente. Corpo residual (ou resíduo do oocisto) presente, formando uma massa compacta e arredondada (n=4), medindo 4–6 x 4–5 μm (5,5 x 4,9) com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,2 μm (1,1). O corpo residual é constituído de pequenas esférulas agregadas entre si, mas que às vezes se encontram dispersas. Esporocistos ausentes. Esporozóitos vermiformes em formato de “banana”, com corpos refráteis anteriores e posteriores; e um núcleo central. Apresentaram um comprimento de 6–10 μm (8,2) e largura de 2–3 μm (2,2) (n=16). E seus corpos refráteis (n=19) tinham diâmetros de 2–3 x 1–3 μm (2,4 x 2,1) e índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,5 μm (1,1) (figuras 27 e 28).



Figura 27 – Desenho de linha do morfotipo 3. Autor: Carlos Nei Ortúzar Ferreira

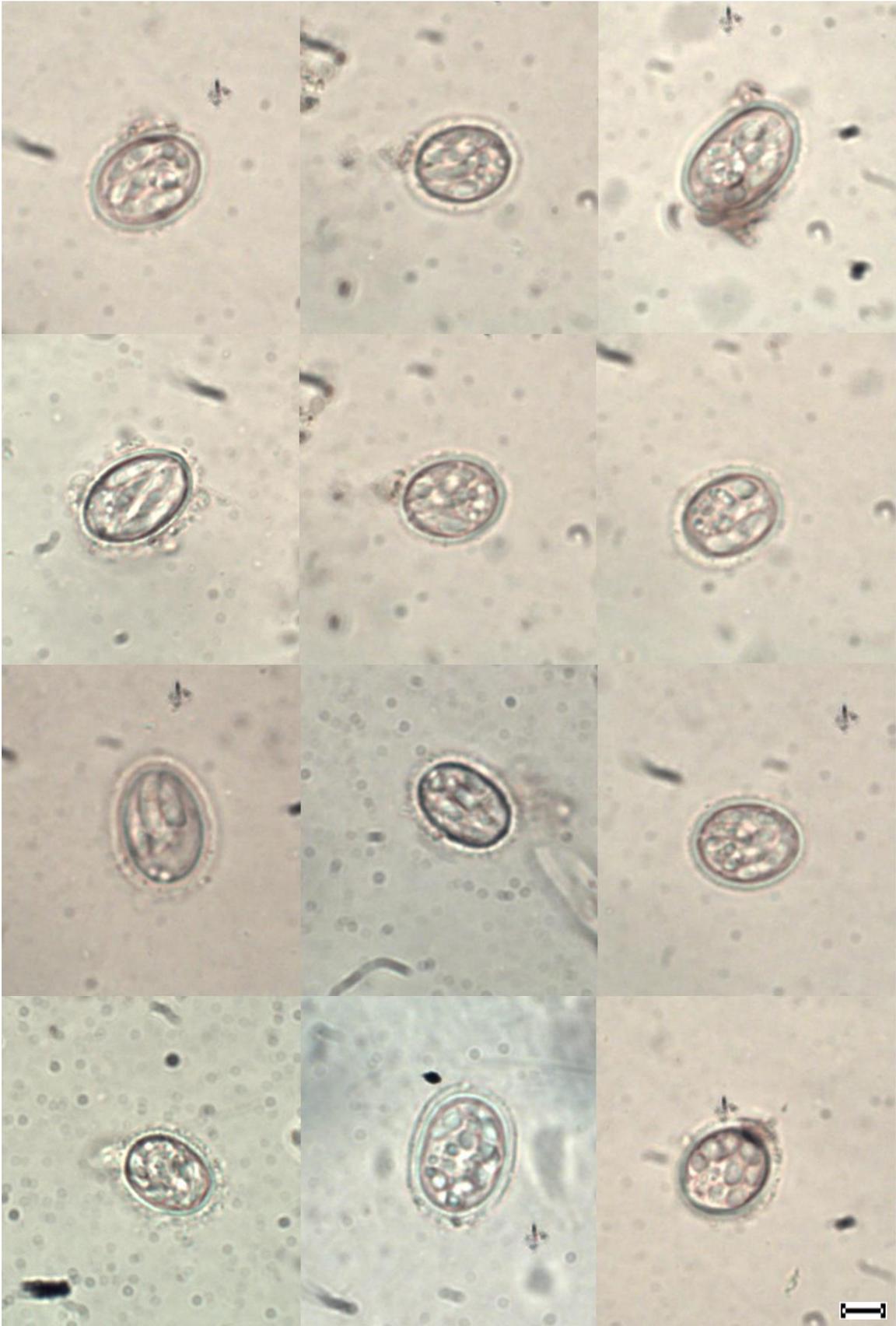


Figura 28 – Fotomicrografias do morfotipo 3. Barra de escala: 5 μm .

5.2.4 Morfotipo 4

Oocistos elipsoidais (n=39), medindo 10–18 x 9–14 μm (14,7 x 11,2), com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,9 μm (1,3). Parede do oocisto é dupla (bicamada interna, externa), grossa, extremamente áspera, com diversas reentrâncias e projeções espinhosas, com espessura de 0,9–2,4 μm (1,4) (n=39). Micrópila ausente. Corpo residual (ou resíduo do oocisto) presente, formando uma massa compacta e arredondada (n=3), medindo 4–6 x 4–6 μm (5,1 x 4,9) com índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,0 μm (1,0). O corpo residual é constituído de pequenas esférulas agregadas entre si, mas que às vezes se encontram dispersas. Esporocistos ausentes. Esporozóitos vermiformes em formato de “banana”, com corpos refráteis anteriores e posteriores; e um núcleo central. Apresentaram um comprimento de 7–10 μm (7,6) e largura de 1–2 μm (1,8) (n=8). E seus corpos refráteis (n=16) tinham diâmetros de 2–4 x 1–3 μm (2,4 x 2,0) e índice morfométrico DM/dm (relação comprimento/largura) de 1,0–1,7 μm (1,2) (figuras 29 e 30).



Figura 29 – Desenho de linha do morfotipo 4. Autor: Carlos Nei Ortúzar Ferreira

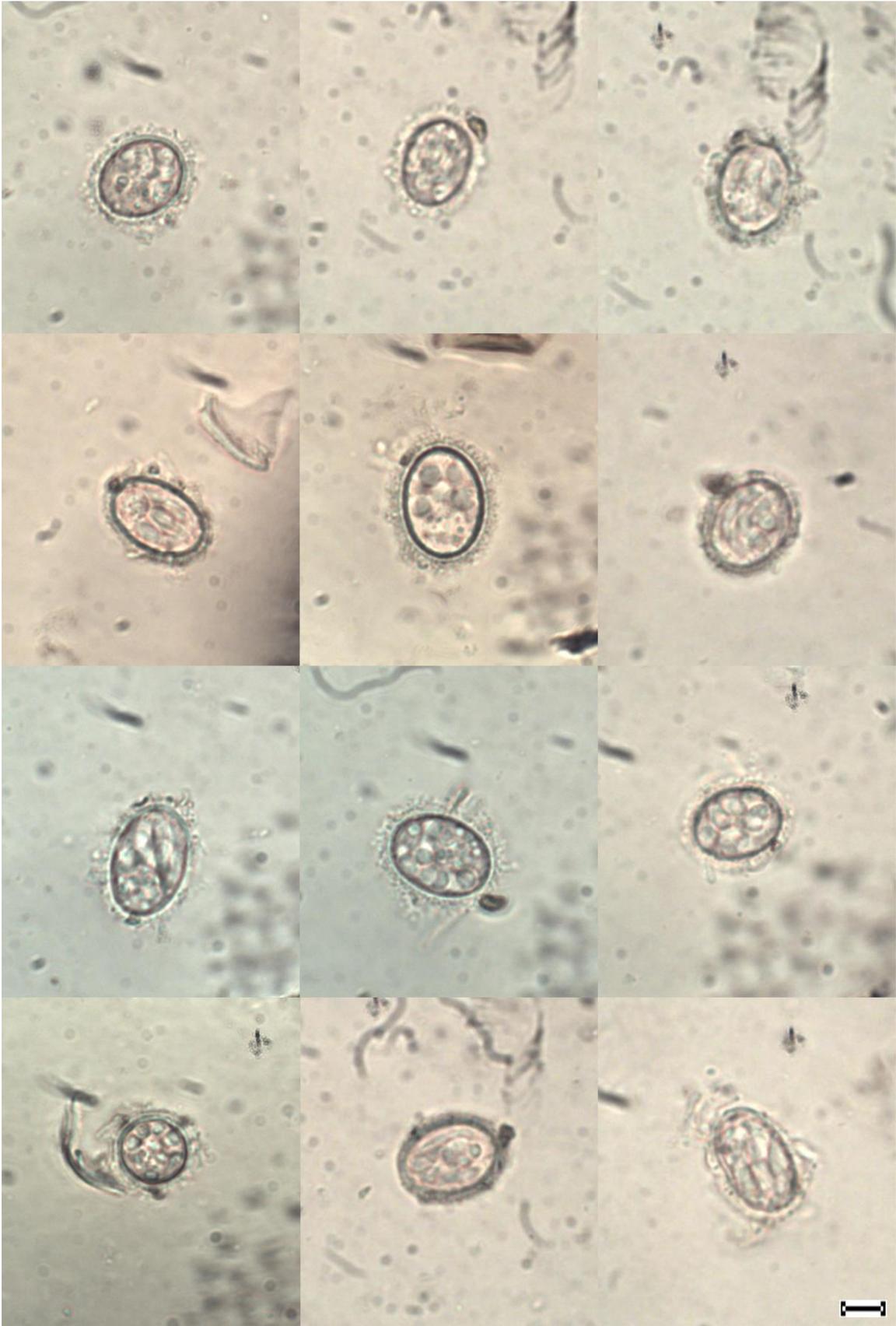


Figura 30 – Fotomicrografias do morfotipo 4. Barra de escala: 5 μm .

5.3 Comparação de dados morfométricos e morfológicos de *Tyzzeria* spp.

Foi delineada uma análise aprofundada de morfologia e morfometria comparada de todos os morfotipos encontrados com todas as espécies de *Tyzzeria* já descritas (não apenas na ordem Anseriformes) (Tabela 5). Levando em consideração o número amostral de oocistos analisados, parâmetros morfológicos/morfométricos, sequenciamentos realizados e aspectos de especificidade parasitária no hospedeiro; apenas o morfotipo 1 pôde ser identificado. A identificação desse morfotipo, bem como, os fatores limitantes para a identificação dos demais são abordados no tópico 6.4. O morfotipo 1 foi compatível com *T. parvula* e assim sendo, foi comparado com as descrições anteriores para essa espécie (Tabela 6).

Tabela 5. Morfologia/morfometria comparada entre as espécies de *Tyzzeria*.

Espécie/morfotipo	Hospedeiro	Localidade	Referência	Oocisto							
				Formato	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Razão C/L	Parede (µm)	Resíduo	Micrópila	Grânulo polar
<i>T. allenae</i>	<i>N. coromandelianus</i>	Índia, Ásia	Chakravarty e Basu (1946)	Oval	14,48–17,37	9,63–11,5	-	Lisa	Presente, esférico e compacto	Ausente	Ausente
<i>T. boae</i>	<i>B. constrictor</i>	Brasil, América do Sul	Lainson e Paperna (1994)	Esféricos a sub esféricos	15,0–22,5 (19,0)	15,0–21,5 (18,0)	1,0–1,1 (1,0)	Lisa e extremamente delicada	Presente, esférico e volumoso contendo grânulos	Ausente	Ausente

<i>T. chenicusae</i>	<i>N. coromandelianus</i>	Índia, Ásia	Ray e Sarkar (1967)	Amplamente cilíndricos	20,4–27,6 (24,84)	14,4–20,4 (16,8)	1,0–1,5	Lisa, ~ 1,4	Presente, consistindo de uma massa compacta de corpos granulares	Ausente	Ausente
<i>T. galli</i>	<i>G. lafayettii</i>	Sri Lanka, Ásia	Fernando e Remmler (1973)	Esferóides	15	12	-	Lisa, delicada e de parede única	Presente, de aspecto granular e envolvido por uma membrana externa	Ausente	Presente
<i>T. natrix</i>	<i>R. tigrinus</i>	Japão, Ásia	Matubayasi (1936) e Matubayasi (1937)	Esféricos	16,1	11,7	-	Lisa e de parede única	Presente, reduzido, de formato côncavo e subsférico, formado por vários grânulos menores superficiais	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser domesticus</i>	Tchecoslováquia, Europa	Klimeš (1963)	Ligeiramente elíptico a esférico	12–17 (14,8)	11–15 (12,8)	1,1	Lisa, fina, ~ 0,5	Presente, relativamente grande, consistindo de um aglomerado de grânulos compactos	Ausente	Ausente
<i>T. pellerdyi</i>	<i>M. strepera e A. nyroca</i>	Índia, Ásia	Bhatia e Pande (1966)	Sub esféricos a ovóides	11–16 (13)	8–11 (10)	-	Lisa, 0,5–0,7	Presente, compacto com glóbulos de tamanhos variados	Ausente	Ausente

<i>T. pernicioso</i>	<i>A. platyrhynchos domesticus</i>	Estados Unidos, América do Norte	Allen (1936)	Elípticos	10–13,3	9–10,8	-	Lisa, dupla e espessa	Presente, composto por grânulos de vários tamanhos, geralmente esféricos	Ausente	Ausente
				Elipsoidais	14–17 (15,2)	11–12 (11,2)	1,3–1,5 (1,36)	Lisa e de parede única, ~ 0,6	Presente, pequeno e compacto	Ausente	Presente, 1–2
<i>T. peromysci</i>	<i>P. leucopus e P. maniculatus</i>	Estados Unidos, América do Norte	Levine e Ivens (1960)	Elipsoidais	11–14 (12,6)	9–11 (10,1)	1,1–1,4 (1,24)	Lisa e de parede única, ~ 0,6	Ausente	Ausente	Presente, 1–2
<i>T. typhlopisi</i>	<i>X. vermicularis</i>	Turquemenistão, Ásia	Ovezmukhamedov (1968)	Oval	31,5–32,4	18,9–20,7	-	Lisa	Ausente	Ausente	Ausente
Morfotipo 1 (<i>T. parvula</i>)	<i>A. anser e A. cygnoides</i>	Brasil, América do Sul	Presente estudo	Sub esféricos	11–17 (13,5)	9–14 (12,0)	1,0–1,4 (1,1)	Lisa, dupla, variando entre espessura grossa e fina, 0,5–1,4 (1,0)	Presente, formando uma massa compacta e arredondada, constituído de esférulas que podem estar agregadas ou dispersas	Ausente	Ausente

Morfotipo 2	<i>C. moschata</i> , <i>C. m. domestica</i> e <i>D. viduata</i>	Brasil, América do Sul	Presente estudo	Elipsoidal	11–16 (13,6)	8–14 (10,4)	1,0–1,6 (1,3)	Lisa, dupla e fina, 0,6– 1,2 (0,8)	Presente, formando uma massa compacta e arredondada, constituído de esférulas que podem estar agregadas ou dispersas	Ausente	Ausente
Morfotipo 3	<i>C. moschata</i> , <i>C. m. domestica</i> e <i>D. viduata</i>	Brasil, América do Sul	Presente estudo	Elipsoidal	11–18 (14,5)	10–14 (11,7)	1,0–1,7 (1,2)	Ligeira- mente áspera, dupla e grossa, 0,7–1,9 (1,1)	Presente, formando uma massa compacta e arredondada, constituído de esférulas que podem estar agregadas ou dispersas	Ausente	Ausente
Morfotipo 4	<i>C. moschata</i> e <i>D. viduata</i>	Brasil, América do Sul	Presente estudo	Elipsoidal	10–18 (14,7)	9–14 (11,2)	1,0–1,9 (1,3)	Extrema- mente áspera, dupla e grossa, 0,9–2,4 (1,4)	Presente, formando uma massa compacta e arredondada, constituído de esférulas que podem estar agregadas ou dispersas	Ausente	Ausente

Tabela 6. Dados comparativos de morfologia e morfometria entre as várias caracterizações feitas de *Tyzzeria parvula*.

Espécie	Hospedeiro	Localidade	Referência	Oocisto							
				Formato	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Razão C/L	Parede (µm)	Resíduo	Micrópila	Grânulo polar
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser</i>	Hungria, Europa	Kotlán (1933)	Elíptico-arredondado	10–15	10–14	-	Lisa e delicada	-	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser</i>	Holanda, Europa	Nieschulz (1947)	Ligeiramente alongados e elípticos	12–16 (14,0)	10–12,5 (11,5)	-	Lisa e moderadamente espessa	Presente, bastante grande, redondo e compacto	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser domesticus</i>	Tchecoslováquia, Europa	Klimeš (1963)	Ligeiramente elíptico a esférico	12–17 (14,8)	11–15 (12,8)	1,1	Lisa, fina, ~ 0,5	Presente, relativamente grande, consistindo de um aglomerado de grânulos compactos	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser</i>	Alemanha, Europa	Pellérdy (1974)	Esféricos a sub esféricos	17	12	-	Lisa	Presente	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>B. hutchinsii leucopareia</i>	Estados Unidos, América do Norte	Greiner et al. (1981)	Sub esféricos	11–15 (13,3)	10–13 (11,7)	-	Lisa	Presente	Ausente	Ausente

<i>T. parvula</i>	<i>B. canadensis</i>	Canadá, América do Norte	Skene et al. (1981)	Pequenos e redondos	11,3–15,1 (13,1)	8,7–13,9 (11,1)	-	Lisa e fina	Presente	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser</i>	França, Europa	Chauve (1988)	Pequenos, esféricos a sub esféricos	13,2	13,2	-	Lisa e fina	Presente	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. anser</i>	Brasil, América do Sul	Berto et al. (2007)	Esféricos a sub esféricos	12,4–18,0 (15,4)	10,7–15,9 (13,4)	1,15	Lisa, dupla e medindo entre 0,4–0,7	Presente, contendo numerosos grânulos e esférulas	Ausente	Ausente
<i>T. parvula</i>	<i>A. cygnoides</i>	Brasil, América do Sul	Berto et al. (2008)	Esféricos a sub esféricos	11–15 (12,4)	8,0–12,0 (10,4)	1,0–1,4 (1,2)	Lisa, dupla e medindo entre 0,6–0,8 (0,7)	Presente, às vezes formando uma massa de esférulas e grânulos, outras vezes disperso	Ausente	Ausente
Morfotipo 1 (<i>T. parvula</i>)	<i>A. anser</i> e <i>A. cygnoides</i>	Brasil, América do Sul	Presente estudo	Sub esféricos	11–17 (13,5)	9–14 (12,0)	1,0–1,4 (1,1)	Lisa, dupla, variando entre espessura grossa e fina, 0,5– 1,4 (1,0)	Presente, formando uma massa compacta e arredondada, constituído de esférulas que podem estar agregadas ou dispersas	Ausente	Ausente

5.4 Caracterização molecular de *Tyzzeria parvula*

A amplificação de DNA para o *locus* CRYSSU do gene 18S a partir de três amostras contendo oocistos isolados e identificados como o morfotipo 1, os quais são morfologicamente compatíveis com a espécie *T. parvula*, resultou em bandas claras em torno de ~XXX pb. Após sequenciamento das três amostras distintas, obteve-se 100% de similaridade entre estas sequências. Esta sequência representativa foi depositada no banco de dados GenBank sob o código de acesso: XXXXXXXX.

A sequência de *T. parvula* foi similar em torno de ~92% até ~94% com outros coccídios depositados no banco de dados GenBank. A maior similaridade, de 94,2%, foi com um coccídio denominado como *Caryospora-Like*, o qual foi associado à mortalidade de tartaruga-verdes *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) na costa atlântica dos Estados Unidos (código de acesso: MN450816). A sequência de *T. parvula* deste estudo também foi próxima de *Schellackia orientalis* Telford, 1993 (código de acesso: KC788221) obtida do lagarto-asiático *Takydromus sexlineatus* Daudin, 1802 com 94,06% de similaridade; e de *Eimeria arnyi* Upton & Oppert, 1991 (código de acesso: AY613853) obtida da cobra-de-pescoço-anelado *Diadophis punctatus* (Linnaeus, 1766) com 93,91% de similaridade.

A análise filogenética baseada no *locus* CRYSSU incluiu sequências de dinoflagelados, gregarinas, hematozoários e coccídios de diferentes táxons disponíveis no GenBank (figura 31). Uma ameba do gênero *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931 foi usada como grupo externo. Após análise, o cladograma resultou em grupos monofiléticos bem delimitados com espécies dos principais táxons de cromistas selecionados para este estudo filogenético (figura 31): Superclasse Dinoflagellata; Classe Gregarinomorpha; Classe Paragregaria; Subclasse Hematozoa; Ordem Adeleida; e Ordem Eimeriida. A sequência de *T. parvula* deste estudo foi alocada num pequeno grupo monofilético com a sequência de *Eimeria ranae* Dobell, 1909, parasito de rãs-comuns *Rana temporaria* Linnaeus, 1758, a qual obteve similaridade de 93,63%. Num grupo monofilético anterior, *T. parvula* foi alocada com *Schellackia* spp., *Eimeria* spp. e *Caryospora-Like* spp. parasitos de répteis e anfíbios (figura 32).

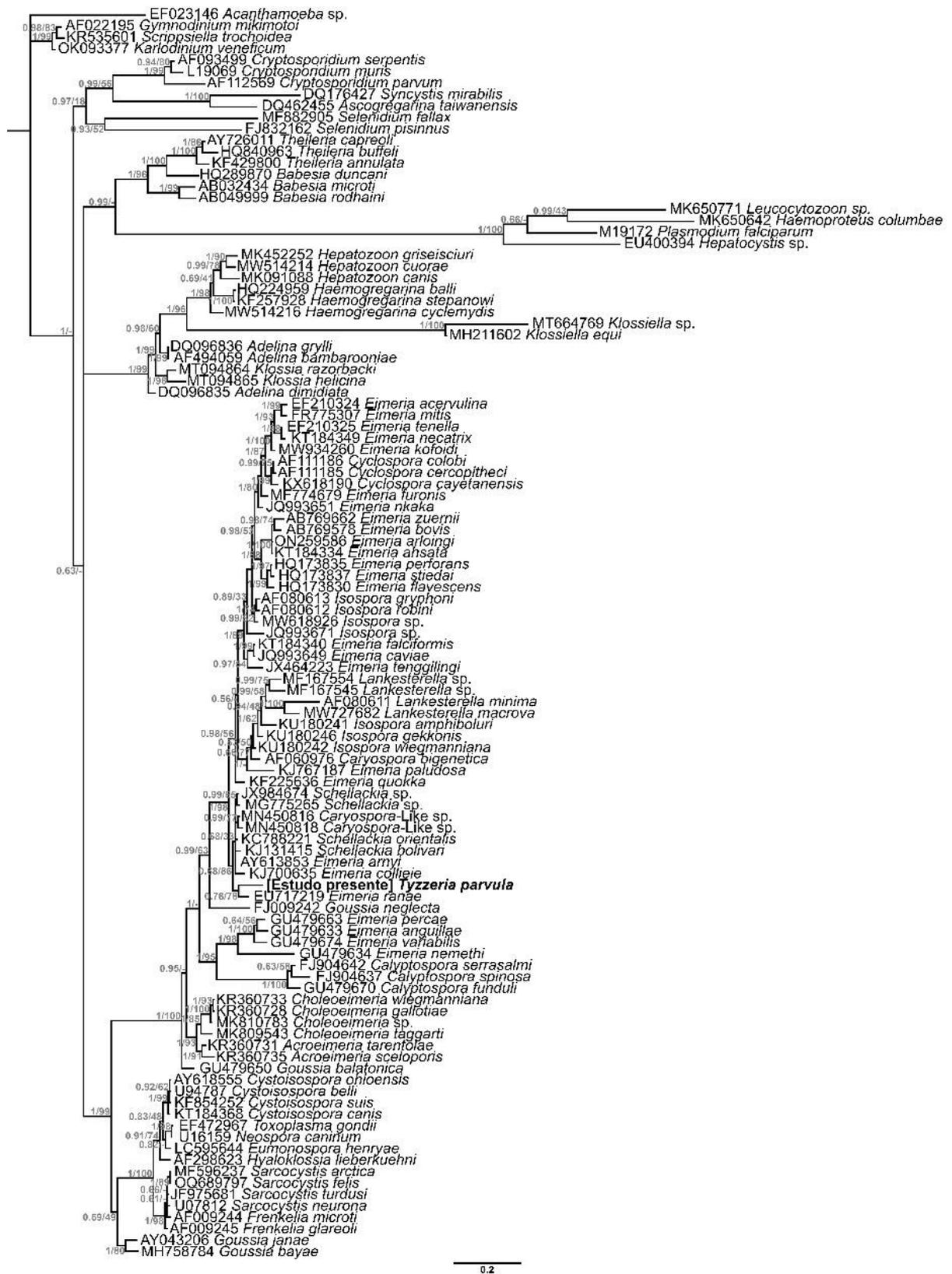


Figura 31 – Análise filogenética de *Tyzzeria parvula* inferida por análise bayesiana para um locus (CRYSSU) do gene da subunidade menor (18S) do RNA ribossomal. Os comprimentos dos ramos correspondem às estimativas posteriores médias de distâncias evolutivas (barra de escala: 0.2). Os

rótulos dos ramos nos nós mostram probabilidades posteriores sob a análise de inferência bayesiana e valores de bootstrap derivados da análise de máxima verossimilhança. Uma ameba do gênero *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931 foi usada como grupo externo.



Figura 32 – Foco do cladograma em maior ampliação demonstrando o posicionamento filogenético de *Tyzzeria parvula* próximo de *Eimeria ranae*, *Eimeria arnyi*, *Schellackia orientalis*, *Caryospora-Like* sp., entre outros.

6 DISCUSSÃO

6.1 Considerações gerais sobre a sistemática dos coccídios e inferências moleculares

A sistemática dos coccídios já passou por muitas mudanças desde que esses microrganismos passaram a ser estudados. As primeiras classificações direcionadas a organização desse grupo eram fundamentadas em características fenotípicas (como a morfologia dos oocistos) e biológicas (como o ciclo de vida) (DUSZYNSKI; WILBER, 1997; TENTER et al., 2002; BERTO et al., 2014; VOTÝPKA et al., 2016). No entanto, com o advento da biologia molecular, inúmeros táxons passaram a ser revistos e alterados nas últimas décadas. Com isso em vista, no início do milênio, Tenter et al. (2002) redigiram um importante artigo de revisão, intitulado “The conceptual basis for a new classification of the coccidia”, para nortear trabalhos futuros envolvendo sistemática e taxonomia de coccídios. Esse trabalho, foi fruto de uma “controversa mesa redonda” conduzida durante a 8ª Conferência Internacional sobre Coccidiose, realizada em conjunto com a Reunião Científica Anual da Sociedade Australiana de Parasitologia, em Queensland, Austrália; e que contou com a participação dos mais renomados pesquisadores no assunto, como J. R. Barta, D. W. Duszynski, H. Mehlhorn, D. A. Morrison e R. C. A. Thompson.

Nesse trabalho, os autores deixam claro que diversos estudos filogenéticos, pautados por dados moleculares, sobre os táxons de coccídios eimerídeos, revelaram que várias das famílias, subfamílias e gêneros que outrora foram erigidos com base em caracteres não moleculares, são na verdade grupos parafiléticos. Já ficou demonstrado que inclusive o próprio gênero *Eimeria*, comporta-se como um grupo parafilético, com suas espécies, descritas nas diferentes classes de vertebrados, alocando-se em clados distintos (HNIDA; DUSZYNSKI, 1999; ZHAO et al., 2001; KVIČEROVÁ; HYPŠA, 2013). Como exemplo dessa complexidade, Zhao et al. (2001) demonstraram que nem as próprias espécies de *Eimeria* de roedores se portam como um grupo monofilético; e KvičEROVÁ e Hypša (2013) também demonstram que o gênero, na sua delimitação atual baseada na morfologia, não é monofilético. Nesse estudo, os autores adicionaram ao GenBank, 71 novas sequências de coccídios que parasitam 16 gêneros de pequenos mamíferos. Ficou nítido que não há monofilia nem para as espécies que parasitam uma mesma classe de vertebrados, dessa forma, eles argumentam que a especificidade de *Eimeria* é causada por processos adaptativos e não cofilogenéticos. Outros trabalhos também já apontaram parafilia para coccídios sarcocistídeos, como nos gêneros *Sarcocystis* e

Hammondia Frenkel, 1974 (ELLIS et al., 1999; JENKINS et al., 1999) Além disso, Paperna (1995) afirma que coccídios de peixes tem uma origem polifilética; e Barta et al. (2012) demonstraram que apesar dos protococcídios Adeleida serem monofiléticos, a família Hepatozoidae, situou-se em parafilia.

Por conta disso, nosso entendimento atual difere das classificações mais antigas. Por exemplo, antigamente, os pesquisadores englobavam dentro da família Eimeriidae, grupos que são filogeneticamente distantes. Wenyon (1926) e Hoare (1933), diante a efervescência da descoberta de novos gêneros e espécies coccidianas, organizaram a sistemática dos coccídios eimerídeos sem, contudo, aplicarem o conhecimento molecular desses grupos, indisponível na época. No trabalho de Hoare (1933) são listadas várias subfamílias dentro de Eimeriidae, separadas de acordo com características morfológicas dos oocistos. São elas: *Cryptosporidiinae* Hoare, 1933 para oocistos sem esporocistos (onde se alocavam os gêneros *Cryptosporidium*, *Pfeifferinella*, *Schellackia* e *Lankesterella*); *Caryosporinae* Wenyon, 1926 para oocistos monoesporocísticos (onde se alocava o gênero *Caryospora*); *Cyclosporinae* Wenyon, 1926 para oocistos diesporocísticos (contendo os gêneros *Cyclospora*, *Isospora* e *Dorisiella*); *Eimeriinae* Wenyon, 1926 para oocistos tetraesporocísticos (com os gêneros *Eimeria*, *Wenyonella* e *Angeiocystis*); *Barroussiinae* (Wenyon, 1926) para oocistos poliesporocísticos monozóicos (com os gêneros *Barroussia* e *Echinospora*) e *Aggregatinae* Hoare, 1933 para oocistos poliesporocísticos não monozóicos (contendo os gêneros *Merocystis*, *Pseudoklossia*, *Aggregata*, *Caryotropha* e *Myriospora*).

Entretanto, Hoare (1933) pondera que já naquela época, a sistemática dos coccídios não possuía um consenso entre os autores, passando por mudanças diante do conhecimento limitado, mas gradualmente crescente desse grupo. Uma escola, representada por Minchin (1912), Reichenow (1921) e Wenyon (1926), seguia Lühe (1906) ao organizar os gêneros em grupos superiores, principalmente, de acordo com o tipo de esquizogonia desempenhada. Outra escola, adotava os caracteres do oocisto esporulado como base para a classificação dos gêneros. Os representantes mais importantes desta última foram Schneider (1881) e Léger (1900, 1911). Estes dois autores, contudo, diferiam na escolha dos caracteres segundo os quais os gêneros deviam ser agrupados. Enquanto Schneider e seus seguidores (BÜTSCHLI, 1882; LABBÉ, 1899; MINCHIN, 1903) os organizaram de acordo com o número de esporocistos dentro do oocisto, Legér e seus adeptos (MESNIL, 1903; POCHE, 1913; DOFLEIN, 1916; PINTO, 1928) os classificaram de acordo com o número total de esporozoítos no oocisto.

Allen (1936) embasada nesse trabalho de Hoare, ao descrever o gênero *Tyzzeria*, inseriu-o dentro da família Eimeriidae, subfamília Cryptosporidiinae. Atualmente essa subfamília está inválida; pois sabemos que Cryptosporidiidae se porta como um clado completamente separado, filogeneticamente muito mais próximo das gregarinas do que dos coccídios (CARRENO et al., 1999; BARTA; THOMPSON, 2006). Com a descrição de *Tyzzeria*, o padrão morfológico de oocistos sem esporocistos e octazóicos (com oito esporozoítos) passou a figurar em três gêneros: *Pfeifferinella*; *Schellackia* e *Tyzzeria*. Para justificar sua descrição, Allen (1936) determinou as diferenciações e chaves para sua identificação. Em *Pfeifferinella*, coccídio que parasita glândulas digestivas de gastrópodes terrestres, seus merozoítos são flagelados e seus oocistos são marcados por uma micrópila convexa em um dos polos como um resquício do tubo vaginal (ou tubo de fertilização) presente em seus macrogametócitos, por onde os microgametas entram. Já *Schellackia*, distingue-se por ser um hemococcídio, infectando células sanguíneas como eritrócitos, leucócitos e macrófagos, mas tendo seu desenvolvimento merogônico e gametogônico no tecido intestinal do hospedeiro. Além disso, parasita anfíbios e répteis, num ciclo heteroxeno que envolve a participação de vetores. Artrópodes como ácaros e mosquitos, durante o repasto sanguíneo, infectam-se com o parasito, que será transmitido a répteis e anfíbios que consomem esses invertebrados. Por sua vez, *Tyzzeria*, possui um ciclo homoxeno, onde tanto seu desenvolvimento merogônico como gametogônico foram descritos ocorrendo estritamente em células da mucosa e submucosa do epitélio intestinal. Além disso, seus macrogametas não apresentam tubo vaginal, seus merozoítos não são flagelados, seu parasitismo ocorre em outro grupo de hospedeiros (aves anátidas) e seus oocistos esporulam fora do hospedeiro (diferentemente de *Schellackia*) (WENYON, 1926; ALLEN, 1936; LEVINE, 1985).

Especialmente em coccídios eimerídeos, a sistemática ainda é muito controversa. Muitas espécies, antes alocadas dentro dessa família, agora são classificadas em novos gêneros, alguns inclusive organizados em outras família, como Sarcocystidae e Calyptosporidae. As evidências que traçaram essa reorganização sistemática, estavam ancoradas firmemente em resultados de filogenia molecular. Por exemplo, as espécies do gênero *Calyptospora*, já foram classificadas como *Eimeria* spp. de peixes, mas depois de uma análise conjunta de diferenças morfológicas, moleculares e biológicas (e.g. ciclo heteroxeno envolvendo crustáceos), não apenas um novo gênero, mas uma nova família foi criada para alocar essas espécies (OVERSTREET et al., 1984). Os gêneros *Acroeimeria* e *Choleoeimeria*, anteriormente

designados como sendo *Eimeria* spp. de répteis, hoje em dia são gêneros separados (PAPERNA; LANDSBERG, 1989; MEGÍA-PALMA et al., 2015).

Outro exemplo, gira em torno de *Caryospora*, um gênero tradicionalmente observado em serpentes e rapinantes, que sempre despertou curiosidade pela natureza heteroxênica facultativa de seu ciclo, em desalinho com a maioria dos eimerídeos. Recentemente, *Caryospora* spp. de aves e répteis foram separadas, havendo a ressurreição do gênero *Eumonospora*. Dados de biologia molecular, morfologia e ecologia de ciclo embasaram essa reorganização. As antigas *Caryospora* spp. de rapinantes foram alocadas não apenas num gênero diferente, mas na família Sarcocystidae. Essas espécies (agora *Eumonospora* spp.) possuem oocistos monoesporocísticos octazóicos sem corpo de Stieda, e se assentaram dentro do clado dos sarcocistídeos. Em contrapartida, *Caryospora* spp. de serpentes, permaneceram neste mesmo gênero pois se inseriam junto dos eimerídeos; e seus oocistos, apesar de também serem monoesporocísticos octazóicos, dispõem de corpo de Stieda (CHOU et al., 2020). Além dessas diferenças, não podemos deixar de mencionar uma distinção extraordinária de natureza biológica. No caso de *Caryospora* spp. a formação de cistos ocorre principalmente na musculatura da boca e língua de roedores, isso compromete a dieta do animal (consequentemente seu ganho energético), deixando-o menos ágil, facilitando assim sua predação pela serpente. Já para *Eumonospora* spp. a formação de cistos ocorre principalmente no tecido conjuntivo da derme, ao longo do corpo (sem comprometer o ganho energético da presa) mantendo sua agilidade, o que é essencial para fornecer um estímulo visual para a ave de rapina no momento da predação (KHEYSIN, 1972; UPTON et al., 1986.; UPTON; SUNDERMANN, 1990). Assim como este último, também houve a ressurreição do gênero *Cystoisospora* para alocar as antigas *Isospora* spp. de mamíferos. *Cystoisospora*, além de possuir diferenças biológicas (e.g. ciclo heteroxeno com formação de cistos no hospedeiro intermediário) e morfológicas (e.g. esporocistos sem corpo de Stieda) com *Isospora*, geneticamente agrupou-se nos sarcocistídeos (BARTA et al., 2005; BERTO et al., 2014).

Levine (1982b) tinha considerado a família Pfeifferinellidae Grassé, 1953 para acomodar *Pfeifferinella* e *Tyzzeria*; coccídios de oocistos aesporeocísticos octazóicos, com ciclos homoxenos e esporogonia exógena. Entretanto, Wacha (1980) tinha demonstrado a existência de diferenças nos macrogametas de *Pfeifferinella*, que continham de 1 a 5 nucléolos localizados periféricamente, enquanto em *Tyzzeria* eles mostraram um único nucléolo relativamente grande e de localização central, típico dos macrogametas de Eimeriidae. Estas observações foram inconclusivas para elucidar a posição taxonômica desses gêneros (BERTO

et al. 2014). Os outros gêneros eimerídeos aesporecísticos, *Lankesterella* Labbé, 1899 e *Schellackia* Reichenow, 1919, cujos ciclos são heteroxenos, mediados por vetores e os oocistos não vão ao ambiente, tinham sido alocados na família Lankesterellidae Nöller, 1920. Porém, Barta et al. (2001) mostraram que *Caryospora* e *Lankesterella* estão intimamente relacionados com base na filogenia molecular do gene 18S; e além disso, compartilham alguns aspectos comuns em seus ciclos biológicos. *Caryospora* também pode perfazer um ciclo heteroxeno. Em roedores (hospedeiros intermediários), *Caryospora* forma oocistos de paredes finas na derme facial, que se rompem liberando esporozoítos que formam cariocistos. Em *Lankesterella*, os esporozoítos também são liberados de oocistos de paredes finas; mas invadem células sanguíneas que podem posteriormente ser transportadas para outros hospedeiros suscetíveis através de invertebrados hematófagos. Megía-Palma et al. (2013), através de análises filogenéticas com sequências do 18S, também demonstraram que *Lankesterella* spp. e *Schellackia* spp., posicionaram-se em clados diferentes; com esta última, apresentando íntima relação com *Eimeria* spp. de anfíbios (*Eimeria ranae* Dobell, 1909) e serpentes (*Eimeria arnyi* Upton & Oppert, 1991). E em trabalho recente, novamente apoiado em biologia molecular, Chagas et al. (2021), revelaram que *Lankesterella* spp. estavam mais próximas de *Isospora* spp. e *Eimeria* spp., do que de *Schellackia* spp. Esses trabalhos acabaram por lançar dúvidas sobre a validade da família Lankesterellidae.

Com isso, Megía-Palma et al. (2014) em conformidade com seus trabalhos filogenéticos anteriores, endossaram a percepção de que a então família Lankesterellidae, como concebida originalmente (com *Lankesterella* e *Schellackia*) teria uma origem polifilética; e ainda que a origem monofilética do gênero *Schellackia* também não é suportada devido à ocorrência de *E. arnyi* e *E. ranae* no mesmo clado. Contudo, os autores lançam dúvidas sobre a identificação dessas espécies:

A presença dessas duas espécies de *Eimeria* neste clado, agrupadas junto com várias sequências de genes de *Schellackia*, sugere a identificação errônea de *E. ranae* e *E. arnyi*. Essa possibilidade pode ser devido à contaminação das amostras com parasitos hemococcidianos, que realizam ciclo de vida nos tecidos intestinais (UPTON, 2000). Esse pode ser o caso de *E. ranae*, que foi obtido do "intestino amassado de um girino" (JIRKŮ et al., 2009) e seu sDNA SSU foi amplificado usando primers eucarióticos universais (MEDLIN et al. 1988). Além disso, *Schellackia* já foi descrita parasitando sapos (PAPERNA; LAINSON, 1995). O caso de *E. arnyi* é surpreendente, pois seu hospedeiro é a cobra-de-colar-das-pradarias (UPTON; OPPERT, 1991), e nenhuma espécie de *Schellackia* é conhecida por infectar ofídios. No entanto, alguns hemococcídios são capazes de infectar tecidos de predadores após a ingestão de presas (TOMÉ et al., 2013), e esta é uma característica presente nos ciclos de vida de lankesterelídeos (KLEIN et al. 1988; BRISTOVETZKY; PAPERNA, 1990). Assim,

existe a possibilidade de cobras serem infectadas por lankesterelídeos após o consumo de uma presa infectada. Sendo isso verdade, a presença de pequenas quantidades de células sanguíneas em amostras fecais pode levar à identificação molecular errônea de parasitos intestinais. (MEGÍA-PALMA et al., 2014, p. 311).

Esses autores concluem que, caso essa hipótese seja confirmada, justificar-se-ia a ressurreição da família Schellackiidae Grassé, 1953 para acomodar separadamente as espécies de *Schellackia*, como um grupo monofilético e com origem independente de outros lankesterelídeos. Eles apontaram ainda que, em 1926, Wenyon tinha proposto a criação das subfamílias Schellackinae e Lankesterellinae dentro de Lankesterellidae; mas que anos depois, Grassé (1953b) reclassificou-as como duas famílias independentes (Schellackiidae e Lankesterellidae). No entanto, Manwell (1977) discutiu novamente o nível sistemático desses táxons recuperando a organização de Wenyon (1926). Em outro trabalho, mais recente, Megía-Palma et al. (2017) atestaram maior proximidade de *Schellackia* spp. detectadas em lagartos americanos com gênero *Lankesterella*, do que com outras *Schellackia* spp. de lagartos europeus e asiáticos. Eles argumentam, contudo, que como características morfológicas (e.g. número de corpos refráteis nos esporozoítos) e biológicas (e.g. espécies hospedeiras e células sanguíneas parasitadas) não servem como diagnoses válidas para distinguir *Lankesterella* de *Schellackia*; diante dos resultados moleculares, essas espécies seriam na verdade *Lankesterella* spp. Diante dessas discrepâncias e incertezas, não há um consenso pleno entre os especialistas, e é possível notar que publicações recentes tratam o gênero *Lankesterella* como Eimeriidae (KECKEISEN et al., 2024).

Jirků et al. (2002) tinha proposto agrupar dentro de Eimeriidae, apenas coccídios cujos oocistos apresentam esporocistos contendo corpo de Stieda como estrutura de excistamento. Nesse raciocínio, tal estrutura seria uma autapomorfia de Eimeriidae, que englobaria apenas os gêneros *Eimeria*, *Isospora*, *Caryospora* e *Cyclospora* Schneider, 1881 (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014). Apesar dessa proposição, como já informado, algumas *Eimeria* spp. se mostram parafiléticas, tendo maior afinidade com *Lankesterella* e *Schellackia*; assim a polifilia de *Eimeria*, seria o principal empecilho para a adoção dessa classificação. Além disso, outros gêneros que carecem de corpo de Stieda, ainda permanecem alocados em Eimeriidae. Por exemplo, *Choleoeimeria* e *Acroeimeria* que são parasitos de répteis, com oocistos tetraesporocísticos dizóicos; e *Goussia* que parasita peixes e anfíbios, cujos oocistos têm números variáveis de esporocistos dizóicos (PAPERNA; LAINSON, 1999; BERTO et al., 2014). Dados morfológicos em combinação com a filogenia molecular destacaram a

semelhança desses gêneros com *Barroussia*, que parasita invertebrados. Ambos os quatro gêneros possuem uma parede esporocística composta por duas placas, unidas por uma sutura longitudinal (ver tópico 3.1.6). A posse desta característica altamente distintiva, em detrimento do corpo de Stieda, forneceria a base para a ressurreição de Barroussidae Léger, 1911 conforme proposto por Levine (1983), combinando os quatro gêneros em uma única família (JIRKŮ et al., 2002; BERTO et al., 2014). Entretanto, outros resultados de filogenia molecular contrariam essa percepção, ao passo que *Choleoeimeria* spp. e *Acroeimeria* spp., apesar de se situarem em clados independentes da maioria dos eimerídeos, ainda se agrupam com algumas *Eimeria* spp. de répteis; e *Goussia* spp. se assentam em vários clados separados. Porém, alguns autores sugeriram a designação “*Eimeria incertae sedis*” para essas *Eimeria* spp. conflitantes, até que mais informações se tornem disponíveis (MEGÍIA-PALMA et al., 2015). Dessa forma, há um debate em aberto sobre a sistemática desses gêneros, onde alguns autores argumentam que a presença da sutura típica nos esporocistos de *Goussia*, *Choleoeimeria* e *Acroeimeria* pode representar uma homoplasia ao invés de uma sinapomorfia (JIRKŮ et al., 2002; MEGÍIA-PALMA et al., 2015).

Em face da natureza polifilética de *Eimeria*, uma dúvida surge: seria então o corpo de Stieda uma homoplasia? É difícil imaginar que uma característica tão complexa e altamente bem sucedida evolutivamente teria surgido simultaneamente em grupos distintos e separados (parafiléticos). Outra hipótese seria a existência de um ancestral comum que já apresentava tal estrutura; e que algumas de suas linhagens acabaram perdendo-a, enquanto em outros tal característica permaneceu e se aprimorou. De acordo com Amorim (2002), a homoplasia pode se originar de três maneiras: (1) paralelismo, quando uma mesma plesiomorfia é alterada de modo idêntico, produzindo uma condição apomórfica semelhante em grupos independentes (comum em grupos próximos); (2) convergência, quando caracteres plesiofórmicos diferentes são alteradas, mas resultam em apomorfias semelhantes entre grupos independentes (raramente são de fato idênticas); e (3) reversão, quando em determinados grupos, uma característica arqueomórfica sofre modificações que geram condições apomórficas semelhantes à condição plesiomórfica original (também chamado de pseudo-simplesiomorfia). Seria então o corpo de Stieda, observado em grupo parafiléticos, fruto de reversão ou algum outro fenômeno? Numa analogia mais palpável, cito aqui casos notáveis reversão em insetos: como o retorno da condição “áptera” em muitos grupos da subclasse Pterygota Lang, 1888, pois os ancestrais desse grupo desenvolveram dois pares de asas, sendo que algumas ordens (e.g. Phthiraptera Haeckel, 1896 e Siphonaptera Latreille, 1825) perderam as asas no processo evolutivo,

enquanto outras (e.g. Coleoptera Linnaeus, 1758, Diptera Linnaeus, 1758, Hemiptera Linnaeus, 1758 e Lepidoptera Linnaeus, 1758) as mantiveram. A aquisição de asas pelo ancestral desses animais, em tese, configuraria-se como uma vantagem evolutiva, dada sua complexidade e ganho da capacidade de voar; mas nem por isso todas suas linhagens a mantiveram.

Poderíamos extrapolar esse entendimento para o corpo de Stieda dos coccídios? Se olharmos para história evolutiva dos apicomplexas, há alguns precedentes nesse sentido, como o fato da reprodução assexuada ter se desenvolvido em Arquigregarinas, mas ter desaparecido nas suas linhagens descendentes, as Eugregarinas; e posteriormente ter reaparecido nas Neogregarinas (COX, 1994). Se pensarmos que a reprodução assexuada representa vantagens, como o rápido aumento populacional para colonização de novos ambientes ou mesmo a redução do gasto energético para a produção de gametas; por que ela teria desaparecido justamente no grupo de gregarinas mais biodiverso? Nesse contexto, Barta (1989) realizou uma ampla análise filogenética tradicional dos apicomplexas, considerando características biológicas e morfológicas para inferir relações evolutivas entre seus principais grupos (adeleidas, eimeridas, hemosporídios e piroplasmas). Nesse estudo, perfilando as gregarinas como grupo externo funcional, ele demonstrou que piroplasmas eram intimamente relacionados aos adeleidas; gêneros como *Babesia* Starcovici, 1893 e *Theileria* Bettencourt, Franca & Borges, 1907 não formavam um grupo irmão com hemosporídios (como se supunha); e os dados indicaram que a então família Haemogregarinidae deveria ser fragmentada em três (Haemogregarinidae; Hepatozoidae e Karyolysidae Wenyon, 1926) pois seus gêneros, biologicamente diversos, não suportavam um grupo monofilético. Para ele, a correlação entre a filogenia do parasito e as afinidades taxonômicas de seus hospedeiros definitivos, sugerem que os ciclos de vida dos apicomplexas heteroxenos, aparentemente evoluíram independentemente para se adaptarem às mudanças nos comportamentos alimentares de seus hospedeiros. Exemplificando esse raciocínio com linhagens coccidianas, entre protococcídios e coccídios, Barta (1989) afirma que as análises filogenéticas evidenciam para uma evolução independente dos ciclos entre esses dois grupos. Isso porque, tanto coccídios Adeleida como coccídios Eimeriida, exibem complexos ciclos biológicos homoxenos e heteroxenos, com alternância de reproduções assexuada e sexuada, envolvendo inclusive a participação de vetores.

Outro ponto bastante aludido nesse artigo, refere-se às homoplasias observadas entre os diferentes grupos. Para isso, ele listou 26 caracteres de apicomplexas, reconhecendo transformações hipotéticas do estado de cada caractere, observadas entre os diferentes grupos. Respectivamente, os caracteres (e suas transformações) foram: (1) presença de conoide (em

todos estágios não gaméticos / em alguns estágios não gaméticos / em nenhum estágio); (2) corpos cristalóides (presente / ausente); (3) endodiogenia (presente / ausente); (4) merogonia (intracelular / extracelular); (5) microporos (presente / ausente); (6) mitocôndria (cristada / acristada); (7) mitose (centriolar / acentriolar); (8) corpos paranucleares (presente / ausente); (9) grânulos de amilopectina (com / sem); (10) complexo de anel polar (presente / ausente); (11) trofozoítos modificados em 2 regiões corporais (deutomerito e protomerito) (sim / não); (12) merogonia (presente / ausente); (13) gametogênese (extracelular / intracelular); (14) número de microgametas formados a partir microgametócito (>8 / 8 / 4 / 2 / 1); (15) gametócitos (isogâmico / anisogâmico); (16) perforatório (presente / ausente); (17) corpos formadores de parede (presente / ausente); (18) formação de gametocisto (sim / não); (19) sizígia (presente / ausente); (20) zigoto (imóvel / móvel); (21) esporogonia (intracelular / extracelular); (22) cistos persistentes (sim / não); (23) corpo de Stieda (presente / ausente); (24) número de flagelos nos microgametas (aflagelado / um apenas / dois ou mais); (25) arranjo dos flagelos nos microgametas (terminal / anterior / interno) e (26) corpos radiantes (presente / ausente). Segundo apontado por Barta (1989), os caracteres (2), (9), (12), (15), (17), (20) e (22) exibiram homoplasia; e o caractere (24) teve uma reversão autapomórfica hipotética em *Cryptosporidium*.

Uma tendência interessante foi notada em alguns caracteres homoplásicos. A homoplasia dos caracteres (17), (20) e (22) pode refletir a evolução independente de ciclos de vida heteroxenos por coccídios. Por exemplo, *Lankesterella* e *Schellackia* não requerem mais corpos formadores de parede (caractere 17) que são sinapomórficos para Eimeriida superiores, porque seus oocistos não formam uma parede resistente e, em vez disso, liberam seus esporozoítos. Cistos persistentes (caractere 22) não são "necessários" para parasitos heteroxenos onde os esporozoítos se movem para os tecidos do hospedeiro definitivo (e.g. hemosporídios, piroplasmas, alguns adeleidas, *Lankesterella* e *Schellackia*). Zigotos móveis (caractere 20) podem ser um meio pelo qual parasitos heteroxenos escapam do trato alimentar de hospedeiros definitivos hematófagos antes de serem transmitidos. As histórias evolutivas de coccídios heteroxenos, aparentemente, evoluíram independentemente várias vezes. No caso de *Cryptosporidium*, as evidências o apoiam como um grupo independente. A perda de flagelos pelos microgametas nesse grupo pode ser considerada uma simplificação autapomórfica. A localização altamente exposta de seus macrogametas em desenvolvimento, logo abaixo da membrana plasmática de células epiteliais infectadas, pode não exigir um microgameta altamente móvel para facilitar a fertilização (BARTA, 1989). Em outro artigo, Barta (2012)

reitera que a classificação baseada na biologia e morfologia de coccídios Adeleida é repleta de homoplasias, com diferentes opiniões em relação ao peso a ser dado a caracteres individuais. Características morfológicas, alterações citopatológicas em células infectadas e associações com hospedeiros têm sido o esteio de sua classificação desse grupo. Embora, limitadas análises filogenéticas moleculares tenham sido testadas até o momento para esses parasitos, elas tentem a corroborar essa compreensão das homoplasias. Isso levou a revisões de vários táxons.

Ou seja, os coccídios parecem ter tido uma extensa história de coespeciação com seus hospedeiros, conforme definido por Mitter e Brooks (1983). Ainda enfocando Barta (1989), o autor explica que grupos de táxons terminais intimamente relacionados, geralmente têm grupos de hospedeiros definitivos também intimamente relacionados. Em contraste, os hospedeiros intermediários, adquiridos ao longo da evolução por apicomplexas de natureza heteroxênica, não mostram evidências de descendência mútua (coespeciação), mas sim ampla coacomodação não específica (BROOKS, 1979). Essa ampla coacomodação de hospedeiros intermediários, explica a incapacidade de correlacioná-los à filogenia dos seus parasitos. Os hospedeiros definitivos são, portanto, filogeneticamente informativos por causa da aparente descendência mútua hospedeiro-parasito, enquanto os hospedeiros intermediários são apenas de significância ecológica. Por exemplo, Barta (1989) cita que foram notadas semelhanças marcantes na estrutura da parede do cisto e no tamanho do cistozoíto em espécies de *Sarcocystis* que completam seu desenvolvimento gametogônico e esporogônico em hospedeiros que são intimamente relacionados filogeneticamente. Em contapartida, analisando esses detalhes para os grupos específicos de hospedeiros intermediários (independentemente de qual hospedeiro o desenvolvimento sexual ocorre), isso não foi evidenciado.

Além disso, a dependência ancestral da transmissão feco-oral foi empregada com sucesso pelos parasitos à medida que evoluíram com seus hospedeiros. O início de ciclos de vida heteroxenos por coccídios, envolveu o abandono da rota de transmissão feco-oral e a aquisição de um hospedeiro intermediário ecologicamente adequado. Curiosamente, no trabalho de Barta (1989), o caráter (22) (a formação de cistos persistentes) que indica com precisão a presença de transmissão feco-oral, também foi o caráter que exibiu a maior homoplasia no seu estudo. Isso dá um forte suporte para a origem independente de ciclos de vida heteroxenos nos táxons de coccídios superiores. Os dados indicam que a maioria dos grupos de coccídios heteroxenos que infectam vertebrados eram, inicialmente parasitos homoxenos de hospedeiros definitivos invertebrados. Os coccídios Eimeriida são os únicos parasitos de Apicomplexa que utilizaram extensivamente o trato alimentar de vertebrados para

a gametogonia, singamia e esporogonia. Nessa linha, para *Lankesterella* e *Schellackia*, coccídios Eimeriida heterexenos, com ciclos envolvendo um vertebrado ectotérmico (como hospedeiro definitivo) e um invertebrado hematófago (como intermediário); há a hipótese de que esses gêneros surgiram de parasitos intestinais homoxenos ancestrais de vertebrados. Barta (1989) afirma que eles podem representar os únicos parasitos sanguíneos transmitidos por invertebrados que realmente evoluíram de um parasito intestinal ancestral de vertebrados, pois a visão de que Haemosporida Danilewsky, 1885 evoluiu de tal ancestral não é apoiada pelos seus ancestrais (que evoluíram antes do aparecimento de Eimeriida). Além disso, Haemosporida (e.g. *Plasmodium*), apesar de perfazer um ciclo entre invertebrados e vertebrados, tem como hospedeiro definitivo mosquitos; com isso, acredita-se que os hemosporídios eram originalmente parasitos homoxenos de dípteros.

Landau (1974) sugeriu que os apicomplexas de vertebrados, infectando tanto locais intestinais quanto extraintestinais, surgiram de ancestrais que infectavam a cavidade celômica e outros tecidos de origem mesoblástica de invertebrados. Segundo Barta (1989), embora poucos tivessem contestado isso, a associação com o trato alimentar de metazoários parece ser um caráter plesiomórfico para apicomplexas. Portanto, a invasão de tecidos de origem mesoblástica seria um caráter derivado, não ancestral, de Eimeriida de vertebrados (BAKER, 1965; TADROS; LAARMAN, 1982; LEVINE, 1985b). Se os hospedeiros definitivos dos coccídios são de fato seus hospedeiros ancestrais, o parasitismo sanguíneo em Apicomplexa pode ter evoluído independentemente várias vezes. Segundo Levine (1985b), é amplamente aceito que apicomplexas provavelmente se originaram como parasitos intestinais de vários invertebrados de vida livre. Eles teriam sobrevivido usufruindo da transmissão feco-oral, desde que esses hospedeiros invertebrados continuassem a se alimentar de substratos contaminados fecalmente com oocistos infecciosos. No entanto, se seus hospedeiros invertebrados de vida livre comesçassem a usar sangue como alimento, a rota feco-oral se tornaria insustentável. Neste caso, a única maneira de se assegurar a transmissão entre hospedeiros seria coevoluir para infectar a nova fonte de alimento de seu hospedeiro, o sangue. Praticamente todos os tipos de invertebrados são parasitados por apicomplexas intestinais (LEVINE, 1985b). À medida que diferentes invertebrados começaram a se especializar numa dieta estritamente hematófaga, seus parasitos seriam selecionados, independentemente, para se adaptar ao parasitismo sanguíneo. Isso explicaria porquê, embora o parasitismo sanguíneo de vertebrados por coccídios seja algo comum a muitos clados de parasitos (e.g. Haemosporida e Piroplasmida Wenyon, 1926), o

hospedeiro definitivo desses parasitos, é geralmente o vetor, independentemente da gama de hospedeiros vertebrados utilizados para replicação merogônica (BARTA, 1989).

Durante a evolução de vertebrados estritamente carnívoros, a rota de transmissão fecal-oral também teria se tornado insustentável para os coccídios que infectavam o trato alimentar do predador. Uma outra solução evolutiva bem-sucedida, foi então infectar a nova fonte de alimento de seus hospedeiros, suas presas. Dentro dos carnívoros mamíferos, espécies dos gêneros *Sarcocystis* e *Toxoplasma* Nicolle & Manceaux, 1909, entre outros, lidaram bem com essa pressão de seleção (FRENKEL, 1973; TADROS; LAARMAN, 1982; MATUSCHKA; BANNERRT, 1987). Da mesma forma, coccídios de peixes predadores, como *Calyptospora*, desenvolveram mecanismos pelos quais suas presas são infectadas (FOURNIE; OVERSTREET, 1983). Em suma, a origem de todos os ciclos heteroxenos em Apicomplexa pode ter ocorrido como uma resposta à pressão seletiva do hospedeiro definitivo para a rota de transmissão feco-oral ancestral, uma hipótese de descendência mútua dos coccídios com seus hospedeiros definitivos. Isso implica que essas relações são úteis e, em alguns casos, são critérios necessários para separar táxons terminais intimamente relacionados.

Se nos atentarmos a outros exemplos, mas agora de cunho morfológico, Paperna (1995) afirma que em contraste com a conformidade estrutural e de desenvolvimento observada nos coccídios eimerídeos homoxenos, altamente evoluídos e especializados em aves e mamíferos, os coccídios de peixes demonstram extrema diversidade em locais de desenvolvimento, morfologia de esporocistos, organização de macrogametócitos e formação de parede dos oocistos. Os esporozoítos e alguns merozoítos de vários coccídios de peixes contêm corpos refráteis, enquanto os de outros contêm corpos cristalinos. Alguns são obrigatoriamente heteroxenos, enquanto em outros a transmissão é mediada por hospedeiros paratênicos. A variabilidade estrutural e de desenvolvimento entre os coccídios piscinos pode implicar numa origem polifilética, mas também pode ser uma evidência de um menor grau de especialização evolutiva. Muitas das características estruturais e de desenvolvimento encontradas nos coccídios piscinos ocorrem em coccídios de hospedeiros invertebrados ou de vertebrados inferiores, bem como nos coccídios heteroxenos formadores de cistos de vertebrados superiores (coccídios sarcocistídeos), como foi mencionado no tópico 3.1.6: oocisto frágil; esporocistos valvulados que se rompem ao longo das linhas suturais; corpos cristalinos em esporozoítos e merozoítos ao invés de corpos refráteis; uma parede fotovoltáica que seja multicamada ou tenha funis ou invaginações; endodiogenia como um estágio no desenvolvimento merogônico e endopoligenia como a principal forma de merogonia.

Nesse trabalho, o autor também traz algumas semelhanças entre *Eimeria* spp. de peixes com grupos de coccídios inferiores. Por exemplo, ele cita que a ocorrência de merozoítos dividindo-se por endodiogenia, dentro de macrófagos migratórios em locais extraepiteliais durante o estágio crônico da infecção por *Eimeria vanasi* Landsberg & Paperna, 1987; lembra uma forma crônica de infecção por *Toxoplasma* (DUBEY, 1977) e “cistozoítos” de hemogregarinas (KIRMSE, 1979). A endodiogenia só raramente foi observada entre coccídios eimerídeos homoxenos de vertebrados superiores (DANFORTH; HAMMOND, 1972). Além de terem corpos cristalinos ao invés de corpos refráteis, outras características compartilhadas entre coccídios piscinos e sarcocistídeos com as hemogregarinas, são as projeções peliculares encontradas também nos estágios intraeritrocíticos (DESSER; WELLER, 1973), e a posição epicitoplasmática que também caracteriza a associação entre gametócitos e as células intestinais de sanguessugas (SIDALL; DESSER, 1990). Ele pondera, no entanto, que a existência de características similares não necessariamente implica numa relação filogenética direta entre sarcocistídeos e coccídios piscinos. Uma possibilidade alternativa poderia ser considerar todas as características listadas acima como características ancestrais de coccídios primitivos que, de acordo com Landau (1982), foram perdidas ou substituídas por novos dispositivos (como a parede dura do oocisto bicamada ou os corpos de Stieda e sub-Stieda no esporocisto) no processo de especialização evolutiva. A forma epicitoplasmática de infecção também pode ser considerada como uma das características biológicas eliminadas durante a evolução dos coccídios eimerídeos de mamíferos e aves. O corpo cristalino que ocorre nos coccídios invertebrados, bem como nos hemosporídios, parece ser mais antigo do que o corpo refrátil característico dos coccídios eimerídeos. Outras organelas aparentemente antigas são as projeções peliculares encontradas em alguns merozoítos, e de outra forma encontradas apenas em hemogregarinas e na invaginação do vacúolo parasitóforo, que além de *Cystoisospora* spp. foram relatados em estágios exoeritrocíticos de *Haemoproteus metchnikovi* (Simond, 1901) (STERLING; DE GIUSTI, 1972). A ausência de verdadeiros “corpos formadores de parede” no desenvolvimento zigótico (ver tópico 3.1.6), diferencia todos os coccídios piscinos daqueles de hospedeiros reptilianos, aviários e mamíferos, incluindo sarcocistídeos (DUBEY, 1977; DUBEY et al., 1989). Um outro estudo, com coccídios de rãs (PAPERNA; LAINSON, 1995) demonstra suas semelhanças com coccídios piscinos, como a ocorrência de densas organelas em vez de corpos formadores de parede, e oocistos com paredes macias e desagregadas que completam a esporulação no tecido hospedeiro antes da evacuação (PAPERNA, 1995).

Recapitulando o trabalho de Megía-Palma et al. (2015), os autores pontuam que *Acroeimeria* spp. e *Choleoeimeria* spp. formariam dois grupos monofiléticos, se não fosse o compartilhamento de seus clados com *Eimeria eutropidis* Megía-Palma, Martínez, Acevedo, Martín, García-Roa, Ortega, Peso-Fernández, Albaladejo, Cooper, Paranjpe, Sinervo & Merino, 2015 e *Eimeria tokayae* Ball & Daszak, 1995. Em nível mais basal, aparece um clado monofilético com *Goussia* spp., mas que por sua vez, é antecedido por um ramo mais basal com *Eimeria steinhausi* Megía-Palma, Martínez, Acevedo, Martín, García-Roa, Ortega, Peso-Fernández, Albaladejo, Cooper, Paranjpe, Sinervo & Merino, 2015. De qualquer forma, é nítido que esses gêneros tiveram uma origem evolutiva independente das outras *Eimeria* spp. de aves e mamíferos. Eles afirmam que, de fato, gêneros como *Cyclospora*, *Caryospora*, *Isospora*, *Lankesterella* e *Schellackia* compartilharam ancestralidade com *Eimeria*; mas que as árvores filogenéticas mostram uma alta especificidade desses parasitos com seus grupos de hospedeiros. Eles apontam ainda, para a diferença biológica dos gêneros analisados: coccídios com desenvolvimento endógeno ocorrendo na vesícula biliar e na superfície do epitélio biliar, correspondem ao gênero *Choleoeimeria*; ao passo que, espécies desenvolvidas nas microvilosidades do intestino podem ser classificadas no gênero *Acroeimeria*, quando o desenvolvimento endógeno é epicitoplasmático, ou no gênero *Eimeria*, quando o desenvolvimento é intracitoplasmático. Segundo eles, *Choleoeimeria* spp. possuem oocistos de formato elipsoidais bem característicos, marcados por uma consistência morfométrica (índice morfométrico > 1,4). Tal característica pode corresponder a uma adaptação dos ancestrais eimerídeos (que possuíam oocistos mais esféricos), à fisionomia da vesícula biliar. No entanto, alternativamente, os oocistos esféricos de *E. eutropidis* podem se desenvolver na vesícula biliar, indicando que essa característica não seria sinapomórfica para *Choleoeimeria*. Assim, é necessário investigar o desenvolvimento endógeno das espécies com posições filogenéticas conflitantes para confirmar se a morfologia do oocisto está relacionada com a localização do desenvolvimento endógeno no hospedeiro (PAPERNA; LANDSBERG, 1989; MEGÍA-PALMA et al., 2015). Nesse sentido, *E. tokayae* juntamente com *E. eutropidis*, pelas posições filogenéticas e morfologia/morfometria dos oocistos (índice morfométrico~1,0) foram categorizadas como *Eimeria incertae sedis* (MEGÍA-PALMA et al., 2015).

Conforme afirma Megía-Palma et al. (2015), a ocorrência de esporocistos marcados por uma única sutura longitudinal (abertura tipo bivalve) entre os gêneros *Choleoeimeria*, *Acroeimeria*, *Goussia* e *Barroussia*; pode ser uma simplesiomorfia entre esses coccídios de hospedeiros ectotérmicos (anfíbios, répteis, peixes e hospedeiros invertebrados). Essa

característica também sugere uma evolução precoce das relações parasitárias entre esses coccídios eimerídeos e hospedeiros ectotérmicos. No entanto, *E. arnyi* e *E. ranae* são exceções à regra (intimamente relacionadas com *Schellackia* spp.); assim como, *E. tokayae* e *E. eutropidis* (intimamente relacionadas com *Choleoeimeria* spp.). Diante disso, para esses autores, é necessário reamostrar dados desses parasitos para descartar uma hipotética identificação errônea. Ainda segundo eles, a irradiação adaptativa da família Eimeriidae pôde ocorrer devido ao surgimento do corpo de Stieda, um caractere apomórfico de *Eimeria sensu lato*, conferindo uma pré-adaptação para parasitar outros grupos de vertebrados (JIRKŮ et al., 2009; MEGÍA-PALMA et al., 2015).

Ao analisar, rigorosamente, todas as descrições originais de *Eimeria* spp. filogeneticamente conflitantes com *Eimeria sensu lato*, é possível fazer algumas suposições. No caso de *E. eutropidis* e *Eimeria steinhausi*, nota-se que Megía-Palma et al. (2015) conduziram uma descrição duvidosa de ambas as espécies. No artigo, os autores não forneceram desenhos de linha das novas espécies, tampouco fotomicrografias bem representativas. As fotomicrografias fornecidas no trabalho são, surpreendentemente, apenas duas (uma para cada espécie). Além disso, as fotomicrografias foram retiradas em posições inadequadas, com os esporocistos em posições transversais, não sendo possível assim, evidenciar possíveis corpos de Stieda. Para identificá-las, os autores fizeram uso de uma correlação morfométrica sugerida por Paperna e Landsberg (1989) para diferenciar as espécies de eimerídeos reptilianos entre os gêneros *Acroeimeria* e *Choleoeimeria*. Nessa correlação, *Choleoeimeria* spp. apresentam um índice morfométrico dos oocistos com um limiar $> 1,4$; e *Acroeimeria* spp. com um limiar $< 1,25$. Com isso, os morfotipos encontrados por eles que não se enquadraram nesses parâmetros, foram identificados como *Eimeria* spp. (e descritos como novas espécies) sob a alcunha de *incertae sedis*. Além disso, os autores não evidenciaram os estágios de desenvolvimento endógenos que discriminariam os gêneros. Portanto, essas espécies reconhecidas como *Eimeria* (mesmo que *incertae sedis*) podem ser consideradas inválidas; prova do quão problemático são os trabalhos conduzidos somente com identificação molecular, atrapalhando a compreensão da sistemática dos eimerídeos. *Eimeria tokayae*, também se enquadra na mesma situação. Ela foi descrita no artigo de Ball e Daszak (1995), baseada exclusivamente na morfologia/morfometria dos oocistos. Nas fotomicrografias e desenhos de linha apresentados no artigo, é nítido que se trata de uma espécie de *Acroeimeria*. Portanto, considerando esses equívocos e reavaliando a filogenia desses grupos, *Acroeimeria* e *Choleoeimeria* se comportam como grupos monofiléticos dentro de Eimeriidae, sendo inclusive essa classificação atual, a nível de família,

questionável. Entretanto, este contexto é diferente para *E. arnyi* e *E. ranae*. Ambas espécies possuem corpo de Stieda, e em *E. arnyi* é observado adicionalmente um corpo de sub-Stieda (UPTON; OPPERT, 1991; JIRKŮ et al., 2009). Com isso, a sistemática dos eimerídeos ainda permanece conturbada e inconclusiva, principalmente para o gênero *Schellackia*. Existe a possibilidade dessas espécies serem casos de pseudoparasitismo, porém no trabalho de Jirků et al. (2009), o desenvolvimento dos estágios endógenos de *E. ranae* é descrito em conjunto com diligentes caracterizações morfológicas e moleculares; portanto essa possibilidade é improvável.

Jirků et al. (2009), no seu próprio trabalho, reconhece as incongruências de algumas análises filogenéticas moleculares com a classificação taxonômica tradicional. Ele alega, contudo, que *Eimeria* corresponde a um dos gêneros eucarióticos mais especiosos que se tem relato; e que estudos a seu respeito, principalmente direcionados a grupos hospedeiros negligenciados (como vertebrados ectotérmicos, e principalmente invertebrados), podem servir como modelos para entender a evolução coccidiana e seu processo de coevolução parasito-hospedeiro. Cabe frisar que, sabe-se muito pouco sobre *Eimeria* spp. descritas em artrópodes, e nenhuma delas teve a complementação de dados moleculares. A incorporação dos tais “elos perdidos” na filogenia molecular, representará uma abordagem sólida para elucidar a sistemática geral de coccídios eimerídeos (KOPEČNÁ et al., 2006; JIRKŮ et al., 2009). Xavier et al. (2018) reendossam isso, ao perfilarem resultados filogenéticos de coccídios de peixes marinhos com outros grupos; e sugerem que essas linhagens parasitárias evoluíram primeiro em hospedeiros vertebrados basais (e.g. Chondrichthyes Huxley, 1880), e que as linhagens mais derivadas infectam vertebrados superiores (e.g. pássaros e mamíferos) em conformidade com a evolução de seus hospedeiros. Segundo eles, os elasmobrânquios podem hospedar outras linhagens ancestrais abrigando elos desconhecidos da evolução coccidiana.

Diante desse cenário, é preciso entender que a morfologia ainda cumpre com a sua função indispensável para descrições taxonômicas, ou mesmo para a organização sistemática dos mais variados táxons; porém caracterizações moleculares complementares também se tornaram essenciais para a descrição de novas espécies ou táxons. A aplicação de técnicas moleculares ajuda a elucidar vários dilemas taxonômicos, provendo análises filogenéticas mais fidedignas e ajudando a se inferir melhor sobre o processo de especiação das espécies coccidianas e suas relações evolutivas entre os táxons. Com isso, as caracterizações genéticas dos coccídios têm sido requisitadas cada vez mais, trazendo consequentemente, um maior suporte analítico (TENTER et al. 2002; MORRISON, 2009; OGEDENGBE et al. 2011;

BERTO et al., 2014). De acordo com Barta (2001), as ferramentas moleculares são úteis principalmente para se inferir relações evolutivas. Características morfológicas, por vezes, mostram-se limitadas para sistematizar táxons, definir espécies e ainda mais, para entender as relações de parentesco entre os coccídios. Um exemplo crasso foi o de *Cryptosporidium*.

Irradiações adaptativas e convergências evolutivas são fenômenos evolutivos que ajudam a explicar a diversidade de seres vivos, mas que também podem se tornar confusos a um olhar isento da genética (BECK et al., 2009). Em convergências evolutivas, espécies ou táxons (mesmo que distantes filogeneticamente), por uma série de fatores, como a pressão seletiva do meio, acabam desenvolvendo características semelhantes entre si; e o emprego dessa terminologia está bem associado à comparação de grupos parafiléticos. Já as irradiações adaptativas estão mais relacionadas à formação de novas espécies, derivadas de um ancestral comum mais recente, mas que foram adaptando seus caracteres às diferentes circunstâncias do meio no qual estavam inseridas, como num processo de co-evolução do parasito ao seu hospedeiro; ou seja, se aplica bem a grupos monofiléticos (AMORIM, 2002).

É neste sentido que a biologia molecular ganhou força nas últimas décadas, não como uma técnica substitutiva, mas sim complementar. É de extrema importância pontuar que a morfologia, associada a aspectos biológicos, patológicos e ecológicos dos coccídios em seus hospedeiros, ainda continuam sendo elementares para descrições taxonômicas ou organizações sistemáticas, sobretudo em eimerídeos. A biologia molecular deve ser usada como uma ferramenta (nem mais nem menos importante) a fim de confirmar ou rechaçar hipóteses, estipular com maior precisão a filogenia de grupos, entender aspectos evolutivos inerentes às espécies (e.g. espécies crípticas ou polimórficas) e auxiliar na descrição de novas espécies (BARTA, 2001; MORRISON, 2008; DOLNIK et al., 2009).

Os genes mais comumente usados para o sequenciamento de coccídios eimerídeos são os genes ribossômicos (18s, 28s), o espaçador interno transcrito (ITS), e os mitocondriais que codificam as subunidades I e II da enzima citocromo c oxidase (*cox1*, *cox2*); sendo o 18S o mais largamente empregado até o momento. O sequenciamento conjunto desses genes, oferece um panorama ideal para a caracterização de espécies, bem como, estipular seu posicionamento filogenético frente a outros grupos. Os genes mitocondriais, por acumularem mais alterações genotípicas ao longo do tempo e conseqüentemente serem menos conservados; são mais apropriados para a identificação de espécies, descrição de novas ou distinção de polimorfismos (acurado para eventos recentes de especiação). Por outro lado, os genes ribossômicos, por

acumularem menos alterações genotípicas ao longo do tempo e conseqüentemente serem mais conservados; acabam sendo mais apurados para delimitar as relações de parentesco entre diferentes táxons e analisar a filogenia entre eles (OGEDENGBE et al., 2011; OGEDENGBE et al., 2015; BERTO et al., 2014).

Diante disso, retomando a exposição inicial desse tópico, a revisão de Tenter et al. (2002) descreve vantagens e desvantagens do uso de caracteres fenotípicos ou moleculares para esquemas taxonômicos com coccídios eimerídeos. Ela traz exemplos das desvantagens de classificações atuais baseadas apenas em caracteres fenotípicos, bem como armadilhas potenciais associadas ao uso apenas de filogenias moleculares. Se por um lado, a “taxonomia tradicional” tem mostrado suas limitações para sistematizar os táxons coccidianos, uma análise exclusivamente genética também se mostra insuficiente. Se tomarmos como exemplo outros alveolatas, em *Paramecium* considera-se até 10% de variação pelo gene COI, como ainda sendo a mesma espécie (ZHAO et al., 2013). Já em *T. gondii*, encontramos uma variação de até 3% apenas entre linhagens da Europa (KHAN et al., 2014). E *Isospora* spp. já foram separadas apresentando diferenças de apenas 0,6% (para o gene 18s) e 1,7% (para o gene COI), mesmo sem uma diferenciação morfológica clara (HAFEEZ et al., 2014). Talvez o exemplo mais notável, resida na comparação entre *Eimeria necatrix* Johnson, 1930 e *Eimeria tenella* (Tyzzer, 1929). Estas duas espécies parasitam galinhas, sendo extremamente patogênicas, com oocistos morfológicamente muito parecidos, e apresentando ainda 99,9% de similaridade em todo genoma mitocondrial. Porém, enquanto uma parasita o ceco (*E. tenella*) a outra parasita o duodeno e jejuno (*E. necatrix*). Com isso, a principal diferenciação entre as duas, fica a cargo dos sítios de infecção e períodos pré-patente em cada espécie. Por isso, descrições taxonômicas ou organizações sistemáticas com usufruto da taxonomia integrativa, são sempre recomendadas.

Embora a biologia molecular seja amplamente aplicada na caracterização de diversos grupos coccidianos hoje em dia, muitas lacunas ainda permanecem abertas; com a necessidade de uma maior quantidade de espécies e de diferentes genes serem sequenciados, para ajudar a desvendar essas questões sobre a sistemática dos grupos. A esmagadora maioria das espécies de coccídios foram descritas apenas considerando a morfologia de seus oocistos. Isso pode ser explicado pelo fato da disponibilização de técnicas moleculares, ser uma aquisição relativamente recente, enquanto coccídios já vem sendo descritos há pelo menos um século e meio. Portanto, pela existência limitada de espécies sequenciadas, nossa compreensão geral sobre a sistemática desse grupo ainda é muito incipiente. Há muito o que ser feito ainda!

Especificamente, os resultados de filogenia molecular obtidos neste trabalho para o gênero *Tyzzeria*, serão discutidos no tópico a seguir.

6.2 Análises filogenéticas e evidências sobre o posicionamento do gênero

A análise filogenética contendo espécies dos principais táxons de cromistas baseada no gene 18S realizada neste trabalho (figura 31) foi similar àquelas apresentadas previamente por Barta et al. (2012) e Ogedengbe et al. (2018), onde grupos monofiléticos foram compatíveis com os táxons de dinoflagelados, gregarinas, hematozoários, adelídeos, eimerídeos e sarcocistídeos. Em contrapartida, da mesma forma que destacado desde Barta (1989) até os trabalhos mais recentes de Barta et al. (2012) e Ogedengbe et al. (2018), foram observadas homoplasias associadas a estes grupos monofiléticos correspondentes aos táxons de cromistas (figura 31), tais como a heterogamia e ausência de sizígia nos clados de *Cryptosporidium* spp. e Eimeriida (BARTA; THOMPSON, 2006), e o parasitismo epitelial nos clados de *Cryptosporidium* spp., *Goussia* spp. de peixes e *Acroeimeria* spp. e *Choleoeimeria* spp. de répteis (BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ et al., 2015). No entanto, as homoplasias mais evidentes e estudadas nos táxons de coccídios, principalmente Eimeriida, referem-se a caracteres taxonômicos relacionados aos oocistos, como a estrutura de excistamento nos esporocistos.

Jirků et al. (2002) propuseram que a família Eimeriidae fosse composta apenas pelos gêneros de coccídios que possuíssem corpo de Stieda como estrutura de excistamento do esporocisto; ou seja, nesse caso tal estrutura seria uma autapomorfia de eimerídeos. Neste pensamento, apenas os gêneros *Eimeria*, *Isospora*, *Cyclospora* e *Caryospora* seriam eimerídeos verdadeiros. Ainda em Jirků et al. (2002), os sarcocistídeos teriam a sinapomorfia do excistamento através de duas suturas presentes no esporocisto; e gêneros como *Acroeimeria*, *Choleoeimeria*, *Calyptospora*, *Barroussia* e *Goussia* deveriam ser alocados em uma ou mais famílias distintas por terem apenas uma sutura abrindo em duas valvas no esporocisto como estrutura de excistamento.

Neste mesmo sentido, Ogedengbe et al. (2018) mostraram que os coccídios que possuem corpos de Stieda formam um grande clado bem suportado em uma análise filogenética baseada em sequências mitocondriais e nucleares combinadas; entretanto, esta análise filogenética incluiu majoritariamente sarcocistídeos, *Eimeria* spp. e *Isospora* spp., parasitos de diferentes classes de vertebrados, e apenas uma espécie de *Choleoeimeria* e outra de

Lankesterella. A análise filogenética do presente estudo contemplou uma maior diversidade de gêneros e espécies de coccídios, de forma que a monofilia de espécies coccidianas que contém esporocistos com corpos de Stieda não foi plenamente observada (figura 31). Neste sentido, um grande clado agrupando diversas *Eimeria* spp., *Isoospora* spp. e *Cycloospora* spp. de mamíferos e aves (todas com corpo de Stieda) foi observado na análise filogenética; entretanto, dentro do clado maior/anterior de Eimeriida, são observados quatro cladogramas distintos agrupando gêneros coccidianos com e sem corpo de Stieda, tais como: (1) *Lankesterella* spp. (sem corpo de Stieda) com *Caryospora bigenetica* Wacha & Christensen, 1982, *Eimeria paludosa* (Léger & Hesse, 1922) Hoare, 1933 e *Isoospora* spp. de répteis (com corpo de Stieda); (2) *Goussia neglecta* (Nöller, 1920) Molnár, 1995 e *Goussia balatonica* Molnár, 1989 (sem corpo de Stieda) em diferentes posições com os eimerídeos com corpo de Stieda; (3) *Calyptospora* spp. (sem corpo de Stieda) com *Eimeria* spp. de peixes (com corpo de Stieda); e, a partir do estudo atual, (4) *T. parvula* (sem corpo de Stieda) com *Eimeria ranae* (com corpo de Stieda) num clado menor e com *Schelackia* spp. e *Caryospora-Like* spp. (sem corpo de Stieda) de répteis e anfíbios num clado anterior (figura 32).

A falha na observação de corpos de Stieda, principalmente em estudos antigos ou superficiais, pode estar interferindo na interpretação de homoplasia deste caractere taxonômico na análise filogenética. Por exemplo, Megía-Palma et al. (2015) descreveram *E. eutropidis* e *E. steinhausi* de répteis, as quais foram inseridas no clado de *Choleoeimeria* spp. e *Acroeimeria* spp. em sua análise filogenética, mas foram descritas no gênero *Eimeria* mesmo sem apresentar desenhos ou fotomicrografias que evidenciassem os corpos de Stieda típicos do gênero. Em contrapartida, Upton e Oppert (1991) e Jirků et al. (2009) apresentaram exemplarmente os corpos de Stieda nas descrições de *E. arnyi* e *E. ranae*, as quais foram inseridas fora do clado dos eimerídeos tradicionais, num clado de *Schelackia* spp. e *Caryospora-Like* spp. que não possuem corpos de Stieda.

Considerando o corpo de Stieda como um caractere taxonômico homoplásico em distintos cladogramas de Eimeriida, vale refletir por qual processo evolutivo deu-se esta homoplasia. Conforme já relatado anteriormente, uma homoplasia pode ter se originado a partir de três eventos evolutivos principais: paralelismo, convergência e reversão (AMORIM, 2002). Neste contexto, considerando a complexidade estrutural e biológica do corpo de Stieda e a sua presença apenas em parte das espécies, em pelo menos 4 cladogramas de Eimeriida, conforme evidenciado na análise filogenética deste estudo (figura 31); parece mais parcimonioso considerar que tal estrutura tenha regredido em algumas espécies nestes cladogramas num processo

de reversão, ao invés de ter surgido de forma independente, seja a partir de um mesmo (paralelismo) ou diferente (convergência) caractere plesiomórfico. Em outras palavras, a nossa hipótese é que o corpo de Stieda não seria uma autapomorfia, mas sim que ele provavelmente tenha surgido numa linhagem mais ancestral, a partir da qual, alguns grupos evoluíram perdendo novamente essa característica, enquanto em outros, essa característica permaneceu e se aprimorou. Então, nesse caso o retorno dessa condição de ausência do corpo de Stieda e dos esporocistos seria uma homoplasia por reversão nesses outros eimerídeos.

Outro caractere taxonômico, desta vez também considerado como homoplásico por Ogedengbe et al. (2018), é a configuração do número de esporozoítas e esporocistos por oocisto. Este tem sido o principal caractere taxonômico utilizado para a diferenciação dos gêneros coccidianos desde os primórdios da coccidiologia (BERTO et al. 2014). Neste sentido e em relação ao estudo atual, Allen (1936) classificou *Tyzzeria* junto com *Pfeifferinella* e *Schellackia* na família Eimeriidae, subfamília Cryptosporidiinae, principalmente baseada na ausência de esporocisto nos oocistos. De fato, esta subfamília é incoerente pela posição filogenética de *Cryptosporidium* spp. fora do grupo dos coccídios, porém há uma aproximação morfológica de *Tyzzeria* com *Schellackia* por ambos terem oocistos aesporocísticos octozóicos, a qual foi sustentada pela posição filogenética de *Tyzzeria* no estudo atual. A aproximação filogenética com *Pfeifferinella* não é conhecida pois não há depósitos de sequências de *Pfeifferinella* no GenBank. Em relação as demais características biológicas e ecológicas entre estes gêneros, há muitas incongruências: (1) *Tyzzeria* parasita essencialmente Anseriformes, tem transmissão feco-oral e esporogonia exógena (ALLEN, 1936; LEVINE, 1985; BERTO, 2008); (2) *Pfeifferinella* parasita essencialmente gastrópodes, tem transmissão feco-oral, esporogonia exógena e contém uma estrutura típica e única denominada “tubo vaginal” no macrogameta por onde penetram os microgametas (WENYON, 1926; WACHA, 1980); e (3) *Schellackia* parasita répteis e anfíbios, tem ciclo heteroxeno sem liberação de oocistos nas fezes, uma vez que os esporozoítos que desenvolvem-se em oocistos que ficam retidos na lâmina própria do intestino, penetram em células sanguíneas de capilares e tornam-se susceptíveis a mosquitos que são considerados hospedeiros intermediários e vetores (WENYON, 1926; LEVINE, 1985; MEGÍA-PALMA et al., 2014).

Além disso, a aproximação de *Tyzzeria* com *Schellackia* pela configuração dos oocistos, a qual foi sustentada pela análise filogenética pelo 18S no estudo atual, confronta a abordagem de Ogedengbe et al. (2018), a qual considerou que a configuração dos oocistos não é compatível com os grupos monofiléticos resultantes da filogenia molecular, e que o processo evolutivo

para diversidade de coccídios deu-se primariamente através da coevolução parasito-hospedeiro. De fato, vários clados são observados com coccídios parasitos de um mesmo grupo hospedeiro, incluindo gêneros diferentes (configurações de oocistos diferentes), à exemplo de *Calyptospora* spp. e *Eimeria* spp. parasitos de peixes em um mesmo grupo monofilético bem definido. Em contraste, na análise filogenética do estudo atual, algumas espécies congêneres são observadas parasitando diferentes classes de vertebrados em mesmos grupos monofiléticos, conforme observa-se para *Lankesterella* spp. parasitos de anfíbios, répteis e aves; e *Choleoimeria* spp. e *Acroeimeria* spp. parasitos de anfíbios e mamíferos.

Ainda sobre a configuração dos oocistos, Ogedengbe et al. (2018) reforçam a inadequação deste caractere taxonômico para delimitação de gêneros ao destacar que o número total de esporozoítos por oocisto, desconsiderando os esporocistos, altera-se em alguns grupos monofiléticos: *Cyclospora* spp. têm um total de 4 esporozoítos, *Eimeria* spp., *Caryospora* spp. e *Isospora* spp. têm 8 esporozoítos; e *Lankesterella* tem 32 esporozoítos. Ogedengbe et al. (2018) ainda ressaltam que alterações químicas e biológicas podem alterar a configuração dos oocistos de eimerídeos tradicionais e que, portanto, o número de esporozoítos e esporocistos nos oocistos não deveria ser considerado como um caractere taxonômico fundamental, ao menos que o taxonomista considere os gêneros tradicionais como parafiléticos.

Em contrapartida, no estudo atual, pode-se observar a congruência de oito esporozoítos por oocisto em *Tyzzeria*, *Schellackia*, *Eimeria*, e *Caryospora*-Like spp. que formaram um grupo monofilético, apesar da multiplicidade de hospedeiros (aves, répteis e anfíbios) (figura 31). Adicionalmente, *Tyzzeria* e *Schellackia* são reconhecidamente aesporeocísticos. *Caryospora*-Like spp. de quelônios foram pela primeira vez descritas como *Caryospora cheloniae* Leibovitz, Rebell, & Boucher, 1978 (LEIBOVITZ et al. 1978), a qual foi caracterizada como monosporeocístico octozóico; entretanto, ao se observar as fotomicrografias originais fornecidas por Leibovitz et al. (1978), a membrana identificada como a parede do oocisto que reveste o denominado esporocisto poderia ser, na verdade, o véu-exterior comum aos oocistos eimerídeos (BELLI et al., 2006; MAI et al., 2009). E nesse caso, o denominado esporocisto então seria um oocisto aesporeocístico octozóico, em conformidade com os gêneros *Tyzzeria* e *Schellackia*. Apesar da grande importância de *Caryospora*-Like spp. devido a sua patogenicidade em quelônios e das várias publicações associadas à patologia desses parasitos, nenhum estudo mais recente abordou detalhadamente a morfologia dos oocistos eliminados. Caso esta configuração seja confirmada para *Caryospora*-Like spp. de quelônios, apenas *Eimeria arnyi* e *Eimeria*

ranae seriam inconsistentes nestes grupos monofilético por terem esporocistos com corpo de Stieda.

Em todo caso, é fato a afirmação de Ogedengbe et al. (2018) de que a taxonomia clássica dos gêneros de coccídios é dissociativa dos atuais resultados de filogenia molecular; entretanto, caso todos os ajustes requeridos fossem feitos neste sentido, uma grande quantidade de novos táxons genéricos ou familiares, deveria ser adicionada para comportar esta ampla diversidade morfológica e molecular dos coccídios. Talvez o gênero coccidiano tradicional mais inconsistente com os resultados filogenéticos seja *Goussia*, a qual possui muitas espécies sequenciadas que ficam posicionadas em diferentes e distantes clados, agrupadas com *Eimeria* spp., *Calyptospora* spp., ou ainda sarcocistídeos (figura 31) (XAVIER et al., 2020). Neste sentido, considerando que este é o primeiro depósito de *Tyzzeria* no GenBank, são necessários mais estudos moleculares e filogenéticos, incluindo com as demais *Tyzzeria* spp., para inferir sobre qualquer ajuste taxonômico em nível de gênero, subfamília ou família associado a este clado de *Tyzzeria*, *Schellackia*, *Eimeria*, e *Caryospora-Like* spp.

6.3 Considerações sobre os polimorfismos observados

O polimorfismo pode ser entendido como um fenômeno populacional em que uma determinada espécie apresenta variações intraespecíficas em sua forma, tamanho e outras características; portanto, uma variação a nível de espécie (WIENS, 1999; AMORIM, 2002). Em genética de populações, o termo polimorfismo indica uma transitoriedade de alelos onde dois ou mais alelos de um mesmo *locus* gênico coexistem (não houve fixação de nenhum deles). Essa condição pode durar indefinidamente, com sua frequência variando entre 0% (situação em que é eliminado) a 100% (quando uma das condições é fixada e, conseqüentemente, as outras são eliminadas). Ou seja, polimorfismos são as variações fenotípicas e genotípicas intrínsecas a uma determinada espécie (AMORIM, 2002). Com isso em vista, conforme apresentado nas caracterizações dos morfotipos (tópico 5.2), o polimorfismo foi uma constância nas análises do presente estudo.

Foram observadas diferenças morfométricas em todos os morfotipos analisados (Tabela 5). Por exemplo, oocistos do morfotipo 1 apresentaram medidas de comprimento que variaram entre 11,2 µm a 16,6 µm; e medidas de largura que variaram entre 9,2 µm a 14,5 µm. Oocistos do morfotipo 2 também variaram nesses quesitos com um comprimento que ficou entre 11,2

μm a $15,6 \mu\text{m}$ e uma largura variando de $8,2 \mu\text{m}$ a $13,5 \mu\text{m}$. Oocistos do morfotipo 3 obtiveram $11,5 \mu\text{m}$ como medida mínima de comprimento e $18,5 \mu\text{m}$ como máxima; e $9,9 \mu\text{m}$ como medida mínima de largura e $13,9 \mu\text{m}$ como máxima. E oocistos do morfotipo 4 tiveram medidas de comprimento entre $10,2 \mu\text{m}$ a $18,3 \mu\text{m}$; e largura entre $10,2 \mu\text{m}$ a $13,8 \mu\text{m}$.

A espessura de parede também apresentou oscilações (Tabela 5). No morfotipo 1, a menor medição detectou $0,5 \mu\text{m}$ e a maior $1,4 \mu\text{m}$. No morfotipo 2, a menor espessura foi de $0,6 \mu\text{m}$, enquanto a maior foi de $1,2 \mu\text{m}$. O morfotipo 3, obteve $0,7 \mu\text{m}$ como menor espessura e $1,9 \mu\text{m}$ como a maior espessura. E no morfotipo 4, a menor espessura teve $0,9 \mu\text{m}$, com a maior tendo o valor de $2,4 \mu\text{m}$. Todos esses valores, bem como os das demais estruturas, foram fornecidos em detalhes nos tópicos 5.2.1, 5.2.2, 5.2.3 e 5.2.4 que discorrem sobre a caracterização de cada morfotipo. Segue abaixo (figura 33), uma fotomicrografia que ajuda a ilustrar melhor essas observações:

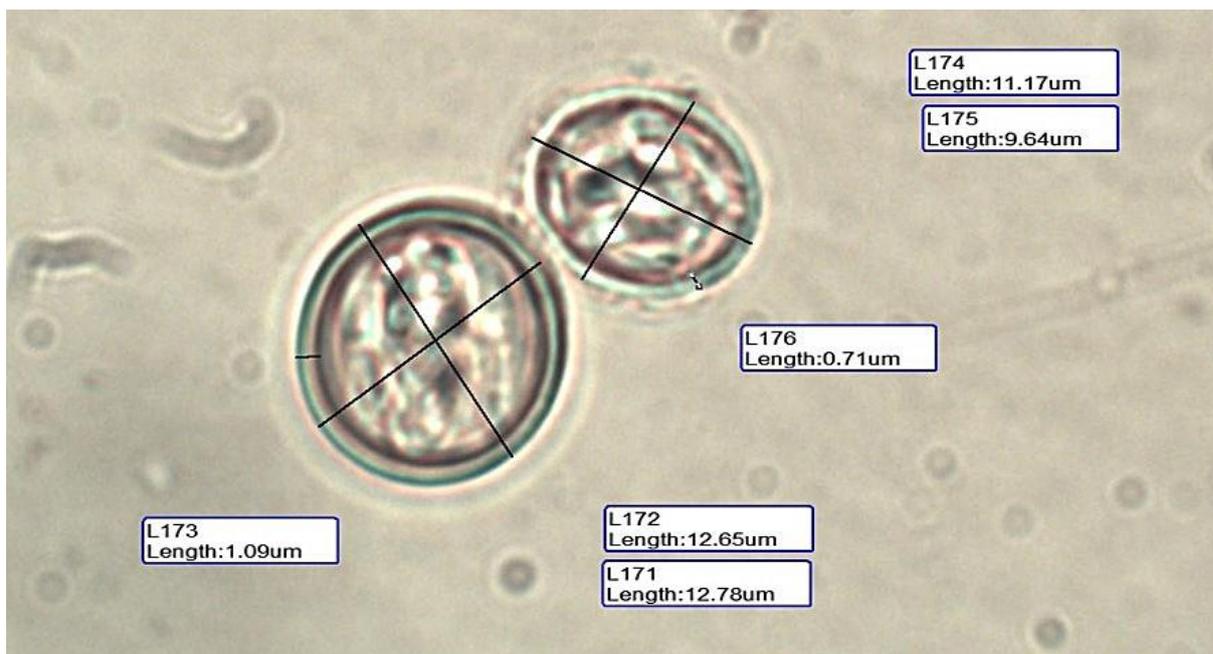


Figura 33 – Exemplificação de polimorfismo observado no morfotipo 1 (*Tyzzeria parvula*).

Existem muitos fatores capazes de explicar um padrão polimórfico intraespecífico em oocistos coccidianos. De acordo com Berto et al. (2014), podemos citar: estresse; estado nutricional e imunidade do hospedeiro; dose infectante; momento da descarga dos oocistos durante o período patente; substância e tempo que os oocistos foram armazenados e plasticidade fenotípica. Tudo isso pode implicar nos polimorfismos observados. Como exemplo, Joyner (1982) relatou que o tamanho de oocistos não é necessariamente constante, demonstrando uma mudança progressiva no tamanho à medida que a infecção se desenvolve. Duszynski (1971) já

tinha reportado um aumento no tamanho dos oocistos de *Eimeria separata* Becker & Hall (1931) durante a patência (período de maior eliminação) em experimento realizado com roedores, tendo uma variação de até 40%. Fayer (1980) também argumenta que o ambiente de confinamento dos hospedeiros e o uso de anticoccidianos podem interferir na morfometria e no número de oocistos eliminados; e segundo Greif et al. (1996), até mesmo a resistência aos anticoccidianos pode gerar polimorfismo. Berto e Lopes (2020) salientam ainda que a transmissão de coccídios entre hospedeiros simpátricos, mas de espécies diferentes (e.g. hospedeiros congêneres), pode favorecer a recombinação genética do parasito e, portanto, o polimorfismo. Como exemplo de plasticidade fenotípica, Ortúzar-Ferreira et al. (2024) descreveram uma espécie de *Eimeria* de pombos silvestres altamente polimórfica. Além disso, como asseguram Berto et al. (2014), em oocistos com índices morfométricos maiores que 1,1 (apresentando formato elipsoidal), o polimorfismo pode ser mais comum, pois a caracterização tridimensional do oocisto pode ser facilmente comprometida quando este não é observado em todas suas posições, principalmente na posição longitudinal; o que é atenuado em oocistos perfeitamente esféricos (índice morfométrico igual a 1,0).

Outro trabalho que merece destaque aqui é o de Berto et al. (2008b). Nele, os autores evidenciaram polimorfismos em oocistos de *T. parvula* provenientes de 2 grupos de gansos domésticos (*A. anser*) que viviam em ambientes distintos. Os oocistos dos gansos que viviam soltos em ambiente rural foram menores que os oocistos dos gansos que habitavam ambiente urbano, estando confinados em gaiolas de aviários comerciais. Com isso, os autores concluíram que *T. parvula* pode ser altamente polimórfica; e que as influências dos sistemas de criação e o repetitivo grau de infecção natural sobre os gansos estão diretamente relacionados ao polimorfismo nessa espécie. Levine (1952) já havia percebido tal característica para *T. parvula*, afirmando que as dimensões dos oocistos tendem a ser semelhantes em cada hospedeiro e que, o polimorfismo é mais percebido quando se comparam oocistos de hospedeiros distintos.

Do ponto de vista evolutivo, o polimorfismo pode representar um processo contínuo de especiação, que Wiens (1999) chama de “microevolução”, ou seja, o processo lento e gradual no qual alguns caracteres podem ser eliminados ou incorporados na formação de uma nova espécie. Este autor também defende que o polimorfismo pode ter um impacto profundo no estudo de sistematas e taxonomistas para a delimitação de espécies, reconstrução da filogenia de grupos e estudos sobre evolução de caracteres; portanto, caracteres polimórficos não podem ser ignorados. Nesse sentido, trabalhos como o de Silva-Carvalho et al. (2020) reforçam esse entendimento, pois os autores encontraram variações morfológicas e genotípicas para oocistos

de *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 que foram recuperados de diferentes hospedeiros, associando isso a um processo de especiação adaptativa em suas respectivas espécies hospedeiras. Ainda neste raciocínio, desta vez exemplificando com uma espécie de *Eimeria*; Gardner e Duszynski (1990) constataram um padrão polimórfico para *Eimeria opimi* Lambert, Gardner, & Duszynski, 1988 recuperado de diferentes hospedeiros roedores.

Essas noções, por si só, justificariam as diferenças morfométricas observadas nas caracterizações de todos os morfotipos analisados, tendo em vista que cada um deles foi recuperado de pelo menos duas espécies hospedeiras, vivendo em condições ambientais diferentes. O morfotipo 1 (*T. parvula*), esteve presente em amostras de gansos *A. anser* e *A. cygnoides* de criadouros ou lojas agropecuárias. Os morfotipos 2, 3 e 4 foram encontrados apenas em anatídeos nativos do Brasil, sejam de vida livre ou domesticados. Suas espécies hospedeiras foram patos-do-mato domesticados da espécie *C. moschata* e marrecas-irerês silvestres da espécie *D. viduata*. Os morfotipo 2 e 3 ainda foram observados em *C. moschata domestica* (na variedade doméstica dessa espécie). Nas coletas 4, 11 e 12 (positivas apenas para *T. parvula*), as aves eram exóticas, domésticas e de criadouros (criadas soltas, mas com um mínimo confinamento). Já na coleta 10 (também positiva apenas para *T. parvula*), as aves eram exóticas e domésticas, mas eram de lojas agropecuárias (criadas em confinamento total). Na coleta 6 (positiva apenas para o morfotipo 2) e na coleta 7 (positiva para os morfotipos 2, 3 e 4), as aves eram nativas, domesticadas, mas criadas soltas de maneira irrestrita em hotéis fazenda. Nas coletas 9 e 14 (positiva para os morfotipos 2, 3 e 4), as aves eram nativas, silvestres e de vida livre. E na coleta 13 (positiva para os morfotipos 2 e 3), a ave era nativa, doméstica e estava sob cuidados veterinários. Nesta última, a ave se encontrava internada num hospital veterinário, mas não se sabe se foi administrado algum anticoccidiano para a mesma.

Esse raciocínio do polimorfismo pode ser ainda mais explorado, se compararmos as dimensões obtidas para os morfotipos 2, 3 e 4. Todos esses morfotipos (coincidentemente ou não) foram encontrados em amostras tanto de *C. moschata* como *D. viduata*, ao passo que ambos estavam presentes nas coletas 7, 9 e 14. Se analisarmos cuidadosamente as amplitudes morfométricas dos valores referentes ao diâmetro maior e diâmetro menor de cada um deles, podemos notar que todos apresentam valores bastante aproximados e em sobreposição, o que suscita a possibilidade dos morfotipos 2, 3 e 4, na verdade constituírem uma única espécie, mas altamente polimórfica. Essas questões serão discutidas no tópico a seguir.

6.4 Implicações para a identificação dos morfotipos encontrados

Parker e Duszynki (1986) reconheceram casos problemáticos para a identificação de oocistos coccidianos. Alguns deles incluíam: (1) oocistos presumivelmente de uma única espécie que podem ser altamente polimórficos dentro da mesma espécie hospedeira ou de hospedeiros intimamente relacionados; e (2) oocistos de diferentes espécies que podem ser estruturalmente semelhantes dentro de um grupo hospedeiro intimamente relacionado. Em outras palavras, esses autores se referem a casos de plasticidade fenotípica intraespecífica (polimorfismos) e situações de ocorrência de espécies crípticas, isto é, quando diferentes espécies se assemelham muito entre si. Atribuem-se a isso, diferentes fenômenos evolutivos como irradiações adaptativas e convergências evolutivas.

Como abordado no tópico acima, a plasticidade fenotípica está diretamente relacionada a casos de polimorfismos, onde uma mesma espécie se apresenta de forma variável, o que pode indicar um processo de especiação em percurso. Como exemplo, esses mesmos autores notaram um polimorfismo acentuado em oocistos, recuperados de grou, da espécie *Eimeria reichenowi* Yakimoff & Matschoulsky, 1935 que podiam ser divididos em até 5 morfotipos diferentes. As diferenças incluíam aspectos relacionados a textura da parede (ora lisa, ora áspera), número de grânulos polares, aparência do resíduo dos esporocistos e dados morfométricos. Em outro caso, mas dessa vez amparado por dados moleculares, Ortúzar-Ferreira et al. (2024) descreveram uma nova espécie na pomba-amargosa *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818), extremamente polimórfica: *Eimeria patagioenasae* Ortúzar-Ferreira, Oliveira, Andrade, Mello, Lima & Berto, 2024. Este trabalho contou com um delineamento estatístico, associado a análises morfológicas/morfométricas e sequenciamentos genéticos. Foram observados 3 morfotipos, sendo um deles sub esférico (mais globoso), outro nitidamente mais elipsoidal e cilíndrico; e um último que se configurava como uma transição entre esses dois primeiros, tendo uma conformação mais ovóide (nem tão esférica, nem tão cilíndrica). Além dessas diferenças morfométricas, os oocistos revezavam presença/ausência aleatória de caracteres associados à parede do oocisto, como micrópila, capuz polar, micrópila lateral, véu externo e textura da parede. Entretanto, aspectos relacionados a conformação interna dos oocistos (como formato dos esporocistos, distribuição do resíduo do esporocisto e grânulos polares, corpos de Stieda e sub-Stieda), assemelhavam-se muito entre todos os morfotipos. A análise de regressão linear confirmou o polimorfismo extremo dos oocistos, mostrando que se todas as combinações de caracteres taxonômicos nos oocistos (morfotipos) fossem superestimadas, 19 espécies diferentes poderiam ser identificadas/descritas. Em contrapartida, a análise de comparação de

médias entre oocistos com presença/ausência de características e os histogramas mostraram equivalências e regularidade na distribuição nas classes de medidas, o que indicou a presença de uma única espécie nos oocistos medidos. As análises moleculares foram realizadas a partir do isolamento de oocistos individuais dos diferentes morfotipos, que tiveram seu material genético extraído, amplificado e sequenciado. As sequências foram 100% idênticas entre os morfotipos, com isso, essa análise multifatorial apoiou que os oocistos eram de uma única espécie.

Paralelamente, podemos notar também casos opostos a esse, como Casas et al. (1995) que descreveram três espécies de *Eimeria* de capivaras, semelhantes entre si, sobretudo na conformação interna de seus oocistos, mas que foram separadas pelas diferenças de tamanho, formato e textura da parede de seus oocistos. Além disso, em outro trabalho, Jirků et al. (2013) isolaram e sequenciaram duas espécies de *Eimeria* de pangolins que eram morfologicamente semelhantes, mas que apresentavam diferenças sutis relacionadas à textura da parede de seus oocistos. Os resultados, apoiados no gene 18S, demonstraram que geneticamente haviam duas espécies. Os autores atribuíram isso, a um fenômeno de irradiação adaptativa e co-evolução, tendo em vista que foram descritas em espécies de pangolins diferentes, não simpátricos (separados geograficamente em dois continentes). A espécie que tinha parede lisa, parasita pangolins africanos que habitam florestas tropicais, ocorrendo assim em ambientes mais úmidos e frescos. Já a outra espécie, de parede áspera, parasita pangolins asiáticos que habitam áreas desérticas, ocorrendo em regiões semiáridas e secas. Isso explica o desenvolvimento de uma parede mais espessa e áspera, como uma adaptação para evitar a dessecação e dirimir a ação dos raios ultravioleta nessa última espécie. A espécie florestal não precisou disso.

No caso dos morfotipos separados aqui, por este trabalho, apenas o morfotipo 1 pôde ser identificado inequivocadamente. Esse morfotipo esteve presente em amostras de gansos *A. anser* e *A. cygnoides*, hospedeiros da subfamília Anserinae. Considerando os estudos prévios sobre especificidade parasitária (já focado no tópico 3.1.5), a espécie esperada para ocorrer nessa subfamília é *T. parvula*. Além disso, ambos os hospedeiros amostrados já tinham parasitismo relatado para essa espécie (conforme informado no tópico 3.2.5.5), e em localidades próximas onde as coletas deste estudo foram conduzidas. Ou seja, *T. parvula* é uma espécie que ocorre naturalmente nas regiões e hospedeiros amostrados. As análises morfológicas e mensurações morfométricas também direcionaram para a identificação do morfotipo 1 como sendo dessa espécie. É possível perceber que a morfologia e morfometria dos oocistos desse morfotipo é plenamente compatível com todas as caracterizações dessa espécie, já feitas por

outros autores (ver Tabela 6). Esse morfotipo foi o mais prevalente, tendo um número substancialmente alto de oocistos avaliados, com um número amostral de 180 oocistos medidos. Em todas as amostras e hospedeiros em que esteve presente, ele foi o único morfotipo observado, não havendo co-parasitismo com os morfotipos 2, 3 ou 4. Dessa forma, foi possível isolar seguramente oocistos desse morfotipo para serem sequenciados e caracterizados molecularmente.

O morfotipo 2 foi o menos prevalente, contando com um número amostral de 22 oocistos analisados. Como os oocistos das espécies de *Tyzzeria* são morfologicamente muito similares e desprovidos de chaves dicotômicas de identificação (diferentemente dos tradicionais eimerídeos portadores de corpo de Stieda), a identificação desse morfotipo se tornou incerta. Ele foi encontrado em hospedeiros da subfamília Anatinae (*C. moschata*, incluindo *var. domestica*) onde o parasitismo por *T. pernicioso*, *T. pellerdyi*, *T. allenae* e *T. chenicusae* é relatado/esperado. Sua morfometria se aproximou das espécies *T. pernicioso*, *T. pellerdyi* (ver Tabela 5). Contudo, considerando o polimorfismo recorrente em muitas espécies de eimerídeos, inclusive já reportado para o gênero *Tyzzeria* (ver tópico 6.3) é muito provável que todas essas espécies sejam sinonímias de *T. pernicioso* (isso será debatido com ênfase no tópico 6.5). Além disso, não há até o momento nenhum sequenciamento genético realizado para quaisquer espécies do gênero, sendo assim não há como constatar uma diferenciação molecular entre essas espécies que justificasse suas separações. Nesse sentido, uma abordagem essencial para esclarecer essa incógnita taxonômica, seria isolar e caracterizar molecularmente oocistos de *T. pernicioso*, previamente identificados morfologicamente/morfometricamente em compatibilidade com essa espécie (preferencialmente do mesmo hospedeiro e localidade tipo). Assim, estipulada sua caracterização molecular, poderia-se então, proceder o mesmo com as demais *Tyzzeria* spp. descritas em Anatinae, comparando posteriormente os resultados obtidos. Tendo em vista que os oocistos desse morfotipo foram encontrados em baixas quantidades, não foi possível proceder isolamento ou caracterização genética dos mesmos. E ainda que isso tivesse sido feito, não teria como compará-lo molecularmente com as demais *Tyzzeria* spp. de Anatinae para atestar sua espécie.

Outra constatação que impossibilita sua identificação, é o fato de que este mesmo morfotipo também foi encontrado em marrecas *D. viduata*, hospedeiros da subfamília Dendrocygninae. Não há nenhum registro prévio de *Tyzzeria* spp. feita para essa subfamília. Essas questões embaralham nosso entendimento de especificidade. Seria o morfotipo 2 uma espécie nova capaz de ultrapassar a especificidade parasitária a nível de subfamília? Seria a

ocorrência desse morfotipo em duas subfamílias, fruto de contaminação amostral? Qual seria o verdadeiro hospedeiro para o morfotipo 2? Seria o morfotipo 2 alguma das espécies já relatadas para Anatinae? Diante, da realidade dos resultados e de poucos oocistos encontrados, nenhuma dessas questões pode ser respondida. Cabe salientar também que não há nenhum relato prévio de *Tyzzeria* spp. para o hospedeiro *C. moschata*.

No que concerne ao padrão de especificidade parasitária para eimerídeos, apesar de constar com sólidos trabalhos na literatura, não há uma regra nesse sentido. Hnida e Duszynski (1999), afirmam que diversos estudos amparados por trabalhos a campo e de transmissão cruzada, já indicaram que algumas espécies de *Eimeria* não são tão específicas quanto se pensava anteriormente (DE VOS, 1970; HILL; DUSZYNSKI, 1986; MAYBERRY et al. 1982; TODD, HAMMOND; 1968a,b; THOMAS; STANTON, 1994; UPTON et al. 1992). Por exemplo, De Vos (1970) demonstrou que *Eimeria chinchillae* De Vos & Van der Westhuizen, 1968, originalmente descrita em chinchila, foi transmitida com sucesso para sete outros roedores de outras famílias. Todd e Hammond (1968a,b) também reportaram casos assim, de baixa especificidade, para *Eimeria callospermophili* Henry, 1932 e *Eimeria larimerensis* Vetterling, 1964. E Hill e Duszynski (1986) para *Eimeriu tamiasciuri* Levine, Ivens & Kruidenier, 1957.

Os morfotipos 3 e 4 também não puderam ser identificados. Eles claramente se distinguem morfológicamente de todas as espécies de *Tyzzeria* já descritas, pois são os únicos a apresentar a característica de aspereza na parede externa de seus oocistos. Isso os potencializam como prováveis espécies novas. Contudo, as diferenças entre ambos foram sutis, girando em torno da espessura da parede e grau de aspereza observado. Seus dados morfométricos convergiram significativamente; e ambos foram recuperados dos mesmos hospedeiros. Esses hospedeiros (*C. moschata* e *D. viduata*) por sua vez também contemplam duas subfamílias: Anatinae e Dendrocygninae. Teriam então esses morfotipos, uma especificidade que foge do padrão a nível de subfamília? Seriam os morfotipos 3 e 4 uma mesma espécie, mas polimórfica? Ou seriam espécies crípticas, mas diferentes? Nesse sentido, considerando que tanto os morfotipos 2, 3 e 4 foram encontrados em hospedeiros nativos da espécie *C. moschata* e *D. viduata* (inclui-se ainda *C. m. domestica* para os morfotipos 2 e 3) e apresentaram tamanhos e formatos similares (ver Tabela 5), todos esses poderiam se configurar como uma única espécie, mas altamente polimórfica. A diferenciação morfológica entre eles fica a cargo da espessura e textura da parede, mais acentuada sobretudo quando comparamos os morfotipos 2 e 4 (mais extremos entre si). Já o morfotipo 3, parece ser um morfotipo de

transição entre eles. As questões de especificidade enfocadas para o morfotipo 2 também se aplicam a esses outros dois morfotipos.

Como já mencionado aqui, recentemente Ortúzar-Ferreira et al. (2024) descreveram uma nova espécie de *Eimeria* de pombos, altamente polimórfica, com oocistos que variavam em formato, tamanho e textura de parede (aspereza acentuada, intermediária e parede lisa). Portanto, a exemplo desse trabalho, seria indispensável que cada um desses morfotipos fossem isolados, sequenciados e comparados molecularmente para se chegar a uma descrição mais acertada possível, de uma única ou múltiplas espécies. Apesar dos morfotipos 3 e 4 terem sido encontrados em maior quantidade (número amostral de 58 e 39 oocistos, respectivamente), assim como o morfotipo 2, não se obteve êxito em seus isolamentos. Sendo assim, não foi possível caracterizá-los molecularmente. Além disso, como ambos morfotipos foram encontrados em duas subfamílias de Anatidae, mas estudos devem ser conduzidos para entendermos a real especificidade parasitárias desses morfotipos.

6.5 Comentários críticos sobre a validade de *Tyzzeria* spp.

Conforme explanação feita no tópico 3.1.5, aspectos relacionados à especificidade parasitária e biologia dos coccídios, costumam ser bem variáveis. Sabidamente, alguns gêneros possuem uma abrangência de hospedeiros maior que outros, ciclos heteroxenos e homoxenos; e diferentes sítios de infecção. Por exemplo, o gênero *Eimeria*, o mais diversificado dos coccídios, possui centenas de espécies descritas que se distribuem em todas as classes de vertebrados e em alguns grupos de invertebrados. Nesse gênero, possuem espécies estritamente intestinais e outras que perfazem ciclo extraintestinais, parasitando o parênquima de outros órgãos como fígado, rim e útero. Por outro lado, temos gêneros como *Nephroisospora* Wünschmann, Wellehan, Armien, Bemrick, Barnes, Averbek, Roback, Schwabenlander, D’Almeida, Joki, Childress, Cortinas, Gardiner & Greiner, 2010 cuja a diversidade relatada é de apenas uma única espécie: *Nephroisospora eptesici* Wünschmann, Wellehan, Armien, Bemrick, Barnes, Averbek, Roback, Schwabenlander, D’Almeida, Joki, Childress, Cortinas, Gardiner & Greiner, 2010. Este gênero, por sua vez, está restrito ao parasitismo renal de morcegos (WÜNSCHMANN et al., 2010; BERTO et al., 2014; VOTÝPKA et al., 2016). Com isso, esse tópico se propõe a avaliar criteriosamente a diversidade e biologia do gênero *Tyzzeria*, tecendo comentários sobre a plausibilidade das suas espécies serem ou não restritas a hospedeiros anatídeos e ao parasitismo intestinal.

Até o momento, o gênero *Tyzzeria* consta com 10 espécies listadas, sendo 6 delas para aves (*T. allenae*, *T. galli*, *T. chenicusae*, *T. parvula*, *T. pellerdyi*, *T. perniciososa*), 3 para répteis (*T. boae*, *T. natrrix*, *T. typhlopsi*) e 1 para mamíferos (*T. peromysci*). Isso, obviamente pode ser reflexo de uma baixa amostragem sobre a diversidade desse grupo, com a nossa compreensão vindo a se esclarecer à medida que ele for mais explorado, e eventuais novas espécies, forem descritas. Entretanto, de acordo com alguns autores, todas as espécies descritas fora dos hospedeiros aviários pertencentes à ordem Anseriformes, parecem ser resultado de identificações errôneas, com base em oocistos mal esporulados ou configurando casos de pseudoparasitismo (DUSZYNSKI et al., 1998; GHIMIRE, 2010; BERTO et al., 2022).

Um dos meios de se atestar o endoparasitismo de forma convicta, é observar tanto os estágios endógenos como os exógenos do parasito. Acompanhar o desenvolvimento desses estágios e descrê-los, por si só, já confere material suficiente para descrever uma nova espécie, se assim for o caso. Segundo Gajadhar et al. (1983), os oocistos esporulados são evidências suficientes para estabelecer a identidade do gênero de um coccídio, mas comparação de estágios endógenos e estudos de transmissão cruzada são, por vezes, necessários para determinar a espécie com assertividade. Adicionalmente, hoje em dia, as técnicas moleculares tornaram-se peças chave para complementar a caracterização de espécies e elucidar dúvidas taxonômicas. Dentre as espécies de *Tyzzeria*, nenhuma foi sequenciada até o momento, mas algumas delas tiveram tanto estágios endógenos como exógenos (oocistos) caracterizados. Foram elas: *T. boae*, *T. natrrix*, *T. parvula* e *T. perniciososa*.

Das espécies descritas para serpentes (Reptilia: Squamata), *T. boae* teve as caracterizações de seus oocistos e do desenvolvimento de suas formas endógenas no parênquima renal. Lainson e Paperna (1994) informaram que alimentaram um exemplar de *B. constrictor* em laboratório com tecido de lagarto *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758), altamente infectado por alguma espécie de *Besnoitia* Henry, 1913 não identificada (durante tentativas frustradas de descobrir seu hospedeiro definitivo); e acabaram encontrando oocistos de *Tyzzeria*. Basearam-se em 25 oocistos para sua descrição, mas informaram que não foram encontrados estágios no intestino, apenas no tecido renal. Segundo Duszynski et al. (1998) é mais provável que essa tenha sido uma identificação errada de *Klossiella* sp. ou algum coccídio relacionado. Vale salientar que *Klossiella* é um gênero coccidiano notadamente conhecido por infectar o trato renal; e inclusive já existe uma espécie descrita em *B. constrictor*: *Klossiella boae* Zwart, 1964 (ZWART, 1964).

Matubayasi (1937) também fez a caracterização tanto dos estágios endógenos como exógenos de *T. natrix*, contudo o próprio autor afirmou em seu artigo que o desenvolvimento do ciclo endógeno observado por ele, assemelha-se muito àqueles descritos no gênero *Caryospora*, um coccídio típico de serpentes. Um dado importante a ser levantado aqui, é o de que *Caryospora* spp. (como já mencionado) podem perfazer um ciclo heteroxeno facultativo envolvendo roedores como hospedeiros intermediários. Quando isso acontece, o ciclo se desenvolve na mucosa bucal de roedores, e nesse caso, os oocistos gerados costumam apresentar uma morfologia particular, diferente daqueles gerados no trato intestinal de serpentes que acabam indo para o ambiente externo. Os oocistos gerados no tecido conjuntivo do hospedeiro intermediário apresentam uma parede mais fina, sendo o esporocisto caracterizado como uma membrana delicada, muito fina e menos distinguível que recobre os 8 esporozoítos. Já os oocistos eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo, constituem-se de um esporocisto com parede firme e consistente, onde os 8 esporozoítos estão internalizados. Com isso, é possível que Matubayasi tenha observado na verdade, estágios endógenos de *Caryospora* sp. de serpentes; mas que seus oocistos fossem provenientes do desenvolvimento da mucosa de algum roedor que tenha sido predado pela serpente necropsiada. É uma prática relativamente comum, observar casos de pseudoparasitismo no laboratório, quando oocistos das presas são visualizados nas fezes de seus predadores, como possivelmente possa ter ocorrido nesse caso. O desenvolvimento endógeno descrito por ele, pode ter sido de *Caryospora japonicum* Matubayasi, 1936, uma nova espécie descrita em conjunto com *T. natrix*. Além disso, ele também veicula nesse mesmo trabalho a ocorrência de *Isospora* sp.; dessa forma, os oocistos observados podem ser resultado de uma esporulação anômala de oocistos de *Caryospora* ou *Isospora*, sem a devida formação de seus esporocistos. Isso é sugerido por Duszynski et al. (1998).

Léger (1911) já tinha reconhecido um processo anormal de esporogonia em *Caryospora simplex* Léger, 1904 onde oocistos sem esporocistos foram formados. Segundo ele próprio, a esporogonia anormal se deve às más condições do meio, em que bactérias se tornam profílicas, consumindo oxigênio e produzindo substâncias tóxicas. Matubayasi, afirma que manteve os oocistos para esporulação em solução de ácido crômico a 0,5%. Talvez essa condição não tenha sido suficiente para impedir o crescimento de bactérias. Hoje, em diretrizes mais atualizadas como em Duszynski e Wilber (1997) e Berto et al. (2014), sabe-se que a solução/concentração ideal para o processamento de oocistos é em dicromato de potássio a 2,5%. Em outro exemplo, Yakimoff e Matikaschwili (1933) também já tinham observado oocistos octazóicos

aesporocísticos em fezes de guaxinins ussurianos *Procyon lotor* Linnaeus, 1758, mas como resultado de uma esporulação anômala de *Cystoisospora rivolta* (Grassi, 1879) Frenkel, 1977.

Tyzzeria typhlopsi, a última espécie de serpentes, possui uma descrição limitada. Os autores apenas a caracterizam morfológicamente e morfometricamente, sem, contudo, compararem-na com as demais espécies e justificar sua distinção. Foi descrita com base apenas em oocistos, sem observação de desenvolvimento endógeno; além disso, foi descrita sem corpo residual, uma característica incomum no gênero, haja vista que todas as outras espécies o possuem. Há de se ressaltar que essa espécie foi descrita concomitantemente com *Eimeria typhlopsi* Ovezmukhamedov, 1968. No artigo de descrição, também é reportada a ocorrência de *Eimeria mirabilis* Jakimoff, 1936 e *Isoospora varani* Yakimoff, 1938. É possível notar que, especialmente, *E. typhlopsi* e *T. typhlopsi* possuem dados morfométricos bastante próximos: 27,2–28,9 x 19,4–19,9 µm e 31,5–32,4 x 18,9–20,7 µm, respectivamente. Além disso, essas espécies foram descritas para a mesma espécie hospedeira, com caracteres morfológicos similares. Ambas espécies são descritas com parede lisa, micrópila e resíduo do oocisto ausentes. Com isso, como apontado por Duszynski et al. (1998), é bem provável que esta seja resultado de uma descrição imprecisa de oocistos degenerados de *E. typhlopsi*, onde os esporocistos se romperam e liberaram os esporozoítos no interior do oocisto, dando o aspecto de um padrão de *Tyzzeria*.

De acordo com Ball et al. (1994), em contraste com os coccídios de aves e mamíferos, as paredes dos esporocistos de muitos eimerídeos reptilianos tendem a colapsar ou dividir-se mais facilmente dentro do oocisto e isso pode confundir a identificação. Esses autores foram responsáveis por invalidar taxonomicamente *T. chalcides*, outra espécie descrita para répteis, reclassificando-a como *Choleoeimeria chalcides* (Probert, Roberts, & Wilson, 1988). Segundo eles, a ruptura dos esporocistos de *C. chalcides* ocorre em 10 dias após a esporulação. Este fenômeno já foi observado por outros pesquisadores para outras espécies, como Upton e Barnard (1987) em *E. brygooi* Upton & Barnard, 1987 de *Phelsuma grandis* Gray, 1870, e Paperna e Landsberg (1989) em *Acroeimeria lineri* McAllister, Upton & Fried, 1988 e *Choleoeimeria turcicus* McAllister, Upton & Fried, 1988, ambas de *Hemidactylus turcicus* (Linnaeus, 1758). Ou seja, em síntese, diante de tudo que foi apresentado, deve-se aventar a possibilidade de que todas as espécies de *Tyzzeria* descritas para répteis sejam descrições inválidas, ou se portando como casos de pseudoparasitismo ou esporulações alteradas de outros coccídios.

Em *T. peromysci*, a única relatada para mamíferos, Levine e Ivens (1960) descreveram essa espécie em roedores, por meio de oocistos obtidos do conteúdo do cólon e do ceco que foram coletados durante a necropsia; contudo os autores afirmam que não foram encontrados estágios endógenos nos intestinos de dois roedores examinados. Eles diferiram-na das demais espécies por não possuir um resíduo de oocisto proeminente, ter oocistos mais elipsoidais e ser encontrada num mamífero, o que segundo eles, justificaria o estabelecimento de uma nova espécie. Contudo, é curioso perceber que no próprio artigo, Levine e Ivens, diante da ausência de estágios endógenos observados, argumentam que pesquisas futuras poderiam revelar a real situação dessa espécie: “É incerto se isto significa que estavam presentes poucos parasitos para serem encontrados, que eles ocorrem em algum outro local ou que talvez sejam na verdade parasitos de algum invertebrado que os camundongos comeram.” (LEVINE; IVENS, 1960, p. 210).

Para Duszynski et al. (1998), é mais provável que este seja um caso de pseudoparasitismo que acabou por resultar numa descrição equivocada desta espécie. Roedores são animais onívoros e oportunistas com uma dieta bastante diversificada. Já existem diversos trabalhos na literatura que retratam casos de pseudoparasitismo nesses animais, como Trefancová et al. (2019) que registraram oocistos de *Isospora* sp. em fezes de *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780). Conforme explicado por Berto et al. (2010), casos de pseudoparasitismo são muito mais comuns do que imaginamos, principalmente, tratando-se de protococcídios, tendo em vista que coccídios de invertebrados usam do artifício da predação de invertebrados por vertebrados para assegurarem sua dispersão ambiental e manutenção do ciclo. Uma vez predados, esses invertebrados se desintegram no trato gastrointestinal de seus predadores e seus coccídios passam ilesos sem se excistarem, sendo eliminados nas fezes de um predador vertebrado que apresenta uma capacidade maior de deslocamento. Como inúmeros invertebrados se alimentam de resíduos fecais de animais vertebrados, esses oocistos são então ingeridos por seus hospedeiros verdadeiros. Porém, essa dinâmica ecológica pode acontecer com qualquer hospedeiro que venha a ingerir acidentalmente fezes ou resíduos contaminados com oocistos de outros hospedeiros, acontecendo também com coccídios de vertebrados. Dessa forma, é imprescindível entender essa dinâmica ecológica para se evitar descrições equivocadas. Além disso, pelo fato de roedores serem o grupo hospedeiro mais investigado para coccídios (TENTER et al. 2002), é surpreendente que essa espécie nunca mais tenha sido avistada. Nesse sentido, Duszynski et al. (1998) até sugerem que os oocistos observados, pela semelhança morfológica, seriam do gênero *Pfeifferinella*.

Das espécies aviárias, *T. galli* é a única descrita fora da ordem Anseriformes. Essa espécie foi descrita numa espécie de galiforme silvestre, apenas pela caracterização morfológica/morfométrica de seus oocistos. Vale frisar que em seu artigo original, Fernando e Remmler (1973) relataram problemas com a esporulação dos oocistos. Quatro aves foram examinadas, onde três delas estavam positivas. Porém, os oocistos de uma delas não esporularam completamente, segundo os autores, provavelmente devido ao tempo que se decorreu entre o abate e a entrega do material no laboratório. Somente, as duas últimas aves analisadas tiveram oocistos esporulados, mas ainda assim com uma minoria não esporulada. Nesse trabalho, além da descrição de *T. galli*, são descritas simultaneamente outras quatro espécies de *Eimeria*. Uma dessas espécies, apresentou valores morfométricos relativamente próximos de *T. galli*. Enquanto *T. galli* apresentou 13,8 µm (12–15), *Eimeria lafayettei* Fernando & Remmler, 1973 apresentou 19,5 µm (19–21) X 14,2 µm (13,5–15). Apesar a discrepância de 6 pontos entre o tamanho médio de *T. galli* com a média do diâmetro maior de *E. lafayettei*, os valores de amplitude do diâmetro menor dessa espécie, convergem com os valores de *T. galli*. Assim, seus oocistos poderiam ser oocistos de *E. lafayettei* resultantes de uma esporulação atípica, sem a formação dos esporocistos, e visualizados somente na posição transversal, sem evidenciar seu diâmetro maior. Além disso, mesmo que seus oocistos tenham sido analisados na sua completude, existem muitos casos em que o polimorfismo de uma espécie pode variar em até mais que 5 µm entre os valores dos diâmetros, como foi exemplificado no tópico 6.3. Outro ponto a ser levantado é o de que os autores também fizeram infecções experimentais em galinhas domésticas com oocistos de obtidos. Segundo eles, oocistos de ambas espécies, no entanto, não eram transmissíveis às galinhas domésticas, enquanto outras *Eimeria* spp. encontradas foram. “Após várias tentativas de infecção experimental com as 5 espécies descritas nesse trabalho, somente *E. lafayettei* e *T. galli* falharam”. (FERNANDO; REMMLER, 1973, p. 44). Isso reforça ainda mais a suspeita sobre a validade da espécie.

Como já mencionado, para muitos autores, somente as somente as 5 espécies descritas em Anseriformes podem ser consideradas válidas (DUSZYNSKI et al., 1998; GHIMIRE, 2010; BERTO et al., 2022). Acompanhando esse raciocínio, as espécies de fato aceitáveis seriam: *T. allena*; *T. chenicusae*; *T. parvula*; *T. pellerdyi* e *T. pernicioso*. Entretanto, mesmo se nos atermos apenas a elas, essa diversidade me parece ainda superestimada.

No trabalho de Allen (1936), para confirmar o parasitismo observado, patos juvenis (com 6 semanas de idade) e livres para coccídios foram infectados experimentalmente por via

oral com oocistos esporulados obtidos da ave necropsiada. Os patos desenvolveram coccidiose e eliminaram oocistos do mesmo morfotipo atestado previamente. Para estudar as fases de desenvolvimento desse cromista, outros 15 patos com idades entre 1 a 3 semanas de vida foram alimentados com oocistos esporulados de *T. pernicioso*, com 1 pato sendo sacrificado e necropsiado por dia, em dias sucessivos. Várias porções do intestino delgado foram seccionadas, fixadas e coradas para a realização de exames histopatológicos. Foi constatado inclusive que *T. pernicioso* é uma espécie altamente patogênica provocando severos quadros de morbidade e até mesmo mortalidade. As camadas da mucosa e submucosa, da moela até o ceco, foram invadidas pelos esporozoítos. Lesões foram observadas em todo intestino delgado, principalmente na porção superior e o lúmen fica repleto de sangue e exsudato caseoso (ALLEN, 1936; GAJADHAR et al., 1983). Isso garante que *T. pernicioso* é indubitavelmente uma espécie válida, rechaçando qualquer suspeita de pseudoparasitismo. Além disso, após sua descrição, diversos outros pesquisadores já relataram-na parasitando patos em várias partes do mundo.

Antes da validação de *T. parvula*, o nome específico correto para *Tyzzeria* de gansos foi discutido por Levine (1952) e Farr e Wehr (1952). Naquela época, apenas três espécies de *Tyzzeria* tinham sido nomeadas a partir de aves. A espécie-tipo, *T. pernicioso* em *A. p. domesticus* (1); *T. allenae* em *N. coromandelianus* (2); e *T. anseris* em *A. anser* (3). Segundo os autores, uma vez que os oocistos de ambas espécies eram morfológicamente semelhantes, a prova da sua distinção específica deveria depender das diferenças nos seus estágios parasitários intracelulares ou na sua especificidade de hospedeiro. No entanto, nenhum estudo tinha sido feito sobre os estágios intracelulares de *T. allenae* ou *T. anseris*, enquanto os únicos estudos de transmissão cruzada eram os de Nieschulz (1947), que não conseguiu infectar um pato com oocistos esporulados de *T. anseris*, e o de Farr (1952), que infectou *A. anser* com *Tyzzeria* sp. de *B. canadensis*. Sendo assim, os autores apontaram que mais estudos de transmissão cruzada seriam necessários para determinar se *T. allenae* e *T. anseris* eram ou não sinônimos de *T. pernicioso* (HANSON et al., 1957). Farr (1965) reendossou essa percepção ao afirmar que a diferença de tamanho entre os oocistos não era um critério seguro para distinguir as espécies de *Tyzzeria* de Anseriformes.

Mais tarde, Klimeš veio a unificar *T. anseris* com *T. parvula*, dando validade nomenclatural a esta última. Os trabalhos de Kotlán (1933) e Klimeš (1963) se basearam tanto na caracterização das formas exógenas (oocistos) como das endógenas estipulando o ciclo intravital de *T. parvula* através de infecções experimentais. Klimeš (1963), assim como

Nieschulz (1947), ainda fez testes de susceptibilidade com infecção experimental em patos para garantir a validade de *T. parvula* como sendo uma espécie distinta de *T. pernicioso*, tendo uma especificidade parasitária à parte, descartando assim qualquer ambiguidade na identificação. Posteriormente, outros trabalhos, como o de Svanbaev e Rakhmatullina (1967) e Berto (2008), vieram a corroborar essas conclusões de especificidade ao demonstrarem que esse coccídio não era transmissível de gansos para patos, sendo assim, restritos à nível de subfamília dos hospedeiros anatídeos. Dessa forma, ambas as espécies, estão fundamentadas de maneira robusta na literatura, com *T. parvula* sendo específica de gansos e cisnes (subfamília Anserinae) e *T. pernicioso* específica de patos e marrecos (subfamília Anatinae). Por outro lado, conforme aponta Gajadhar et al. (1983), o ciclo de vida das demais *Tyzzeria* spp. de anatídeos permanece desconhecido. Cabe salientar que, a exemplo de *T. pernicioso*, esta espécie também já foi amplamente observada por outros autores, não deixando dúvidas sobre sua existência.

Tyzzeria allenae não teve seu desenvolvimento endógeno descrito e Chakravarty e Basu (1946) diferenciaram-na de *T. pernicioso* sem oferecer maiores detalhes, com base apenas no tamanho e formato de seus oocistos, e na estruturação e disposição dos esporozoítos. Além disso, esses oocistos foram recuperados de um único hospedeiro, mas a quantidade de oocistos avaliados não foi informada. *Tyzzeria chenicusae* foi outra espécie descrita com carência de detalhes. Sua descrição foi demasiadamente concisa e detalhes morfológicos não foram destrinchados para sua diferenciação das espécies congêneres, tampouco, fez-se uso de um desenho de linha apresentando a morfologia da nova espécie. Sua distinção se deu apenas pelas diferenças morfométricas e tempo de esporulação dos oocistos com as outras espécies. Ray e Sarkar (1967) afirmaram que inocularam oralmente oocistos maduros desse coccídio em *A. platyrhynchos* e *N. coromandelianus*, mas que somente este último desenvolveu infecção. Válidas ou não, como *T. allenae* e *T. chenicusae* foram descritas na Índia para a mesma espécie hospedeira; e não foram distinguidas em detalhes, é possível inclusive, que sejam a mesma espécie.

Na descrição de *T. pellerdyi*, Bhatia e Pande (1966) também não detectaram nenhum estágio endógeno no intestino dos anatídeos *M. strepera* e *A. nyroca*, distinguindo-a das outras espécies aviárias pelo tamanho dos oocistos/esporozoítos, conformação interna dos esporozoítos e resíduo do oocisto; e das outras espécies que ocorriam em roedores e serpentes por parasitarem outras classes de vertebrados. No artigo original, os autores ressaltam dificuldade de diferenciar as espécies de *Tyzzeria* morfológicamente e que trabalhos futuros com experimentos de infecção cruzada nos diferentes grupos de hospedeiros poderiam validar

ou rechaçar a validade das espécies. É bem verdade que, posteriormente, Bristol et al. (1981) relataram vários outros hospedeiros para *T. pellerdyi*. Eles diferenciaram essa espécie de *T. pernicioso* justificando que seus oocistos apresentavam tamanhos e tempo de esporulação maiores. Também fizeram testes de transmissão cruzada com os oocistos obtidos dos patos selvagens em patos domésticos (*A. p. domesticus*) e obtiveram resultado negativo:

O tamanho médio dos oocistos de *T. pernicioso* é 9,5 x 11,6 um e a esporulação se dá em 24 horas. Os oocistos recuperados por nós medem 10 x 13 um, sendo idênticos em dimensões aos oocistos de *T. pellerdyi* recuperados na Índia. Além disso, o tempo de esporulação de 72 horas e a falha dos oocistos deste estudo em se estabelecerem em patos domésticos tendem a descartar a possibilidade de serem *T. pernicioso*. (BRISTOL et al., 1981, p. 276).

Mas isso é inconsistente, especialmente se nos atentarmos a esta última afirmação, uma vez que eles próprios relataram *A. platyrhynchos* (o hospedeiro tipo de *T. pernicioso*) como um novo hospedeiro para *T. pellerdyi*. Além do mais, há vários fatores que podem influenciar no tempo de esporulação e no polimorfismo conforme debatido nos tópicos 6.3, 6.4. A constatação de diferenças morfométricas entre os oocistos que ocorreram em patos na sua variedade selvagem de patos na sua variedade doméstica (*A. platyrhynchos* x *A. platyrhynchos domesticus*) mas ainda configurando uma mesma espécie hospedeira, parece não ter significância suficiente para diferenciá-la em outra espécie (como se *T. pernicioso* fosse restrita a hospedeiros domésticos). Assegurar isso, sem que estudos mais estudos aprofundados comprovem tal suposição é temerário, até porque, essa ocorrência em dois grupos de hospedeiros diferentes, pode, inclusive, justificar a variações morfométricas e eventuais polimorfismos observados.

Diante dos fatos apresentados, seguramente *T. allena*, *T. chenicusae* e *T. pellerdyi* precisam ser revistas. Como esse gênero não possui uma riqueza de caracteres morfológicos como os demais eimerídeos, diferenças no tamanho e no tempo de esporulação dos oocistos não configuram evidências claras para a separação de espécies. Todas essas foram descritas a partir de hospedeiros anatíneos, portanto, é muito provável que sejam todas sinônimas de *T. pernicioso*. Entretanto para confirmar ou descartar esta hipótese, seria necessário recuperar oocistos característicos de cada uma dessas espécies, preferencialmente na mesma localidade-tipo e do hospedeiro-tipo, comparando rigorosamente aspectos morfométricos e morfológicos, realizando testes de susceptibilidade e descrições de seus estágios endógenos, aliados a

ferramentas contemporâneas como a biologia molecular para elucidar o posicionamento filogenético de cada uma das espécies. Não é impossível que todas as espécies de *Tyzzeria* sejam de fato espécies diferentes. Existem diversos grupos de coccídios, como os sarcocistídeos ou mesmo *Cryptosporidium* que carecem de chaves dicotômicas para identificações morfológicas, mas que ainda assim contam com muitas espécies descritas, relatadas para hospedeiros diversos, mas nesse caso, essas descrições estão firmemente amparadas por dados moleculares e biológicos (e.g. especificidade parasitária, desenvolvimento endógeno, sítio de infecção e patogenicidade).

Em face de tudo que foi apresentado sobre a diversidade coccidiana no tópico 3.1.2, soa um tanto quanto contraditório reduzir a diversidade do gênero de dez espécies para apenas duas. Mas é importante lembrar que, nesse sentido, não há uma correlação de linearidade. O gênero *Toxoplasma* tem como diversidade uma única espécie, mas que é capaz de parasitar, praticamente, todas as aves e mamíferos. Em contrapartida, o gênero *Eimeria* possui uma diversidade altíssima, mas com espécies mais especializadas a um grupo específico de hospedeiro. Além disso, para alguns grupos de hospedeiros existem naturalmente menos espécies descritas em comparação a outros. Por exemplo, para bovinos existem 12 *Eimeria* spp. descritas, enquanto que para equinos o número de *Eimeria* spp. é de apenas 3. Galinhas domésticas dispõem de 7 espécies válidas de *Eimeria*, já em galinhas d'Angola esse número cai para somente 2 (TAYLOR et al. 2017; ORTÚZAR-FERREIRA et al., 2024b). E notem que esses exemplos são calcados em animais domésticos, amplamente mais estudados desde o estabelecimento da parasitologia, por conseguinte, onde o risco de sub amostragem é menor. A verdade é que para hospedeiros silvestres, isso é bem diferente, muito pouco se sabe ainda.

O desconhecimento sobre a biologia de muitos grupos coccidianos, bem como, dos aspectos ecológicos e comportamentais de seus hospedeiros, já levou a descrições equivocadas não apenas de novas espécies, mas até mesmo de novos gêneros (DUSZINSKI et al., 2000; BERTO et al. 2010). De acordo com Berto et al. (2010), oocistos poliesporocísticos encontrados em fezes de vertebrados, já fundamentaram muitas descrições errôneas de novos gêneros, como *Pythonella* Ray & Das Gupta, 1937, *Octosporella* Ray & Raghavachari, 1942, *Skrjabinella* Matschoulsky, 1949, *Hoarella* Arcay de Peraza, 1963, *Sivatoshella* Ray & Sarkar, 1968, *Gousseffia* Levine, 1980 e *Polysporella* McQuiston, 1990. Na verdade, todos esses representam casos de pseudoparasitismo, pois seus oocistos eram de coccídios de invertebrados, como *Adelina* Hesse, 1911 e *Barroussia*, cujas descrições se mostraram equivocadas; e, portanto, inválidas. Duszynski et al. (2000b) até estipulou a categorização *Genera of dubius*

validity (gêneros de validade duvidosa) para se referir a esses casos. Segundo este mesmo autor, acredita-se que 25% dos gêneros coccidianos descritos em Eimeriidae sejam, na verdade, situações mal interpretadas de pseudoparasitismo. Ele ainda aponta que para alguns gêneros válidos, mais da metade das espécies possam estar erradas. Esse pode ser o caso de muitas das espécies de *Tyzzeria*; porém, para invalidá-las é fundamental que publicações científicas sejam feitas nesse sentido, como o trabalho de Ball et al. (1994) que invalidou *T. chalcides*. Esse trabalho é importante porque mostra que mesmo uma espécie tendo sua caracterização endógena e exógena realizada (que foi o caso da descrição original de *T. chalcides*), ainda assim, pode-se tratar de uma descrição incorreta. Enquanto trabalhos como esse não são feitos para as demais *Tyzzeria* spp., propõe-se aqui que todas as espécies, com exceção de *T. parvula* e *T. perniciosa*, sejam tratadas sob a denominação de “*species inquirendae*”.

Se comparamos as descrições feitas para o gênero *Schellackia*, o levantamento da diversidade desse gênero se deu de maneira muita mais presunçosa e cauteloso. Como poucas características poderiam ser descritas a partir de esporozoítos sanguíneos (a maioria delas restritas aos estágios endógenos do parasito dentro do epitélio intestinal do hospedeiro), isso levou a relativamente poucas espécies descritas para o gênero, que se supunha ser muito difundido geograficamente. Apenas recentemente, os métodos de caracterização molecular permitiram uma determinação mais precisa da identidade das espécies e sua relação filogenética (MEGÍIA-PALMA, 2016). Porém diferentemente deste, *Tyzzeria* teve todas suas espécies descritas sem dados genéticos; agora isso se faz necessário para reconhecer a real validade das mesmas.

Perante os dados levantados nos tópicos 3.2.5.1 e 3.2.5.5, é plausível que tanto *T. perniciosa* como *T. parvula* tenham uma distribuição cosmopolita. *Tyzzeria parvula* já foi registrada em várias partes dos continentes europeu, asiático e americano. *Tyzzeria perniciosa* segue esse padrão, sendo reportada inclusive na Oceania. A ampla distribuição de anatídeos por todo globo é algo que explicaria facilmente a distribuição cosmopolita desses coccídios. Esse grupo de aves é reconhecido pela sua impressionante capacidade migratória, realizando longos deslocamentos sazonalmente (SICK, 1997). Existem inúmeras espécies de anseríneos e anatíneos (residentes e migratórios) espalhados pelo mundo. As áreas de simpatria formadas entre essas diferentes espécies hospedeiras, virtualmente envolvem todas as áreas terrestres (CARBONERAS, 1992; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2024), o que garantiria tal dispersão. Além do mais, variedades domésticas de gansos e patos já se encontram espalhadas pelo mundo inteiro, introduzidos pela ação humana (KEAR, 2005), conseqüentemente anulando qualquer

possibilidade de limitação geográfica para a distribuição de seus coccídios. Portanto, diante de tudo que foi apresentado aqui, se formos rigorosamente parcimoniosos, podemos classificar como espécies válidas atualmente apenas *T. parvula* e *T. perniciosa*, com as outras espécies carecendo de maiores investigações. A verdade é que pouco se sabe sobre este gênero ainda, com a necessidade de estudos mais aprofundados serem feitos.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, após minuciosas análises, pôde-se concluir que:

- Dos 4 morfotipos caracterizados, considerando o número amostral de oocistos analisados, parâmetros morfológicos/morfométricos, sequenciamentos realizados e aspectos de especificidade parasitária no hospedeiro, apenas o morfotipo 1 foi especificamente identificado como *T. parvula*;

- Através do sequenciamento genético de *T. parvula*, o gênero *Tyzzeria* Allen, 1936 tem sua primeira caracterização molecular registrada, colocando esse grupo filogeneticamente próximo ao gênero *Schellackia* Reichenow, 1919 e outros eimerídeos de anfíbios;

- Há um polimorfismo intrínseco às espécies de *Tyzzeria*, portanto, isso não pode ser desconsiderado taxonomicamente; e se guiar pautando apenas os parâmetros morfométricos para a identificação ou descrição de novas espécies seria imprudente;

- Mais estudos, preferencialmente conduzidos com auxílio da biologia molecular, devem ser realizados para confirmar se os morfotipos 2, 3 e 4 correspondem ou não a uma única espécie.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, D.A. Coccidiosis in domesticated ducks in Ninevah governorate. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 24, n. 2, p. 149-153, 2010.

ABEBE, E.; GUGSA, G. A review on poultry coccidiosis. **Abyssinia Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2018.

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; McCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W.; TAYLOR, M.F.J.R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.

ADL, S.M.; BASS, D.; LANE, C.E.; LUKEŠ, J.; SCHOCH, C.L.; SMIRNOV, A.; AGATHA, S.; BERNEY, C.; BROWN, M.W.; BURKI, F.; CÁRDENAS, P.; ČEPIČKA, I.; CHISTYAKOVA, L.; CAMPO, J.D.; DUNTHORN, M.; EDVARDBSEN, B.; EGLIT, Y.; GUILLOU, L.; HAMPL, V.; HEISS, A.A.; HOPPENRATH, M.; JAMES, T.Y.; KARNKOWSKA, A.; KARPOV, S.; KIM, E.; KOLISKO, M.; KUDRYAVTSEV, A.; LAHR, D.J.G.; LARA, E.; GALL, L.L.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; MASSANA, R.; MITCHELL, E.A.D.; MORROW, C.; PARK, J.S.; PAWLOWSKI, J.W.; POWELL, M.J.; RICHTER, D.J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SHIMANO, S.; SPIEGEL, F.W.; TORRUELLA, G.; YOUSSEF, N.; ZLATOGURSKY, V.; ZHANG, Q. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, 4-119, 2019.

ALDEYARBI, H.M.; KARANIS, P. The fine structure of sexual stage development and sporogony of *Cryptosporidium parvum* in cell-free culture. **Parasitology**, v. 143, p. 749-761, 2016.

ALLEN, E.A. *Tyzzeria pernicioso* gen. et sp. nov., a coccidium from the small intestine of Pekin Duck, *Anas domestica* L. **Archiv für Protistenkunde**, v. 87, p. 262-267, 1936.

ALLEN, P.C.; FETTERER, R.H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 58-65, 2002.

AMORIM, D.S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. 1. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2002. 156p.

ARSLAN, M.O.; GICIK, Y.; ÖZCAN, K. The Frequency of Eimeriidae Species in the Domestic Geese in Kars Province of Turkey. **Acta Protozoologica**, v. 41, p. 353-357, 2002.

ARNAOUDOV, D. Epizootiological features of coccidiosis in geese. (In Bulgarian) **Veterinarno-meditsinski Nauki**, v. 6, p. 65-71, 1969.

ARNASTAUSKIENE, T. On the domestic geese coccidia in the Lithuanian SSR. (In Russian) **Acta Parasitologica Lituanica**, v. 7, p. 5-13, 1967.

ASIMOV, I. **Breve historia de la Biología**. Buenos Aires: Editorial Universitaria Eudeba, 1966, 247p.

BAKER, J.R. The evolution of parasitic protozoa. **In: TAYLOR, A.E.R. Evolution of parasites**. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1965. p. 1-27.

BALL, S.J.; DASZAK, P.; PROBERT, A.J. Nomenclatural correction – *Eimeria chalcides* (Probert, Roberts & Wilson, 1988) n. comb. for *Tyzzeria chalcides* (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, v. 29, p. 75-77, 1994.

BALL, S.J.; DASZAK, P. Description of the oocysts of three new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from geckoes (Sauria: Gekkonidae). **Systematic Parasitology**, v. 32, p. 101-106, 1995.

BANDONI, S.M.; DUSZYNSKI, D.W. A plea for improved presentation of type material for coccidia. Invited Critical Comment. **The Journal of Parasitology**. 74, n. 4, p. 519-523, 1988.

BARTA, J.R. Phylogenetic Analysis of the Class Sporozoa (Phylum Apicomplexa Levine, 1970): Evidence for the Independent Evolution of Heteroxenous Life Cycles. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 195-206, 1989.

BARTA, J.R.; MARTIN, D.S.; LIBERATOR, P.A.; DASHKEVICZ, M.; ANDERSON, J.W.; FEIGNER, S.D.; ELBRECHT, A.; PERKINS-BARROW, A.; JENKINST, M.C.; DANFORTH, H.D.; RUFFT, M.D.; PROFOUS-JUCHELKA, H. Phylogenetic relationships

among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. **The Journal of Protozoology**, v. 83, p. 262-271, 1997.

BARTA, J.R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 175-186, 2001.

BARTA, J.R.; MARTIN, D.S.; CARRENO, R.A.; SIDDALL, M.E.; PROFOUS-JUCHELKAT, H.; HOZZA, M.; POWLES, M.A.; SUNDERMANN, C. Molecular phylogeny of the other tissue coccidia: *Lankesterella* and *Caryospora*. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 121-127, 2001.

BARTA, J.R.; SCHRENZEL, M.D.; CARRENO, R.; RIDEOUT, B.A. The Genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a Junior Objective Synonym of the Genus *Isospora* (Schneider 1881) Species Infecting Birds and Resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the Correct Genus for *Isospora* Species Infecting Mammals. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 726-727, 2005.

BARTA, J.R.; THOMPSON, R.C.A. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 463-468, 2006.

BARTA, J.R.; OGEDENGBE, J.D.; MARTIN, D.S.; SMITH, T.G. Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171-180, 2012.

BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ, P.; OPPENHEIM, R.D.; SOLDATI-FAYRE, D.; LUKEŠ, J. Epicellular Apicomplexans: Parasites “On the Way In”. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 9, p. e1005080, 2015.

BECK, H.P.; BLAKE, D.; DARDÉ, M.L.; FELGER, I.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M.; PUTIGNANI, L.; SHIELS, B.; TAIT, A.; WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 175-189, 2009.

BELLI, S.I.; SMITH, N.C.; FERGUSON, D.J.P. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 416-423, 2006.

BERTO, B.P.; TEIXEIRA, M.; LOPES, C.W.G. *Tyzzeria parvula* (Kotlan, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) in the greylag goose (*Anser anser* Linnaeus, 1758) in Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 156-158, 2007.

BERTO, B.P.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. First report of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae), in swan goose *Anser cygnoides* L., 1758, in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 326-328, 2008.

BERTO, B.P.; FLAUSINO, W.; ALMEIDA, C.R.R.; LOPES, C.W.G. Polymorphism of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) oocysts from the greylag geese *Anser anser* L., 1758 from two distinct sites. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 30, n. 4, p. 215-219, 2008b.

BERTO, B.P. **Caracterização dos oocistos de *Tyzzeria parvula* (Kótlán, 1933) Klimes, 1963 (Apicomplexa: Eimeriidae) do ganso doméstico (*Anser anser*) no Brasil**. Dissertação. UFRRJ: Seropédica-RJ. 2008.

BERTO, B.P.; BALTHAZAR, L.M.C.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Three new species of *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the buffy-fronted seedeater *Sporophila frontalis* Verreaux, 1869 (Passeriformes: Emberizidae) from South America. **Systematic Parasitology**, v. 73, p. 65-69, 2009.

BERTO, B.P. **Morfologia e sistemática de coccídios (Apicomplexa: Eimeriidae) parasitas de aves Passeriformes da Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil**. Tese. UFRRJ: Seropédica-RJ. 2010.

BERTO, B.P.; LOPES, B.B.; TEIXEIRA-FILHO, W.L.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. Coccídios de invertebrados associados ao hábito alimentar de vertebrados: uma revisão breve dos gêneros *Adelea*, *Adelina* e *Barroussia*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. 1, p. 33-41, 2010.

BERTO, B.P.; LOPES, C.W.G. Distribution and dispersion of coccidia in wild passerines of the Americas. In: RUIZ, L.; IGLESIAS, L. ed. **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, 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. **The Journal of Parasitology**, v. 106, p. 707-713, 2020.

BERTO, B.P.; BRICE, B.; THOMAS, G.; ELLOIT, A.; ZAHEDI, A.; YANG, R. *Eimeria* spp. and *Tyzzeria pernicioso* Allen, 1936 (Apicomplexa: Eimeriidae) from a Pacific black duck, *Anas superciliosa* Gmelin (Aves: Anseriformes), in western Australia. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 2, n. 100075, p. 1-11, 2022.

BERTO, B.P.; MACHADO, E.L.; HOSSOTANI, C.M.S.; BERETTA, B.M.S.; SILVA, D.R.R.; NAKAMURA, A.A.; MEIRELES, MV. Integrative taxonomy for the traditional coccidians (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from island canaries (Aves: Passeriformes: Fringillidae): Worldwide distribution, morphological and molecular characterization, revaluations and establishment of junior synonyms. **Systematic Parasitology**, v. 100, p. 245-259, 2023.

BHATIA, B.B.; PANDE, B.P. On two species of coccidia from wild Anatidae. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 16, n. 3, p. 335-340, 1966.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Anatidae – Data Zone**. Disponível em: <<https://datazone.birdlife.org/quicksearch?qs=Anatidae>>. Acesso em: 29 jul. 2024.

BOWMAN, D.D. **Georgis Parasitologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2010. 448p.

BRANDS, S.J. **Taxon: Genus Tyzzeria Allen, 1936. In Systema Naturae 2000. The Taxonomicon**, 01 fev. 2024. Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=129218&src=0>>. Acesso em: 20 jun. 2024.

BRISTOL, J.R.; MAYBERRY, L.F.; BUENO, R.; CANARIS, A.G. Coccidia of surface-feeding ducks from the central flyway, Texas. **The Journal of Parasitology**, v. 67, p. 276-277, 1981.

BRISTOVETZKY, M.; PAPERNA, I. Life cycle and transmission of *Schellackia cf. agamae*, a parasite of the starred lizard *Agama stellio*. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 883-892, 1990.

- BROOKS, D.R. Testing the context and extent of host-parasite coevolution. **Systematic Zoology**, v. 28, p. 299-307, 1979.
- BROWN, M.A.; BALL, S.J.; SNOW, K.R. Coccidian parasites of British wild birds, **Journal of Natural History**, v. 44, n. 43-44, p. 2669-2691, 2010.
- BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.
- BÜTSCHLI, O. (1882). Sporozoa. In: BRONN, H.G. ed. **Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs: wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild**. Leipzig: C.F. Winter, 1882. 1, Abt. 1.
- CARBONERAS, C. Family Anatidae (Ducks, Geese and Swans). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. ed. **Handbook of Birds of the World (VOLUME 1: Ostrich to Ducks)**. Barcelona: Lynx Edicions, 1992. p. 536-629.
- CARLSON, C.J.; DALLAS, T.A.; ALEXANDER L.W.; PHELAN, A.L.; PHILLIPS, A.J. What would it take to describe the global diversity of parasites? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, p. 20201841. 2020.
- CARRENO, R.A.; MARTIN, D.S.; BARTA, J.R. *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitology Research**, v. 85, p. 899-904, 1999.
- CASAS, M.C.; DUSZYNSKI, D.W.; ZALLES, L.M. Three new Eimerians in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) populations from eastern Bolivia and southern Venezuela. **The Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 247-251, 1995.
- CAVALIER-SMITH, T. Membrane heredity and early chloroplast evolution. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 4, p. 174-182, 2000.
- CAVALIER-SMITH, T.; CHAO, E.E. Protalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.), **European Journal of Protistology**, v. 40, n. 3, p. 185-212, 2004.
- CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-345, 2010.

- CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. **Protoplasma**, v. 255, p. 297-357, 2018.
- ČERNÁ, Z. Příspěvek k poznání husích kokcií. Věstník ěsl. **Zoologické společnosti**, v. 20, p. 366-371, 1956.
- CHAGAS, C.R.F.; HARL, J.; PREIKŠA, V.; BUKAUSKAITÈ, D.; ILGŪNAS, M.; WEISSENBOCK, H.; VALKŪNAS, G. *Lankesterella* (Apicomplexa, Lankesterellidae) Blood Parasites of Passeriform Birds: Prevalence, Molecular and Morphological Characterization, with Notes on Sporozoite Persistence In Vivo and Development In Vitro. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1451, 2021.
- CHAKRAVARTY, M.; BASU, S.P. On a new coccidium *Tyzzeria alleni* n. sp. from the intestine of the bird cotton-teal. **Science and Culture**, v. 12, n. 2, p. 106, 1946.
- CHAUVE, C.M. Contribution a l'etude des coccidies de l'oie dans la region du sud-ouest de la France. Proposition d'une cle de diagnose des differentes especes, basee sur la morphologie de l'ookyste sporule. **Avian Pathology**, v. 17, p. 433-440, 1988.
- CHAUVE, C.M.; GOUNEL, J.M.; REYNAUD, M.C. Les coccidies du canard mulard. Bilan d'une premiere enquete realisee dans trois elevages du sud-ouest de la France. **Avian Pathology**, v. 20, p. 713-719, 1991.
- CHOU, S.; TOKIWA, T.; HADANO, S.; IZAWA, N.; UEDA, M.; KOJIMA, A.; IKE, K. Resurrection of the genus *Eumonospora* (Apicomplexa: Sarcocystidae) for *Caryospora* species without Stieda body. **Parasitology International**, v. 77, n. 102101, p. 1-8, 2020.
- CHURCHILL, F.B. Introduction: Toward the history of protozoology. **Journal of the History of Biology**, v. 22, p. 185-187, 1989.
- CHRISTOFFERSEN, M.L. Cladistic Taxonomy, Phylogenetic Systematics, and Evolutionary Ranking. **Systematic Biology**, v. 44, n. 3, p. 440-454, 1995.
- CLODE, P.L.; KOH, W.H.; THOMPSON, R.C.A. Life without a Host Cell: What is *Cryptosporidium*? **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 614-624, 2015.
- COSTELLO, M.J. Taxonomy as the key to life. **Megataxa**, v. 001, n. 2, p. 105-113, 2020.

- COX, F.E.G. The evolutionary expansion of the Sporozoa. **International Journal for Parasitology**, v. 24. n. 8, p. 1301-1316, 1994.
- DAI, Y.B.; LIU, M.; TAO, J.P.; LI, W.L.; DING, C.; LIU, X.X. Survey on coccidia of domestic geese and their experimental infections. (in Chinese) **Journal of Xiamen University (Natural Science)**, v. 42, p. 228-233, 2004.
- DANFORTH, H.D.; HAMMOND, D.M. Stages of merogony in multinucleate merozoites of *Eimeria magna* Perard. 1925. **The Journal of Protozoology**, v. 19, p. 454-457, 1972.
- DAVIES, S.F.M. An outbreak of duck coccidiosis in Britain. **Veterinary Record**, v. 69, p. 1051-1052, 1957.
- DESSER, S.S.; WELLER, I. Structure, cytochemistry, and locomotion of *Haemogreganna* sp, from *Rana berlandieri*. **The Journal of Protozoology**, v. 20, p. 65-73, 1973.
- DE VOS, A.J. Studies on the host range of *Eimeria chinchillae* De Vos & Van der Westhuizen, 1968. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 29-36, 1970.
- DOBELL, C. The discovery of the coccidia. **Parasitology**, v. 14, p. 342-348, 1922.
- DOFLEIN, F. **Lehrbuch der Protozoenkunde**. 4 ed. Califórnia: Jena, 1916. 1190p.
- DOLNIK, O. The relative stability of chronic *Isospora sylvianthina* (Protozoa: Apicomplexa) infection in blackcaps (*Sylvia atricapilla*): Evaluation of a simplified method of estimating isosporan infection intensity in passerine birds. **Parasitology Research**, v. 100, p. 155-160, 2006.
- DOLNIK, O.V.; LOONEN, M.J.J.E. First finding of *Tyzzeria parvula* (Kotlán, 1933) Klimes, 1963 (Protozoa: Coccidiida) in Barnacle Geese (*Branta leucopsis* Bechstein, 1803) on Spitsbergen. **Zoosystematica Rossica**, v. 15, n. 2, p. 214, 2007.
- DOLNIK, O.V.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S. Individual Oocysts of *Isospora* (Apicomplexa: Coccidia) Parasites from Avian Feces: From Photo to Sequence. **The Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 169-174, 2009.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**, ed. London: Academic Press, 1977. p. 101-237.

- DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Sarcocystosis of animal and man**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1989. 215p.
- DUBEY, J.P. **Coccidiosis in livestock, poultry, companion animals and humans**. 1. ed. New York: CRC Press, 2020. 397p.
- DUSZYNSKI, D.W. Increase in size of *Eimeria separata* during patency. **The Journal of Parasitology**, v. 57, p. 2948-952, 1971.
- DUSZYNSKI, D.W.; WILBER, P.G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 333-336, 1997.
- DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L.; UPTON, S.J. **The Coccidian Genus Tyzzeria. The Coccidia of the World**, 24 ago. 1998. Disponível em: <<https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/TYZZERIA>>. Acesso em: 12 jun. 2024.
- DUSZYNSKI, D.W.; UPTON, S.J.; COUCH, L. The Coccidia of the world: a unified database. **Parasitology International**, v. 47, n. 1, p. 286, 1998b.
- DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L.; UPTON, S.J. **The Coccidia of the World**, 2000. Disponível em: <<http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia>>. Acesso em: 11 mai. 2024.
- DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L.; UPTON, S.J. **Genera (Eimeriidae) of dubious validity**, 04 ago. 2000b. Disponível em: <<https://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/INVALID>>. Acesso em: 5 ago. 2024.
- DUSZYNSKI, D.W.; BOLEK, M.G.; UPTON, S.J. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of amphibians of the world. **Zootaxa**, v. 1667, p. 1-77, 2007.
- DUSZYNSKI, D.W. Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. **Folia Parasitologica**, v. 68, n. 001, p. 1-18, 2021.
- ELLIS, J.T.; MORRISON, D.A.; LIDDELL, S.; JENKINS, M.C.; MAOMÉ, O.B.; RYCE, C.; DUBEY, J.P. The genus *Hammondia* is paraphyletic. **Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 357-362, 1999
- ESCALANTE, A.A.; AYALA, F.J. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on ribosomal-RNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 5793-5797, 1995.

- FAN, G.X.; DI, B.X. Observations on pathomorphology of experimental coccidiosis in ducklings. In: **Waterfowl production, Proceedings of the International Symposium**. Beijing, China: Oxford, UK, Pergamon Press. 1988. p. 407-408.
- FARR, M.M. *Tyzzeria* sp. from wild geese and a wild duck. **The Journal of Parasitology**, v. 38, n. 15, 1952.
- FARR, M.M.; WEHR, E.E. *Eimeria truncata* associated with morbidity and death of domestic goslings. **The Cornell Veterinarian**, v. 42, n. 2, p. 185-187, 1952.
- FARR, M.M. Coccidiosis of the lesser Scaup duck, *Aythya affinis* (Eyton, 1838) with a description of a new species, *Eimeria aythya*. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 32, p. 236-238, 1965.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infection: the Coccidia. **Veterinary Parasitology**, v. 6, p. 75-103, 1980.
- FERGUSON, D.J.P.; BIRCH-ANDERSEN, A.; HUTCHISON, W.M.; SIIM, J.C. Ultrastructural observations showing enteric multiplication of *Cystoisospora (Isospora) felis* by endodyogeny. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 63, p. 289-291, 1980.
- FERNANDO, M.A.; REMMLER, O. Four new species of *Eimeria* and one of *Tyzzeria* from the Ceylon jungle fowl *Gallus lafayettei*. **Journal of Protozoology**, v. 20, p. 43-45, 1973.
- FITZGERALD, P.R.; MANSFIELD, M.E. Attempted infections of Dexamethasone-treated lambs with *Eimeria stiedai* from rabbits. **The Journal of Protozoology**, v. 18, n. 12, 1972.
- FOURNIE, J.W.; OVERSTREET, R.M. True intermediate hosts for *Eimeria funduli* (Apicomplexa) from estuarine fishes. **The Journal of Protozoology**, v. 30, p. 672-675, 1983.
- FRENKEL, J.K. Toxoplasmosis: Parasite life cycle, pathology, and immunology. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. **The coccidia**. Baltimore: University Park Press, 1973. p. 343-410.
- FUNADA, M.R. **Avaliação de métodos de extração de DNA de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais e comparação de nested PCR com o método coproparasitológico de centrífugo-flutuação em sacarose**. Dissertação. USP: São Paulo-SP, 2009.
- FUTUYAMA, D.J. **Evolution**. 2. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2005. 603p.

- GAJADHAR, A.A.; WOBESER, G.; STOCKDALE, P.H.G. Coccidia of domestic and wild waterfowl (Anseriformes). **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p. 1-24, 1983.
- GARDINER, C.H.; FAYER, R.; DUBEY, J.P. **An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues**. 2. ed. Universidade de Minnesota: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1998. 84p.
- GARDNER, S.L.; DUSZYNSKI, D.W. Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: An example from subterranean rodents in Bolivia. **The Journal of Parasitology**, v. 76, p. 805-811, 1990.
- GARDNER, S.L.; CAMPBELL, M.L. Parasites as Probes for Biodiversity. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 4, p. 596-600, 1992.
- GHIMIRE, T.R. Redescription of genera of family Eimeriidae Minchin, 1903, **International Journal of Life Sciences**, v. 4, p. 26-47, 2010.
- GOLEMANSKY, V.G. Espèces et biologie des coccidies des oiseaux en Bulgarie. III. Coccidies des oies (*Anser anser anser*). (In Bulgarian, French summary.). **God Sofii Univ Biol Geol Geogr Fak Kniga I Biologiya (Zoologiya)**, v. 56, p. 89-104, 1961.
- GRASSÉ, P.P. **Traite de Zoologie**, Vol. 1. Part 2. Paris: Masson & Cie. 1953. 1160p.
- GRASSÉ, G. Classe des Coccidiomorphes. **In: CAULLERY, M.; CHATTON, E.; DEFLANDRE, G.; GRASSE, P.P.; HOLLANDE, A.; LE CALVEZ, J.; PAVILLARD, J.; POISSON, R.; TREGOUBOFF, G. Traite de Zoologie. Tome I, Fascicule II. Anatomie, Systematique, Biologie. Protozoaires: Rhizopodes, Actinipodes, Sporozoaires, Cnidosporidies**. Paris: Masson, 1953b. p. 766-768.
- GREIF, G.; STEPHAN, B.; HABERKORN, A. Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. **Parasitology Research**, v. 82, p. 706-714, 1996.
- GREINER, E.C.; FORRESTER, D.J.; CARPENTER, J.W.; YPARRAGUIRRE, D.R. Coccidia of Aleutian Canada geese. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, p. 365-370, 1981.
- HAFEEZ, M.A.; STASIAK, I.; DELNATTE, P.; EL-SHERRY, S.; SMITH, D.A.; BARTA, J.R. Description of two new *Isospora* species causing visceral coccidiosis in captive superb glossy starlings, *Lamprotornis superbus* (Aves: Sturnidae). **Parasitology Research**, v. 113, p. 3287-3297, 2014.

- HANSON, H.C.; LEVINE, N.D.; IVENS, V. Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of North American wild geese and swans. **Canadian Journal of Zoology**, v. 35, n. 6, p. 715-733, 1957.
- HOARE, C.A. Studies on some new ophidian and avian coccidia from Uganda, with a revision of the classification of the Eimeriidea. **Parasitology**, v. 25, p. 359-388, 1933.
- HILL, T.P.; DUSZYNSKI, D.W. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from sciurid rodents (*Eutamias*, *Sciurus*, *Tamiasciurus* spp.) from the western United States and northern Mexico with descriptions of two new species. **The Journal of Protozoology**, v. 33, p. 282-288, 1986.
- HILZ, H.; WIEGERS, U.; ADAMIETZ, P. Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 56, p. 103-108, 1975.
- HSIAO, C.Y.; WANG, J.S.; TUNG, K.C.; LEE, W.W. Extra-intestinal development of *Tyzzeria pernicioso*. **Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry**, v. 66, n. 1, p. 27-32, 1996.
- INGLIS, W.G. Characters: the central mystery of taxonomy and systematics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 44, p. 121-139, 1991.
- JENKINS, M.C.; ELLIS, J.T.; LIDDELL, S.; RYCE, C.; MUNDAY, B.L.; MORRISON, D.A.; DUBEY, J.P. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. **Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 135 – 142, 1999.
- JIRKŮ, M.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J.R.; KOUDELA, B.; LUKEŠ, J. The phylogeny of *Goussia* and *Choleoimeria* (Apicomplexa: Eimeriorina) and the evolution of excystation structures in coccidia. **Protist**, v. 153, p. 380-389, 2002.
- JIRKŮ, M.; JIRKŮ, M.; OBORNÍK, M.; LUKEŠ, J.; MODRÝ, D. A Model for Taxonomic Work on Homoxenous Coccidia: Redescription, Host Specificity, and Molecular Phylogeny of *Eimeria ranae* Dobell, 1909, with a Review of Anuran-Host *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriorina). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 39-51, 2009.
- JIRKŮ, M.; KVIČEROVÁ, J.; MODRÝ, D.; HYPŠA, V. Evolutionary plasticity in coccidia - striking morphological similarity of unrelated coccidia (apicomplexa) from related hosts: *Eimeria* spp. from African and Asian Pangolins (Mammalia: Pholidota). **Protist**, v. 164, n. 4, p. 470-481, 2013.

- JOHNSON, W.T. Avian coccidiosis. **Poultry Science**, v. 2, p. 146-163, 1923.
- JOYNER, L.P.; LONG, P.L. The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. **Avian Pathology**, v. 3, n. 3, p. 145-157, 1974.
- JOYNER, L.P. Host and Site specificity. In: LONG, P.L. **The biology of the Coccidia**. Baltimore: University Park Press, 1982. p. 35-62.
- KEAR, J. **Ducks, Geese, and Swans**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 2005. 910p.
- KECKEISEN, C.; ŠUJANOVÁ, A.; HIMMEL, T.; MATT, J.; NEDOROST, N.; CHAGAS, C.R.F.; WEISSENBOCK, H.; HARL, J. *Isospora* and *Lankesterella* Parasites (Eimeriidae, Apicomplexa) of Passeriform Birds in Europe: Infection Rates, Phylogeny, and Pathogenicity. **Pathogens**, v. 13, n. 4, p. 337, 2024.
- KHEYSIN, Y.M. **Life Cycles of Coccidia of Domestic Animals**. Baltimore: University Park Press, 1972. 268p.
- KIRMSE, P. Description of the life cycle of *Haemogregarina simondi* (Laveran and Mesnil, 1901) in its vertebrate host the marine fish *Solea solea* (Linnaeus). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 59, p. 141-150, 1979.
- KLEIN, T. A.; YOUNG, D.G.; GREINER, E.C.; TELFORD Jr., S.R.; BUTLER, J.F. Development and experimental transmission of *Schellackia golvani* and *Schellackia occidentalis* by ingestion of infected blood-feeding arthropods. **International Journal for Parasitology**, v. 18, p. 259-267, 1988.
- KLIMEŠ, B. Coccidia of the domestic goose (*Anser anser* dom.). **Zentralblatt für Veterinaermedizin**, v. 10, n. 5, p. 427-448, 1963.
- KOPEČNÁ, J., JIRKŮ, M., OBORNÍK, M., TOKAREV, Y.S., LUKEŠ, J.; MODRÝ, D. Phylogenetic Analysis of Coccidian Parasites from Invertebrates: Search for Missing Links. **Protist**, v. 157, p. 173-183, 2006.
- KOTLÁN, A. Adatok a vizimadarak (kacsa, liba) coccidiosisanak ismeretehez. **Allatorvosi Lapok**, v. 55, p. 103-107, 1932.
- KOTLÁN, A. Zur Kenntnis der Kokzidiose des Wassergeflügels. **Die Kokzidiose der Hausgans. Zentralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten**, v. 129, n. 1, p. 11-21, 1933.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; Li M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- KUTSCHERA, U.; NIKLAS, K.J. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 255-276, 2004.
- KVIČEROVÁ, J.; HYPŠA, V. Host-Parasite Incongruences in Rodent *Eimeria* Suggest Significant Role of Adaptation Rather than Cophylogeny in Maintenance of Host Specificity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e63601, 2013.
- LABBÉ, A. **Sporozoa**. In "Das Tierreich," 5. Lief. (Berlin). 1899. 180p.
- LAINSON, R.; PAPERNA, I. *Tyzzeria boae* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidium from the kidney of the snake *Boa constrictor constrictor* (Serpentes: Boidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 523-530, 1994.
- LANDAU, I. Hypothèses sur la phylogénie des coccidiomorphes des vertèbres. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 45, p. 63-75, 1974.
- LANDAU, I. Hypothèse sur la phylogénie des coccidiomorphes de vertèbres: évolution des cycles et spectre d'hôtes. **In: METTRICK, D.F., DESSER, S.S. Parasites – their world and ours**. Cambridge: Elsevier Biomedical Press, 1982. p. 169-171.
- LAPAGE, G. A list of the parasitic Protozoa, Helminths and Arthropoda recorded from species of the Family Anatidae (Ducks, Geese and Swans). **Parasitology**, v. 51, p. 1-109, 1961.
- LARKI, S.; ALBORZI, A.; CHEGINI, R.; AMIRI, R.A. Preliminary Survey on Gastrointestinal Parasites of Domestic Ducks in Ahvaz, Southwest Iran. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 13, n. 1, p.137-144, 2018.
- LEANDER, B.S. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 60-67, 2008.
- LÉGER, L. Sur le genre *Eimeria*. **Ibid.** v. 52, n. 576, 1900.
- LÉGER, L. *Caryospora simplex*, coccidie monosporée et la classification des coccidies. **Archiv für Protistenkunde**, v. 22, p. 71-88, 1911.

- LEIBOVITZ, L. Natural Occurrence and Experimental Study of Pox and *Haemoproteus* Infections in a Mute Swan (*Cygnus olor*). **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 5, n. 3, p. 130-136, 1969.
- LEIBOVITZ, L.; REBELL, G.; BOUCHER, G.C. *Caryospora cheloniae* sp. n.: a coccidial pathogen of mariculture reared green sea turtles (*Chelonia mydas mydas*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 14, p. 269-275, 1978.
- LEVINE, N.D. *Tyzzeria* and *Eimeria* from the Canada goose. **Proceedings of the American Society of Protozoologists**, v. 2, p. 17. 1951.
- LEVINE, N.D. *Eimeria magnalabia* and *Tyzzeria* sp. from que Canada Goose. **Cornell Veterinarian**, v. 42, n. 2, p. 247-252, 1952.
- LEVINE, N.D. A review of the coccidia from the avian orders Galliformes, Anseriformes and Charadriiformes, with descriptions of three new species. **American Midland Naturalist**, v. 49, p. 696-719, 1953.
- LEVINE, N.D.; IVENS, V. *Eimeria* and *Tyzzeria* (Protozoa: Eimeriidae) from deermice (*Peromyscus* spp.) in Illinois. **The Journal of Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 207-212, 1960.
- LEVINE, N.D. **Protozoan of domestic animals and of man**. 1. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1961. 432p.
- LEVINE, N.D. Protozoology today. **The Journal of Protozoology**, v. 9, p. 1-6, 1962.
- LEVINE, N.D. Introduction, history, and taxonomy. **In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. The coccidia, Eimeria, Isospora, Toxoplasma, and related genera**. Baltimore: Univeristy Park Press, 1973. p. 1-22.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH III, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A Newly Revised Classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.
- LEVINE, N.D. Taxonomy and life cycles of coccidia. **In: LONG, P.L. The biology of the coccidia**. ed. Baltimore: University Park Press, 1982. p. 1-33.

- LEVINE, N.D. Apicomplexa. **In:** PARKER, S.P. **Synopsis and Classification of Living Organisms**. New York: McGraw-Hill, 1982b. p. 571-587.
- LEVINE, N.D. The genera *Barrouxia*, *Defretinella*, and *Goussia* of the coccidian family Barrouxiidae (Protozoa: Apicomplexa). **The Journal of Protozoology**, v. 30, n. 3, p. 542-547, 1983.
- LEVINE, N.D. **Veterinary Protozoology**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1985. 414p.
- LEVINE, N.D. Phylum II. Apicomplexa Levine, 1970. **In:** LEE, J.J.; HUTNER, S.H.; BOVEE, E.C. **An illustrated guide to the protozoa**. ed. Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists, Allen Press, 1985b. p. 322-374.
- LEVINE, N.D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. **The Journal of Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 518-520, 1988.
- LEVINE, N.D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa: Volume 1**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1988b. 218p.
- LEVINE, N.D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa: Volume 2**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1988c. 169p.
- LONG, P.L.; MILLARD, B.J. Rejection of *Eimeria* by foreign hosts. **Parasitology**, v. 78, p. 239-247, 1979.
- LONG, P.L.; JOYNER, L.P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **The Journal of Protozoology**, v. 31, p. 535-541, 1984.
- LONG, P.L. **Coccidiosis of man and domestic animals**. 1. ed. Athens: CRC Press, 1990. 356p.
- LU, S.M.; YIN, P.Y.; JIANG, J.S. Therapeutic effects of six sulfonamides on *Tyzzeria pemiciosa* infection in Pekin ducks. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, v. 11, p. 9-10, 1985.
- LÜHE, M. Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. **In:** BARTH, J.A. **Mense's Handb. d. Tropenkrankh.** 3. v. Leipzig: Anhang, Coccidia, 1906. 258p.
- LYNCH, M. The age and relationships of the major animal phyla. **Evolution**, v. 53, p. 319-325, 1999.

- MANDAL, A.K. Studies on some aspects of avian coccidia (Protozoa, Sporozoa). Part IV. Occurrence and distribution of coccidian parasites in Indian birds. **Records of the Zoological Survey of India**, v. 63, p. 23-39, 1970.
- MANWELL, R.D. Parasitic Protozoa. **In: KREIR, J. Gregarines, Haemogregarines, Coccidia, Plasmodia, and Haemoproteids.** ed. New York: Academic Press, Inc. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1977. p. 24-27.
- MAI, K.; SHARMAN, P.A.; WALKER, R.A.; KATRIB, M.; SOUZA, D.D.; McCONVILLE, M.J.; WALLACH, M.G.; BELLI, S.I.; FERGUSON, D.J.P.; SMITH, N.C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 281-289, 2009.
- MARQUARDT, W.C. Host and Site Specificity in the Coccidia: a Perspective. **The Journal of Parasitology**, v. 28, n. 2, p. 243-244, 1981.
- MATUBAYASI, H. On a new coccidia, *Koidzumiella natrix* n. g., n. sp., parasitic in Japanese snakes; with some remarks on two other ophidian coccidia of the genus *Caryospora* and *Isospora*. **Keio-Igaku**, v. 16, p. 1719-1729, 1936.
- MATUBAYASI, H. Studies on parasitic protozoa in Japan II. Coccidia parasitic in snakes; with special remarks on *Tyzzeria (Koidzumiella) natrix*, parasitic in *Natrix tigrina*. **Annotationes Zoologica Japonenses**, v. 16, p. 255-268, 1937.
- MATUSCHKA, F.R.; BANNERT, B. Cannibalism and autotomy as predator-prey relationship for monoxenous Sarcosporidia. **Parasitology Research**, v. 74, p. 88-93, 1987.
- MAYBERRY, L.F.; MARQUARDT, W.C.; NASH, D.J.; PLAN, B. Genetic dependent transmission of *Eimeria separata* from *Rattus* to three strains of *Mus musculus*, an abnormal host. **The Journal of Parasitology**, v. 68, p. 1124-1126, 1982.
- MAYR, E. The Role of Systematics in Biology. **Science, New Series**, v. 159, n. 3815, p. 595-599, 1968.
- MAYR, E. **The growth of biological thought: diversity, evolution, and inheritance.** Cambridge, Mass.: Belknap Press. 1982. 992p.
- MAYR, E. **What Evolution Is: Science Masters Series.** New York: Basic Books, 2001. 318p.

McALLISTER, C.T.; DUSZYNSKI, D.W.; AUSTIN, C.C.; FISHER, R.N. Four New Species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Emoia* spp. Skinks (Sauria: Scincidae), from Papua New Guinea and the Insular Pacific. **The Journal of Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 103-110, 2017.

McLOUGHLIN, D.K. The influence of dexamethasone on attempts to transmit *Eimeria meleagridis* to chickens and *E. tenella* to turkeys. **The Journal of Parasitology**, v. 16, p. 145-148, 1969.

MEDLIN, L.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v. 71, p. 491-499, 1988.

MEGÍA-PALMA, R.; MARTÍNEZ, J.; MERINO, S. Phylogenetic analysis based on 18S rRNA gene sequences of *Schellackia* parasites (Apicomplexa: Lankesterellidae) reveals their close relationship to the genus *Eimeria*. **Parasitology**, v. 140, p. 1149-1157, 2013.

MEGÍA-PALMA, R.; MARTÍNEZ, J.; MERINO, S. Molecular characterization of haemococcidia genus *Schellackia* (Apicomplexa) reveals the polyphyletic origin of the family Lankesterellidae. **Zoologica Scripta**, v. 43, n. 3, p. 304-312, 2014.

MEGÍA-PALMA, R.; MARTÍNEZ, J.; ACEVEDO, I.; MARTÍN, J.; GARCÍA-ROA, R.; ORTEGA, J.; PESO-FERNANDÉZ, M.; ALBALADEJO, G.; COOPER, R.D.; PARANJPE, D.A.; SINERVO, B.R.; MERINO, S. Phylogeny of the reptilian *Eimeria*: are *Choleoimeria* and *Acroeimeria* valid generic names? **Zoologica Scripta**, v. 44, n. 6, p. 684-692, 2015.

MEGÍA-PALMA, R.M. **Molecular characterization of lizard parasites and their influence on colour ornaments**. Thesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid: Madrid-Espanha. 2016.

MEGÍA-PALMA, R.; MARTÍNEZ, J.; PARANJPE, D.; D'AMICO, V.; AGUILAR, R.; PALACIOS, M.G.; COOPER, R.; FERRI-YÁÑEZ, F.; SINERVO, B.; MERINO, S. Phylogenetic analyses reveal that *Schellackia* parasites (Apicomplexa) detected in American lizards are closely related to the genus *Lankesterella*: is the range of *Schellackia* restricted to the Old World? **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 470, p. 1-10, 2017.

MEHLHORN, H. Coccidia. In: MEHLHORN, H. **Encyclopedia of Parasitology**. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p. 1-8.

- MESNIL, F. Les travaux recents sur les coccidies. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 1, n. 473, p. 505, 1903.
- MINCHIN, E.A. The Sporozoa. **In: LANKESTER, E.R. Lankester's Treatise on Zoology.** London: Adam and Charles Black, Wellesley College Library. Pt. I, Fasc. 2. 1903. 543p.
- MINCHIN, E.A. **An introduction to the study of the Protozoa** (London). 1912.
- MINELLI, A. Publications in Taxonomy as Scientific Papers and Legal Documents. **In: JABLONSKI, N.G. Biodiversity, past, present and future and the future of taxonomy.** ed. San Francisco: Proceedings of the California Academy of Sciences, 2005. p. 225-231.
- MITTER, C.; BROOKS, D.R. Phylogenetic aspects of coevolution. **In: FUTUYMA, D.J.; SLATKIN, M. Coevolution.** ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1983. p. 65-98.
- MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J.R.; KOUDELA, B. Six new species of coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from East African chameleons (Sauria: Chamaeleonidae). **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 373-379, 2000.
- MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2017. 370p.
- MORAND, S. (macro-) Evolutionary ecology of parasite diversity: From determinants of parasite species richness to host diversification. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 1, p. 80-87, 2015.
- MORRISON, D.A. Prospects for elucidating the phylogeny of the Apicomplexa. **Parasite**, v. 15, p. 191-196, 2008.
- MORRISON, D.A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 375–382, 2009.
- NIESCHULZ, O. Eine neue Kokzidienart bei der Haungs. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 152, p. 74, 1947.
- OGEDENGBE, J.D.; HANNER, R.H.; BARTA, J.R. 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.

OGEDENGBE, J.D.; OGEDENGBE, M.E.; HAFEEZ, M.A.; BARTA, J.R. Molecular phylogenetics of eimeriid coccidia (Eimeriidae, Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata): A preliminary multi-gene and multi-genome approach. **Parasitology Research**, v. 114, p. 4149-4160, 2015.

OGEDENGBE, M.E.; EL-SHERRY, S.; OGEDENGBE, J.D.; CHAPMAN, H.D.; BARTA, J.R. Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa). **International Journal for Parasitology**, v. 48, p. 59-69, 2018.

OLIVEIRA, M.S.; MELLO, E.R.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, Á.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. Distribution, redescription, and molecular identification of *Isospora striata* McQuiston et al. 1997 (Eimeriidae), from woodcreepers (Dendrocolaptidae) in South America. **Parasitology Research**, v. 120, p. 2585-2593, 2021.

OLIVEIRA, M.S.; RAMILO, D.W.; MELLO, E.R.; CARDOZO, S.V.; CAETANO, I.; BRAZIO, E.; FONSECA, I. P.; OLIVEIRA, Á.A.; LIMA, V.M.; BERTO, B.P. Supplementary morphological data and molecular analyses of *Eimeria labbeana* (Labbé, 1896) Pinto, 1928 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from columbiform birds in Portugal. **Parasitology Research**, v. 120, p. 3569-3580, 2021b.

OKAMURA, B.; HARTIGAN, A.; NALDONI, J. Extensive Uncharted Biodiversity: The Parasite Dimension. **Integrative and Comparative Biology**, v. 58, n. 6, p. 1132-1145, 2018.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N.; MELLO, E.R.; MELO, J.O.; OLIVEIRA, M.S.; THODE-FILHO, S.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. Redescription and molecular identification of *Isospora ferox* Berto, Luz, Flausino, Ferreira & Lopes, 2009 (Eimeriidae) from tyrant-flycatchers (Tyrannoidea) in South America. **Systematic Parasitology**, v. 98, p. 333-341, 2021.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N.; ANDRADE, L.A.S.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; MELLO, E.R.; CARDOZO, S.V.; OLIVEIRA, A.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. Molecular identification of *Isospora coerebae* Berto, Flausino, Luz, Ferreira & Lopes, 2010 (Chromista: Miozoa: Eimeriidae) from the bananaquit *Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758) (Passeriformes: Thraupidae: Coerebinae) from Brazil. **Zootaxa**, v. 1568, p. 83-91, 2022.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N.; OLIVEIRA, M.S.; ANDRADE, L.A.S.; MELLO, E.R.; LIMA, V.M.; BERTO, B.P. Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: a case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from the plumbeous pigeon *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Columbiformes) in South America. **Parasitology Research**, v. 123, n. 42, p. 1-18, 2024.

ORTÚZAR-FERREIRA, C.N.; DORNA-SANTOS, L.; OLIVEIRA, M.S.; LIMA, V.M.; DUSZYNSKI, D.W.; BERTO, B.P. Coccidia of Guinea fowls: Validity of recorded *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) and first molecular identification of *Eimeria grenieri* Yvoré & Aycardi, 1967. **Parasitology International**, v. 103, n. 102937, p. 1-8, 2024b.

OVERSTREET, R.M.; HAWKINS, W.E.; FOURNIE, J.W. The Coccidian Genus *Calyptospora* n. g. and Family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with members infecting primarily fishes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 332-339, 1984.

OVEZMUKHAMEDOV, A. Coccidia of some reptiles in Turkmenistan. **Izvestiya Akademii Nauk Turkmenskoi SSR Seriya Biologicheskikh Nauk**, v.2, p. 67-70, 1968.

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

PAPAVERO, N. **Fundamentos práticos de taxonomia zoológica (coleções, bibliografia, nomenclatura)**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 1994, 285p.

PAPERNA, I.; LANDSBERG, J.H. Description and taxonomic discussion of eimerian coccidia from African and Levantine geckoes. **South African Journal of Zoology**, v. 24, p. 345-355, 1989.

PAPERNA, I. Ultrastructural and developmental affinities of piscine coccidia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 22, p. 67-76, 1995.

PAPERNA, I.; LAINSON, R. *Schellackia* (Apicomplexa: Eimeriidae) of the Brazilian Tree-Frog, *Phrynohyas venulosa* (Amphibia: Anura) from Amazonian Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 589–592, 1995.

- PAPERNA, I.; LAINSON, R. Fine structure of the epicytoplasmic eimerid coccidium *Acroeimeria pinto* Lainson & Paperna, 1999, a gut parasite of the lizard *Ameiva ameiva* in North Brazil. **Parasite**, v. 6, n. 4, p. 359-364, 1999.
- PARKER, B.B.; DUSZYNSKI, D.W. Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. **The Journal of Parasitology**, v. 72, p. 602-604, 1986.
- PELLÉRDY, L. A gyongytyuk coccidiosis. *Eimeria numidae* n. sp. **Magyar Allatorvosok Lapja**, v. 17, p. 18-19, 1962.
- PELLÉRDY, L. **Coccidia and Coccidiosis**. 2. ed. Budapest: Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, and Akademiai Kiado, 1974. 959p.
- PEIYUN, Y.; JINSHU, J.; KUNHUA, L.; GUIYING, L.; LIYE, Q. A preliminary investigation of the coccidian species of ducks in Beijing. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v. 13, n. 2, p. 119-124, 1982.
- PELSTER, M. Vergleichende elektronenmikroskopische untersuchungen an den makrogameten von *Isoospora felis* und *I. rivolta*. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 41, p. 29-46, 1973.
- PINTO, C. **Classification des sporozoaires de la sous-classe Eimeridia**. C.R. Soc. Biol. 98, 1571, 1928.
- PINTO, P.; RIBEIRO, C.A.; HOQUE, S.; HAMMOUMA, O.; LERUSTE, H.; DÉTRICHÉ, S.; CANNIERE, E.; DAANDELS, Y.; DELLEVOET, M.; ROEMEN, J.; BOURGEOIS, A.B.; KVÁČ, M.; FOLLET, J.; TSAOUSIS, A.D. Cross-Border Investigations on the Prevalence and Transmission Dynamics of *Cryptosporidium* Species in Dairy Cattle Farms in Western Mainland Europe. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2394, 2021.
- POCHE, F. Das System der Protozoa. **Archiv für Protistenkunde**, v. 30, p. 125-321, 1913.
- POLJANSKY, G.I. Protozoology and the Problem of Species. **The Journal of Protozoology**, v. 39, n. 1, p. 177-180, 1992.
- PORTMAN, N.; ŠLAPETA, J. The flagellar contribution to the apical complex: a new tool for the eukaryotic Swiss Army knife? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 2, p. 58-64, 2014.

- POULIN, R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 581-589, 2014.
- PROBERT, A.J.; ROBERTS, A.H.; WILSON, I.B. *Tyzzeria chalcides* N. Sp. From the Ocellated Skink, *Chalcides ocellatus*. **Journal of Protozoology**, v. 35, n. 2, p. 211-213, 1988.
- RAKHMATULLINA, N.K.; SVANBAEV, S.K. Coccidia of domestic and wild waterfowl in Kazakhstan. (In Russian.) **Tr. Akad. Nauk Kazakh. SSR, Inst. Zool.** v. 28, p. 5-36, 1967.
- RAPINI, A. Modernizando a taxonomia. **Biota Neotropica**, v. 4, n.1, p. BN00204012004, 2004.
- RAY, H.N.; SARKAR, A. On a new coccidium, *Tyzzeria chenicusae* n. sp., from cotton teal (*Chenicus coromendelianus*: Aves Anseriformes). **Journal of Protozoology**, v. 14, (Abstract 95) p. 27, 1967.
- REICHENOW, E. Die Coccidien. In: **Handb. Pathogen. Protozoen**, Leipzig, 3, 1136, 1921.
- RODRIGUES, M.P.; HIDALGO, J.M. A classificação dos animais segundo Aristóteles: recorte histórico e inserção didática. **Filosofia e História da Biologia**, v. 17, n. 2., p. 195-218, 2022.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck J.P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539-542, 2012.
- ROTHSCHIL, L.J. Protozoa, Protista, Protoctista: What's in a Name? **Journal of the History of Biology**, v. 22, n. 2, p. 277-305, 1989.
- RUGGIERO, M.A.; GORDON, D.P.; ORRELL, T.M.; BAILLY, N.; BOURGOIN T.; BRUSCA, R.C.; CAVALIER-SMITH, T.; GUIRY, M.D.; KIRK, P.M. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, e0130114, p. 1-54, 2015.
- SCHLEGEL, M.; MEISTERFELD, R. The species problem in protozoa revisited. **European Journal of Protistology**, v. 39, n. 4, p. 349-355, 2003.
- SCHNEIDER, A. Sur les psorospennes oviformes ou coccidies, especes nouvelles ou peu connues. **Archives de zoologie expérimentale et générale**, v. 9, p. 387-404, 1881.
- 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.

- SHIBALOVA, T.A.; MOROZOVA, T.I. Intranuclear development of macrogametes in the coccidium *Tyzzeria parvula*. **Tsitologiya**, v. 21, p. 969-972, 1979.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 862 p.
- SIDDALL, M.E.; DESSER, S.S. Gametogenesis and sporogenic development of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the leech *Placobdella ornata*. **The Journal of Protozoology**, v. 37, p. 511-520, 1990.
- SILVA-CARVALHO, L.M.; GENOVEZ-OLIVEIRA, J.L.; OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, Á.A.; LIMA, V.M.; FERREIRA, I.; BERTO, B.P. Polymorphism and genetic diversity of *Isospora parnaitatiaiensis* Silva, Rodrigues, Lopes, Berto, Luz, Ferreira & Lopes, 2015 (Eimeriidae) from antbirds (Thamnophilidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 97, p. 847-855, 2020.
- SIMMS, B.T. **Report Chief Bur. Anim. Indus.**, U. S. Dept. Agric., 66, 1950.
- SKENE, R.C.; REMMLER, O.; FERNANDO, M.A. Coccidia of Canada geese (*Branta canadensis*) at Kortright Waterfowl Park, Guelph, Ontario, Canada, with description of *Isospora anseris* n. sp. **Canadian Journal of Zoology**, v. 59, p. 493-497, 1981.
- SMALL, E. Systematics of Biological Systematics (Or, Taxonomy of Taxonomy). **Taxon**, v. 38, n. 3, p. 335-356, 1989.
- SOLTIS, D.E. Reconstructing the tree of life: Taxonomy and Systematics of species rich taxa. **Evolution**, v. 61, n. 12, p. 3007-3011, 2007.
- SOUZA, W.; BELFORT JR., R. **Toxoplasmose & Toxoplasma gondii**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. 214p.
- STERLING, C.R.; DE GIUSTI, D.L. Ultrastructural aspects of schizogony, mature schizonts and merozoites of *Haemoproteus metchnikovi*. **The Journal of Parasitology**, v. 58, p. 641-652, 1972.
- SVANBAEV, S.K.; RAKHMATULLINA, N.K. New kind of coccidia of wild ducks. **Farm News Science**, v. 10, p. 46-52, 1967.
- TADROS, W.; LAARMAN, J.J. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia. **Advances in Parasitology**, v. 20, p. 293-468, 1982.

- TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 4157p.
- 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.
- TIBOLDY, B. **Kísérletes vizsgálatok a szárnyas baromfi coccidiumainak fajlagosságáról. Közlem. az Összehas. Élet-és Körtan Kôrébôl**. Budapest. (Extract from thesis.), v. 26 p. 173-182, 1933.
- THOMAS, D.M.; STANTON, N.L. Eimerian species (Apicomplexa: Eimeriina) in Gunnison's prairie dogs (*Cynomys gunnisoni zuniensis*) and rock squirrels (*Spermophilus variegatus grammurus*) from southeastern Utah. **Journal of the Helminthological Society of Washington**, v. 61, p. 17-21, 1994.
- TODD, K.S.; LEPP, D.L.; TRAYSER, C.V. Development of the asexual cycle of *Eimeria vermiformis* Ernst, Chobotar, and Hammond 1971, from the mouse *Mus musculus*, in dexamethasone-treated rats, *Rattus norvegicus*. **The Journal of Parasitology**, v. 57, n. 5, p. 1137-1138, 1971.
- TODD, K.S.; HAMMOND, D.M. Life cycle and host specificity of *Eimeria callospermophili* Henry, 1932 from the Uinta ground squirrel *Spermophilus armatus*. **The Journal of Protozoology**, v. 15, p. 1-8, 1968a.
- TODD, K.S.; HAMMOND, D.M. Life cycle and host specificity of *Eimeria larimerensis* Vetterling, 1964 from the Uinta ground squirrel *Spermophilus armatus*. **The Journal of Protozoology**, v. 15, p. 268-275, 1968b.
- TOMÉ, B.; MAIA, J.P.M.C.; HARRIS, J. Molecular assessment of Apicomplexan parasites in the Snake Psammophis from North Africa: do multiple parasite lineages reflect the final vertebrate host diet? **The Journal of Parasitology**, v. 99, n. 5, p. 883-887, 2013.
- TREFANCOVÁ, A.; MÁCOVÁ, A.; KVIČEROVÁ, J. Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): real parasites, or pseudoparasites? **Protist**, v. 170, n. 1, p. 104-120, 2019.
- TYZZER, E.E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **The American Journal of Hygiene**, v. 10, n. 2, p. 269-283, 1929.

- TYZZER, E.E.; THEILER, H.; JONES, E.E. Coccidiosis in gallinaceous birds: II. A comparative study of species of *Eimeria* of the chicken. **American Journal of Hygiene**, v. 15, n. 2, p. 319-393, 1932.
- UPTON, S.J.; CURRENT, W.L.; BARNARD, S.M. A review of the genus *Caryospora* Léger, 1904 (Apicomplexa: Eimeriidae). **Systematic Parasitology**, v. 8, p. 3-21, 1986.
- UPTON, S.J.; BARNARD, S.M. Two new species of coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from Madagascar gekkonids. **The Journal of Protozoology**, 34, 452-454, 1987.
- UPTON, S.J.; SUNDERMANN, C.A. *Caryospora*: biology, chapter 10. **In**: LONG, P.L. **Coccidiosis of Man and Domestic Animals**. ed. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 187-204.
- UPTON, S.J.; OPPERT, C.J. Description of the oocysts of *Eimeria arnyi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern ringneck snake *Diadophis punctatus arnyi* (Serpentes: Colubridae). **Systematic Parasitology**, v. 20, p. 195-197, 1991.
- UPTON, S.J.; McALLISTER, C.T.; BRILLHART, D.B.; DUSZYNSKI, D.W.; WASH, C.W. Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis* like oocysts (Apicomplexa) in New World rodents of the genera *Baiomys*, *Neotoma*, *Onychomys*, *Peromyscus*, and *Reithrodontomys* (Muridae). **The Journal of Parasitology**, v. 78, p. 406-413, 1992.
- UPTON, S.J. Suborder Eimeriorina Léger, 1911. **In**: LEE, J. J.; LEEDALE, G. F.; BRADBURY, P. **An Illustrated Guide to the Protozoa**. 2. ed. London: Society of Protozoologists, 2000. p. 318-339.
- VERSÉNYI, L. Studies on the endogenous cycle of *Tyzzeria perniciosus* (Allen, 1935). **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 17, n. 4, p. 449-456, 1967.
- VETTERLING, J.M. *Eimeria tenella*: host specificity in gallinaceous birds. **The Journal of Protozoology**, v. 23, n. 1, p. 155-158, 1976.
- VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; OBORNÍK, M.; ŠLAPETA, J.; LUKEŠ, J. (2016). Apicomplexa. **In**: ARCHIBALD, J.M.; SIMPSON, A.G.B.; SLAMOVITS, C.H.; MARGULIS, L.; MELKONIAN, M.; CHAPMAN, D.J.; CORLISS, J.O. **Handbook of the Protists**. New York: Springer Cham. 2016. p. 01-58.
- VRBA, V.; PAKANDL, M. Host specificity of turkey and chicken *Eimeria*: Controlled cross-transmission studies and a phylogenetic view. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 118-124, 2015.

- WACHA, R.S. On the Taxonomic Status of the Family Pfeifferinellidae (Coccidia), with a Description of *Pfeifferinella gugleri* sp. n. **The Journal of Protozoology**, v. 27, n. 4, p. 368-371, 1980.
- WENYON, C.M. **Protozoology**. Vol. 2. New York: William, Wood and Company, 1926. 1396p.
- WIENS, J.J. Polymorphism in Systematics and Comparative Biology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 30, p. 327-362, 1999.
- WILLIAMS, R.B. A Prepared Mind—Ernest Edward Tyzzer’s Legacy of Research into Avian Diseases. **Avian Diseases**, v. 57, p. 716-729, 2013.
- WÜNSCHMANN, A.; WELLEHAN-JUNIOR, J.F.; ARMIEN, A.; BEMRICK, W.J.; BARNES, D.; AVERBECK, G.A.; ROBACK, R.; SCHWABENLANDER, M.; D’ALMEIDA, E.; JOKI, R.; CHILDRESS, A.L.; CORTINAS, R.; GARDINER, C.H.; GREINER, E.C. Renal infection by a new coccidian genus in big brown bats (*Eptesicus fuscus*). **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 178-183, 2010.
- XAVIER, R.; SANTOS, J.L.; VERÍSSIMO, A. Phylogenetic evidence for an ancestral coevolution between a major clade of coccidian parasites and elasmobranch hosts. **Systematic Parasitology**, v. 95, p. 367-371, 2018.
- XAVIER, R.; CARDOSO, J.; BARROSO, R.; NOGUEIRA, S.; CRUZ, C.; PEREIRA, A.; SARAIVA, A. Effects of *Goussia* infecting the blue whiting and phylogenetic placement of *Goussia* infecting marine fish off Northern Portugal. **Parasitology Research**, v. 119, p. 2139-2147, 2020.
- XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S.J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 72-97, 2004.
- YAKIMOFF, W.L.; MATIKASCHWILI, I.L. Die coccidiose der ussurischen waschbaren. **Archiv für Protistenkunde**, v. 81, p. 166-178, 1933.
- YIN, P.; JIANG, J.S.; KONG, F.Y.; LIN, K.H. Studies on the life cycles of *Tyzzeria perniciososa* and *Wenyonella philiplevinei*, two coccidian parasites of Pekin duck, and studies on the pathology, diagnosis and control of coccidiosis they caused. **In: Waterfowl production**,

Proceedings of the International Symposium, Beijing, China. Oxford: Pergamon Press, 1988 p. 283-292.

YVORÉ, P.; AYCARDI, J. Une nouvelle coccidie *Eimeria grenieri* n. sp. (Protozoa; Eimeriidae) parasite de la pintade *Numida meleagris*. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 264, p. 73-76, 1967.

ZHAO, X.; DUSZYNSKI, D.W.; LOKER, E.S. Phylogenetic position of *Eimeria antrozoi*, a bat coccidium (Apicomplexa: Eimeriidae) and its relationship to morphologically similar *Eimeria* spp. from bats and rodents based on nuclear 18s and plastid 23s rDNA sequences. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1120-1123, 2001.

ZHAO, Y.; GENTEKAKI, E.; YI, Z.; LIN, X. Genetic Differentiation of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase c Subunit I Gene in Genus *Paramecium* (Protista, Ciliophora). **PLOS ONE**, v. 8, n. e77044, 2013.

ZWART, P. Intraepithelial Protozoon, *Klossiella boae* n. sp. in the Kidneys of a *Boa constrictor*. **The Journal of Protozoology**, v. 11, n. 2, p. 261-263, 1964.

9 ANEXOS

9.1 Certificado da CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -CEUA/ICBS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “REVISÃO TAXONÔMICA DE COCCÍDIOS (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) DE AVES DOMÉSTICAS DO BRASIL” registrada com o nº CEUA 09/2023, sob a responsabilidade de Bruno Pereira Berto, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino)- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal -CONCEA, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-ICBS-UFRRJ)**, em reunião de 21 de setembro de 2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	21/09/2023 a 21/10/2024
Nº da solicitação ou Autorização SISBIO	84721
Atividade (s)	() Captura () Coleta de espécimes () Marcação (X) Outras (Coleta de amostras fecais)
Espécie/Grupos taxonômicos	<i>Anser anser e Anser cygnoides</i> <i>Cairina moschata</i> <i>Anas platyrhynchos</i> <i>Numida meleagris</i>
Local (is) de realização das atividades	Teresópolis, Seropédica e Rio de Janeiro

We certify that the protocol CEUA number 09/2023, entitled “TAXONOMIC REVIEW OF COCCIDIA (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE) FROM DOMESTIC BIRDS IN BRAZIL” is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Institute of Biological Sciences and Health of Federal Rural University of Rio de Janeiro in September 21, 2023.

Ana Cláudia Ferreira Souza
Coordenadora CEUA-ICBS-UFRRJ

9.2 Artigos publicados no período de vigência do mestrado

Parasitology Research (2024) 123:42
https://doi.org/10.1007/s00436-023-08045-5

RESEARCH



Molecular and statistical approaches to the delimitation of Eimeriidae species: a case of extreme polymorphism in eimerian oocysts from the plumbeous pigeon *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818) (Columbiformes) in South America

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira¹ · Mariana S. Oliveira¹ · Lucas de Assis S. Andrade¹ · Ericson R. de Mello² · Viviane M. Lima³ · Bruno P. Berto³

Received: 10 May 2023 / Accepted: 3 November 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

The current work aimed to analyze, morphologically, statistically, and molecularly, oocysts shed from plumbeous pigeons, *Patagioenas plumbea* (Vieillot, 1818), from a locality at 2197 m of altitude near the Agulhas Negras peak, the highest point of the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. The oocysts were extremely polymorphic, being subspheroidal, ovoidal, or ellipsoidal, in addition to having the random presence/absence of characteristic features associated with the oocyst wall, such as micropyle, micropyle cap, lateral micropyle, and outer veil/rough wall. Linear regression confirmed the extreme polymorphism of oocysts, showing that if all combinations of taxonomic characters in oocysts (morphotypes) were overestimated, 19 different species could be identified/described. In contrast, the means comparison analysis between oocysts with the presence/absence of characteristic features and the histograms showed equivalences and regularity in the distribution in the classes of measures, which indicate the presence of a single species in the measured oocysts. Molecular analyses were performed from the isolation of individual oocysts of different morphotypes, which had their genetic material extracted, amplified, and sequenced in 4 non-overlapping *loci* in the *cox1* and *cox3* genes and fragments of the small and large subunit rDNA of mitochondrial DNA. The sequences were 100% identical between the morphotypes, with the exception of a very small divergence observed at the *locus* that partially covers the *cox3* gene. The phylogenetic analysis was inconclusive for the *locus* within the *cox1* gene traditionally used for eimeriid coccidians; however, the other *loci* should have a promising future for phylogenetic studies when more sequences for the same genic regions are deposited in GenBank. Finally, the multifactorial analysis of the current work supported that the polymorphic oocysts shed from *P. plumbea* are a single species, which was named *Eimeria patagioenasae*, making this the twenty-second eimerian description from Columbiformes.

Keywords *Eimeria patagioenasae* · Coccidia · Oocysts · Phylogeny · Neotropical birds · Parque Nacional de Itatiaia

Section Editor: Berit Bangoura

✉ Mariana S. Oliveira
mariana.s.o@hotmail.com

✉ Bruno P. Berto
bertobp@ufrj.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

³ Departamento de Biologia Animal, ICBS, UFRRJ, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil

Introduction

Knowledge of the parasite diversity of wild animals is quite scarce when compared to what is known about the diversity of parasites in domestic animals and humans. In a recent study, Duszynski (2021) points out that of the current diversity of vertebrates, only a very small portion was examined for coccidians. Also, Ortúzar-Ferreira et al. (2020) showed at the time that of the 367 species of columbiform birds in the world, only 15 were reported as coccidian hosts.

Pigeons and doves (Columbiformes) are hosts for a wide range of parasites, from ectoparasites such as hippoboscids, mallophages, lice, and mites to endoparasites such as

Published online: 14 December 2023

Springer



Coccidia of Guinea fowls: Validity of recorded *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) and first molecular identification of *Eimeria grenieri* Yvoré & Aycardi, 1967

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira^a, Leandro Dorna-Santos^b, Mariana S. de Oliveira^{a,c}, Viviane M. de Lima^c, Donald W. Duszynski^d, Bruno P. Berto^{c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^d Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM 87131, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Coccidia
Sporulated oocysts
Morphology
Taxonomy
Sequencing
Phylogeny
Eimeria gorakhpuri
Eimeria grenieri
Eimeria numidae
Numida meleagris
Helmeted Guinea fowl
Brazil

ABSTRACT

Guinea fowls, *Numida meleagris* (L., 1758), are galliform birds native to sub-Saharan Africa, but introduced in several countries around the world for domestic breeding and/or animal production. This species is considered more resistant to disease by *Eimeria* spp. than other domestic galliform birds. Here we review the *Eimeria* spp. known to infect species of Numididae and provide the first molecular identification of an *Eimeria* sp. from Guinea fowls. There are currently 3 named eimerians from Guinea fowls; *Eimeria numidae* Pellerdy, 1962; *Eimeria grenieri* Yvoré and Aycardi, 1967; and *Eimeria gorakhpuri* Bhatia & Pande, 1967. We reviewed each of these species descriptions and documented their taxonomic shortcomings. From that, we suggest that *E. gorakhpuri* is a junior synonym of *E. numidae*. In conclusion, we have morphologically redescribed in detail *E. grenieri* from *N. meleagris* from Rio de Janeiro and provided molecular supplementation through sequencing of three non-overlapping loci in *cox1* and *cox3* genes and fragments of small and large subunit mitochondrial rDNA.

1. Introduction

Helmeted Guinea fowls, *Numida meleagris* (L., 1758), are galliform birds (Numididae) more closely related to pheasants and partridges than to the domestic chicken. This family has 4 genera, and *Numida* is the monospecific type-genus [1,2]. This species is native to sub-Saharan Africa, but it was introduced to several countries around the world for domestic breeding and/or animal production [2,3]. In Brazil, *N. meleagris* was introduced during Portuguese colonization, although it was not dispersed into the wild as in other countries [4].

Although the use of Guinea fowl in poultry production is minimal compared to domestic chickens, the Guinea fowl may represent an alternative source of high-quality meat and eggs [5,6]. Therefore, several studies have been carried out in recent years to improve the

management, nutrition, reproduction and genetic improvement via hybridization between domestic chickens and Guinea fowls [7], research that has been carried out to evaluate the market potential of Guinea fowl products in different locations [8].

Guinea fowls are considered more resistant to disease than other domestic galliform birds, and they've had minimum management and breeding requirements, especially with regard to parasitism by *Eimeria* species. For example, domestic chickens have at least 9 *Eimeria* species that infect their digestive tracts, 7 of which can be pathogenic, while Guinea fowl have only 3 named eimerians, only 2 of which have been documented to cause pathology; however, as with all *Eimeria* spp. of birds and mammals, depending on the size of the infectious dose [9]. Here we give a taxonomic review of the named coccidian species of Numididae, argue why some are valid names and others are not, and we

* Corresponding author.

E-mail address: bertobp@ufrj.br (B.P. Berto).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2024.102937>

Received 26 April 2024; Received in revised form 19 July 2024; Accepted 22 July 2024

Available online 25 July 2024

1383-5769/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/parint

Isopora juruviarae n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from chivi vireos *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) (Passeriformes: Vireonidae) in South America

Lucas de Assis Silva Andrade^a, Carlos Nei Ortúzar-Ferreira^a, Mariana de Souza Oliveira^a,
Sergian Vianna Cardozo^b, Viviane Moreira de Lima^c, Bruno Pereira Berto^{c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Rua Professor José de Souza Herdy 1160, 25071-202 Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Coccidia
Oocysts
Morphology
Taxonomy
Sequencing
Phylogeny
Neotropical birds
Marambaia Island
Brazil

ABSTRACT

Chivi vireos *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) are passerine birds widely distributed throughout Brazil, but mainly observed in the Atlantic Forest of the South and Southeast regions of the country. In this context, the current study identifies a new species of *Isopora* Schneider, 1881 from *V. chivi* captured in the Marambaia Island, on the coast of the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. The oocysts of *Isopora juruviarae* Andrade & Berto n. sp. are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 26 by 24 μm. Micropyle is absent or inconspicuous. Oocyst residuum absent, but polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal with pointed posterior end, measuring on average 17 by × 11 μm. Stieda and Sub-Stieda bodies are present. Sporocyst residuum is present among the vermiform sporozoites, which have refractile bodies and nucleus. This morphology was different from the other *Isopora* spp. recorded in the same family, superfamily and parvorder as the host. Molecular identification was targeted by the amplification and sequencing of two different loci of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) gene and one locus of the 18S small subunit ribosomal RNA (18S) gene. Phylogenetic analyses were not very efficient in forming monophyletic groups associated with host taxon, zoogeographical region or taxonomic character; however, they confirmed the identification as a new species through comparison with sequences from *Isopora* spp. of wild passerines. Finally, based on the morphological and molecular analyses of the oocysts recovered from the chivi vireo *V. chivi* in the current work, *I. juruviarae* is considered new to science, being the second species recorded in the host family Vireonidae and the first to have a supplementation by molecular identification.

1. Introduction

Tropical environments have a great diversity of life, observed in its most varied forms, from animals and plants to microorganisms. Despite this known biodiversity, parasitic species such as coccidian Protozoa are underestimated, mainly from wild animals [1]. Berto et al. [2] indicate this scenario by reporting that only 2% of New World passerine birds diversity has been examined for coccidian parasites.

Marambaia Island, located in Sepetiba Bay, on the coast of Rio de Janeiro, is an environment where several types of biomes converge, such as Mangroves, Restinga and Atlantic Rainforest [3]. This is also the type locality of more than a dozen coccidian species, described from birds of

different species and families [2].

The chivi vireo *Vireo chivi* (Vieillot, 1817) is a passerine bird distributed throughout Brazil that inhabits the intermediate layer of forests, cyclamen forests, coastal sandbanks and urban forests, known for its incessant song, mainly in spring and summer [4,5]. *Vireo chivi* is derived from the former subspecies *Vireo olivaceus chivi* (Vieillot, 1817), which was recently elevated to the taxonomic category of species [6].

In this context, the present study provides a description and molecular identification of a new species of *Isopora* Schneider, 1881 from chivi vireos *V. chivi* captured in the Marambaia Island, on the coast of the State of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: bertobp@ufrj.br (B.P. Berto).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2023.102806>

Received 8 July 2023; Received in revised form 4 September 2023; Accepted 5 September 2023

Available online 7 September 2023

1383-5769/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



Isoospora pichororei n. sp. (Chromista: Apicomplexa: Eimeriidae) from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 (Passeriformes: Furnariidae: Synallaxiinae) in South America

Jhon Lennon Genovez-Oliveira^a, Carlos Nei Ortúzar-Ferreira^a, Mariana de Souza Oliveira^a, Águida Aparecida de Oliveira^b, Viviane Moreira de Lima^c, Bruno Pereira Berto^{c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^b Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^c Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 km 7, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
coccidia
Oocysts
Morphology
Taxonomy
Sequencing
Phylogeny
Neotropical birds
Parque Nacional do Itatiaia
Brazil

ABSTRACT

Spinetails are a suboscine passerines of the genus *Synallaxis* Vieillot, 1818 which have great interest for ornithology, given the wide diversity of 37 species that are distributed throughout the Neotropical region. Despite this wide diversity and distribution, *Synallaxis* spp. have never been recorded as hosts of coccidian parasites. In this context, the current study describes a new species of *Isoospora* Schneider, 1881 from rufous-capped spinetails *Synallaxis ruficapilla* Vieillot, 1819 captured in the Itatiaia National Park, which is a federal conservation unit in Southeastern Brazil. The oocysts of *Isoospora pichororei* Genovez-Oliveira & Berto n. sp. are subspheroidal to ovoidal, measuring on average 25 by 21 μ m. Micropyle is present, but discrete. Oocyst residuum absent, but one or two polar granules are present. Sporocysts are ellipsoidal with slightly pointed posterior end, measuring on average 17 by 10 μ m. Stieda and sub-Stieda bodies are present. Sporocyst residuum is clustered among the vermiform sporozoites, which have striations, refractile bodies and nucleus. This morphology was different from the other *Isoospora* spp. recorded in the host family Furnariidae. Molecular identification was targeted by the amplification and sequencing of a locus of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) gene. This sequence had the highest similarity of 99.5% with a sequence deposited for *Isoospora oliveirai* Ortúzar-Ferreira & Berto, 2020, which is a coccidian species that parasitizes suboscine tityrids *Schiffornis virescens* (Lafresnaye, 1838), also in the Itatiaia National Park. Phylogenetic analysis grouped some species in subclades, including *I. pichororei* with *I. oliveirai*; however, it was inconclusive in an expectation of parasite-host coevolution. Finally, *I. pichororei* is established as new to science, being the first description from Synallaxiinae and the third description from Furnariidae. Furthermore, this is the first *Isoospora* sp. from the host family Furnariidae to have a molecular supplementation by sequencing a locus of the *cox1* gene of the mitochondrial genome.

1. Introduction

The avifauna of South America is remarkably diverse, with countless species from the most different orders, families and genera [1,2]. Spinetails of the genus *Synallaxis* Vieillot, 1818 are suboscine passerines of great interest for ornithology, given the wide diversity of 37 species that are distributed throughout the Neotropical region [1,3]. One of the species of spinetails that occurs in Brazil is the rufous-capped spinetail

Synallaxis ruficapilla Vieillot, 1819, which is distributed throughout Southeastern Brazil, reaching as far as Argentina and Paraguay [1,2].

Research on parasites of wild birds has been important for monitoring the health of wild bird populations and evaluating the conservation status of certain ecosystems, in addition to determining the diversity and distribution of parasitic species in the wild [4]. However, despite significant advances in recent decades, the diversity of parasites from wild birds is little known, especially some parasitic groups, such as

* Corresponding author.

E-mail address: bertobp@ufrj.br (B.P. Berto).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2024.102936>

Received 25 June 2024; Received in revised form 19 July 2024; Accepted 22 July 2024

Available online 24 July 2024

1383-5769/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Report of coccidiosis in a free-living green-winged saltator *Saltator similis* in Itatiaia National Park in southeastern Brazil¹

Carla Maronezi², Carlos N. Ortúzar-Ferreira³, Lucas A.S. Andrade³,
Carolina M.S. Caruncho⁴, Mariana S. Oliveira³ and Bruno P. Berto^{*5}

ABSTRACT. Maronezi C., Ortúzar-Ferreira C.N., Andrade L.A.S., Caruncho C.M.S., Oliveira M.S. & Berto B.P. 2024. Report of coccidiosis in a free-living green-winged saltator *Saltator similis* in Itatiaia National Park in southeastern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 44:e07451, 2024. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil E-mail: bertobp@ufrj.br

The green-winged saltator *Saltator similis* (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837) is a passerine bird highly valued by bird breeders and a target of illegal wildlife trafficking. Coccidian chromists are etiological agents of coccidiosis, which may be asymptomatic and enzootic in bird populations when environmental conditions are favorable. However, epizootic outbreaks with severe disease can occur due to environmental changes. In this context, this study reports a case of coccidiosis in a free-living juvenile specimen of *S. similis* captured at the Itatiaia National Park in southeastern Brazil. Typical clinical signs of coccidiosis were observed, and it was associated with greenish mucoid diarrhea containing a high density of coccidian oocysts. Three *Isospora* spp. were specifically identified in 14 fecal samples (fecal droplets) collected over two hours. *Isospora saltatori* (Berto, Balthazar, Flausino & Lopes, 2008) had the highest density and positivity throughout most of the collection period. Finally, this paper discusses the importance of the continuous evaluation of the health of birds as bioindicators and their coccidian ecological biomarkers as one of the strategies for evaluating the conservation status of Itatiaia National Park.

INDEX TERMS: Coccidia, green-winged saltator, *Saltator similis*, conservation, isosporosis, oocysts, Parque Nacional do Itatiaia.

RESUMO. [Relato de coccidiose em um trinca-ferro *Saltator similis* de vida-livre no Parque Nacional do Itatiaia no sudeste brasileiro.] O trinca-ferro *Saltator similis* (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837) é um pássaro muito valorizado por

criadores de aves e pelo tráfico ilegal de animais silvestres. Os cromistas coccídios são agentes etiológicos da coccidiose, a qual pode ser assintomática e enzoótica em populações de aves quando as condições ambientais são favoráveis, mas surtos epizooticos com doença grave podem ocorrer como resultado de mudanças ambientais. Nesse contexto, este artigo relata um caso de coccidiose em um espécime juvenil de vida livre de *S. similis* capturado no Parque Nacional do Itatiaia, no sudeste do Brasil. Foram observados sinais clínicos típicos de coccidiose, associados a diarreia mucóide esverdeada contendo alta densidade de oocistos. Três *Isospora* spp. foram especificamente identificadas em 14 defecações coletadas durante um período de duas horas. *Isospora saltatori* (Berto, Balthazar, Flausino & Lopes, 2008) foi a espécie com maior densidade e positividade durante a maior parte do período de coleta. Por fim, este artigo discute a importância da avaliação contínua da saúde das aves como bioindicadores, e de seus biomarcadores ecológicos coccídios, como uma

¹ Received on April 5, 2024.

Accepted for publication on April 26, 2024.

² Graduate Program in Science, Technology and Innovation in Agriculture, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil.

³ Graduate Program in Animal Biology, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil.

⁴ Veterinary Medicine Course, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil.

⁵ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-000, Brazil. *Corresponding author: bertobp@ufrj.br

ARTIGO

Diversity and body condition of wild birds in a reforestation area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil

Diversidade e condição corporal de aves silvestres em área de reflorestamento na Mata Atlântica do Sudeste do Brasil

Mariana de Souza Oliveira¹ , Carlos Nei Ortúzar-Ferreira² ,
Lucas de Assis Silva Andrade³ , Heider Alves Franco⁴ , Bruno Pereira Berto⁵ 

- ¹ Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil
- ² Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.
- ³ Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.
- ⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, *campus* Pinheiral, Pinheiral, Brazil.
- ⁵ Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.

ABSTRACT: The Atlantic Forest has priority areas for conservation, especially in the Médio Paraíba Region in southeastern Brazil, which was widely deforested during the coffee cycle. In this sense, some methods of environmental assessment as the evaluation of the body condition of wild animals have been widely applied and related to a variety of biological and environmental factors. The current work aimed to evaluate the diversity and body condition of wild birds, and their relationship to biological, ecological and environmental factors, in a reforestation area in the municipality of Pinheiral in the Médio Paraíba Region in southeastern Brazil. A total of 195 were captured with mist nets and identified. Body condition was calculated using simple linear regression between body mass and body length. Linear regression and analysis of variance were used to determine the relationship of body condition with the biological and environmental data. The Shannon-wiener diversity index (H'), Simpson dominance index (λ') and Pielou evenness index (J) were calculated from the abundance of bird species. The order Passeriformes was the most representative among the captured birds. Among all the biological and ecological data evaluated, body condition was significantly related only to rain and temperature, where it was observed that the body condition indexes decrease with the increase of the rains and temperature, that is, with the wet season. The Shannon-wiener, Simpson and Pielou indexes showed greater diversity and less dominance in the wet season compared to the dry season, although there is a predominance of birds with greater forest dependencies in the dry season. This work highlights the importance of the maintenance of this reforestation area in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil for the conservation of the birds and of the ecosystem of the region, besides showing that the wet season is unfavorable for the body condition of birds.

Keywords: ecological descriptors; fitness; seasonality; conservation; Médio Paraíba Region; birds



First record of *Microspingus cinereus* (Bonaparte, 1850), Cinereous Warbling Finch (Passeriformes, Thraupidae), from the state of Rio de Janeiro, Brazil

GABRIEL MAGALHÃES TAVARES^{1*}, JOÃO RAFAEL GOMES DE ALMEIDA E MARINS²,
MANOEL TULER FILHO³, CARLOS NEI ORTÚZAR-FERREIRA⁴

¹ Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil • GMT: gabriel_magalhaestavares@hotmail.com • <https://orcid.org/0000-0001-9948-7012>

² Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, Prefeitura de Barra Mansa, RJ, Brazil • JRGAM: joaorgam.smmadsbm@gmail.com • <https://orcid.org/0000-0001-6784-1005>

³ Independent researcher, Barra Mansa, RJ, Brasil • MTF: manoel.tuler@hotmail.com

⁴ Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil • CNOF: carlosneortuzarferreira@gmail.com • <https://orcid.org/0000-0002-0177-5591>

* Corresponding author

Abstract. We document from the state of Rio de Janeiro, Brazil, the first record of *Microspingus cinereus* (Bonaparte, 1850), which was observed in the municipality of Barra Mansa in October 2020. The species was originally documented in central Brazil, potentially linked to Cerrado habitats. However, recent observations from eBird and WikiAves databases indicate that *M. cinereus* has been spreading towards the southeast for several years. It has been considered Vulnerable for almost two decades due to the loss of grassland habitats. Our discovery expands the known geographic range of *M. cinereus* to eastern Brazil and may have importance for future biogeographic studies and the conservation of this species.

Keywords. Conservation, geographic distribution, ornithology

Academic editor: Rodolpho Credo Rodrigues

Received 29 June 2023, accepted 24 October 2023, published 6 November 2023

Tavares GM, Almeida e Marins JRG, Filho MT, Ortúzar-Ferreira CN (2023) First record of *Microspingus cinereus* (Bonaparte, 1850), Cinereous Warbling Finch (Passeriformes, Thraupidae), from the state of Rio de Janeiro, Brazil. Check List 19 (6): 827–832. <https://doi.org/10.15560/19.6.827>

Introduction

Located in the eastern Brazil, the first region to be colonized and exploited, the Atlantic Forest has accumulated a broad and relatively early knowledge of its avifauna as compared to other Brazilian biomes; the state of Rio de Janeiro one of the most studied states of Brazil with this biome (Pacheco et al. 2008). Currently, 806 bird species are known to occur in the state of Rio de Janeiro; this number represents 41% of the total bird species occurring in Brazil and approximately 79% of the total bird species in the Atlantic Forest (Bergallo et al. 2000; Moreira-Lima 2013; Pacheco et al. 2021; Gagliardi and Serpa 2022). Despite extensive knowledge of the avifauna of Rio de Janeiro state, new bird

records have recently been made from the state (Vecchi and Alves 2008; Guido et al. 2016; Alves et al. 2017; Del-fino and Carlos 2022).

Microspingus cinereus (Bonaparte, 1850), Cinereous Warbling Finch, is a Neotropical passeriform that occur sparsely in non forest habitats of central Brazil (Costa and Rodrigues 2013; Marques-Santos et al. 2014). Classified as endemic to the Cerrado biome (Silva and Bates 2002), *M. cinereus* was considered to be globally Vulnerable between 2000 and 2017 (IUCN 2022). During this time, the population was suspected to have declined due to a reduction of suitable habitat (Collar et al. 1992). However, more recent studies suggest that this species can tolerate and even benefit from degraded areas, such as abandoned pastures (Simon et al. 1999;

Deformidade de bico em dois espécimes de peito-pinhão *Castanozoster thoracicus* (Nordmann, 1835) (Passeriformes: Thraupidae) no Parque Nacional do Itatiaia, Sudeste do Brasil

Beak deformity in two specimens of bay-chested warbling-finch *Castanozoster thoracicus* (Nordmann, 1835) (Passeriformes: Thraupidae) in Itatiaia National Park, Southeastern Brazilian

Deformidad del pico en dos especímenes de *Castanozoster thoracicus* (Nordmann, 1835) (Passeriformes: Thraupidae) en el Parque Nacional de Itatiaia, Sudeste de Brasil

DOI: 10.34188/bjaerv7n2-023

Submetido: 19/01/2024

Aprovado: 01/03/2024

Carlos Nei Ortúzar-Ferreira

Mestrando em Biologia Animal pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ /
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal /
Departamento de Biologia Animal
Seropédica, RJ, Brasil
E-mail: carlosneiortuzarferreira@gmail.com

Stanley Nobre Lima

Veterinário pelo Centro de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman – CJV / Setor de Cirurgia
Centro de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman – CJV / Setor de cirurgia
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail: stanleynobre@gmail.com

Rodrigo Gredilha-Duarte

Pós-Doutorando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense – UFF
Universidade Federal Fluminense / Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal)
Niterói, RJ, Brasil
E-mail: rodrigogredilha@id.uff.br

RESUMO

A documentação científica de aves neotropicais portando aberrações anatômicas em seus bicos é escassa, tendo um maior número de registros, aves de regiões temperadas. Entre os anos de 2017 a 2018, foram realizadas por nós, algumas incursões ao Parque Nacional do Itatiaia, com objetivo de inventariar a fauna parasitária de aves silvestres. Para obter nossa amostragem, foram utilizadas redes de neblina para a captura das aves. No entanto, durante algumas dessas expedições, encontramos dois achados inesperados de deformidade de bico. Sendo assim, no presente estudo, é apresentado a ocorrência de deformidade de bico em dois indivíduos de *Castanozoster thoracicus* (Nordmann, 1835) oriundos do Parque Nacional do Itatiaia. Contudo, apesar deste obstáculo, ambas as aves se encontravam em boas condições de saúde.

Palavras-chave: anomalia, aves, bico, deformidade, ranfoteca