UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

FATORES DETERMINANTES DA PREVALÊNCIA E DIVERSIDADE DE HEMOSPORÍDEOS EM AVES SILVESTRES NO NORDESTE BRASILEIRO: UM ESTUDO TEMPORAL

RAQUEL ANDRADE RODRIGUES

BELO HORIZONTE - MG
MARÇO 2019

RAQUEL ANDRADE RODRIGUES

FATORES DETERMINANTES DA PREVALÊNCIA E DIVERSIDADE DE HEMOSPORÍDEOS EM AVES SILVESTRES NO NORDESTE BRASILEIRO: UM ESTUDO TEMPORAL

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Protozoologia.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Érika Martins Braga

Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Patrícia de Abreu Moreira

BELO HORIZONTE – MG
MARÇO 2019

“And now that you don’t have to be perfect, you can be good.”

(John Steinbeck, East of Eden)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me dar forças para superar as dificuldades que me foram impostas ao longo do caminho e com as quais pude crescer a cada dia.

Ao Fred, por sempre me apoiar e me incentivar em todas as minhas escolhas, por ter paciência e compreensão diante da minha ausência nestes anos e por todo o amor a mim dedicado.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e por terem me ensinado desde cedo que a educação é o maior de todos os tesouros que podemos carregar na vida.

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados pela amizade, carinho e apoio sempre.

À minha orientadora, professora Érika Martins Braga, por me orientar e incentivar ao longo desses quatro anos. Agradeço pela confiança e por me dizer que tudo ia dar certo, mesmo quando tínhamos que lidar com projetos frustrados e falta de verba para coletas.

À minha co-orientadora, professora Patrícia de Abreu Moreira, cuja generosidade me permitiu ter os dados para escrever essa tese. Agradeço por compartilhar comigo seus conhecimentos e seu tempo em inúmeras reuniões e telefonemas.

Aos inúmeros colegas que são ou foram parte do Laboratório de Malária ao longo desses quatro anos. Agradeço especialmente ao Chiquinho e à Dani que me ensinaram pacientemente a fazer todas as análises moleculares e pelas discussões de artigos que ajudaram muito no meu aprendizado, e a todos os integrantes do “Grupo Malária Aviária” por me ajudarem nos longos meses de trabalho de bancada. Aos demais colegas de laboratório, muito obrigada pelas discussões nos seminários e pelos momentos de aprendizado e descontração durante todo esse período de doutorado.

Aos inúmeros colaboradores que tornaram este trabalho possível, ao Gabriel Félix, ao Rodrigo Massara e à Larissa Bailey pelo aprendizado e pela ajuda com as análises estatísticas e ao professor Mauro Pichorim e toda a equipe do LabOrnito da UFRN pela sua ajuda valiosa nos trabalhos de campo e laboratório.

Aos grandes amigos que tive a sorte de conhecer nesses quatros anos, Gabi, Wagner, Letícia, Eduardo, Agna e Jamila que foram minha família em BH e tornaram mais leve a saudade de casa, e com os quais pude compartilhar os desafios e preocupações vividos na pós-graduação.

Aos familiares e amigos que me acolheram em BH, em especial a Zezé, Batista e família que abriram as portas de sua casa e me receberam com muito carinho nos meses iniciais do doutorado.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, especialmente à Sibele e Sumara, pelo suporte ao longo do doutorado.

Ao Centro de Lançamento Barreira do Inferno, pela permissão para acesso à área de estudo e ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação das Aves Silvestres pela disponibilização das anilhas para as aves.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado e ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Marcos Robalinho Lima, Prof. Dr. Cristiano Schetini de Azevedo, Prof. Dr. Ricardo Ribeiro de Castro Solar e Dra. Ana Maria de Oliveira Paschoal, por aceitarem prontamente o convite para a avaliação deste trabalho e pelas valiosas contribuições para a melhoria deste.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

A relação parasito-hospedeiro é uma complexa interação em que os parasitos podem influenciar populações e comunidades de hospedeiros e, por outro lado, fatores relacionados ao hospedeiro podem também ter influência na prevalência e capacidade de infecção dos parasitos. Um bom modelo para estudos da dinâmica de interação parasito-hospedeiro e do papel dos parasitos na evolução da história de vida dos seus hospedeiros são os hemosporídeos aviários - parasitos com alta diversidade que infectam uma ampla gama de aves por todo o mundo. O presente estudo investigou os fatores que influenciam a interação entre hemosporídeos e aves, determinando (i) como fatores ecológicos e traços de história de vida das aves hospedeiras podem influenciar na capacidade de infecção e na prevalência dos parasitos, e (ii) como os parasitos podem afetar o comportamento e a sobrevivência das aves hospedeiras. As aves foram capturadas ao longo de 24 meses em uma área de Restinga preservada no Centro de Lançamento Barreira do Inferno (CLBI), Rio Grande do Norte, com o auxílio de redes de neblina e foram avaliadas para presença de *Plasmodium*/*Haemoproteus* através de análise molecular. Inicialmente, testamos se a prevalência de *Plasmodium* e *Haemoproteus* estaria relacionada às características individuais e traços espécie-específicos do hospedeiro e aos fatores climáticos da área de estudo. Detectamos uma prevalência de 22,3% e 27 linhagens de hemosporídeos infectando as 1.443 aves analisadas. A prevalência de *Plasmodium* foi positivamente influenciada pela temperatura, o que pode refletir a abundância de vetores (culicídeos) na área de estudo. Aves migratórias apresentaram menor probabilidade de infecção por *Haemoproteus*, mas não por *Plasmodium*, sugerindo maior especificidade das linhagens de *Haemoproteus* para aves residentes na área de estudo. Dentre as infecções por *Haemoproteus* detectadas, observou-se forte interação entre a espécie de ave pipira-preta (*Tachyphonus rufus*) e a linhagem de *H.* (*Parahaemoproteus*) TARUF02, o que nos levou a explorar quais fatores influenciaram a sobrevivência e a captura da pipira-preta e a prevalência e probabilidade de infecção deste hospedeiro por *Haemoproteus*. A probabilidade de sobrevivência foi ~10% menor em aves infectadas que estavam se reproduzindo quando comparado às aves não infectadas fora do período reprodutivo. Estas observações sugerem que mesmo aves cronicamente infectadas por *Haemoproteus* podem sofrer impactos substanciais na sua sobrevivência. As aves apresentaram uma probabilidade 14% maior de captura quando infectadas, sugerindo que a infecção por *Haemoproteus* possa causar mudanças de comportamento tornando-as mais suscetíveis à captura pelas redes. A comunidade de parasitos hemosporídeos de aves no CLBI amplia a compreensão sobre a distribuição e riqueza de hemosporídeos aviários, examina fatores ecológicos e traços do hospedeiro que influenciam a dinâmica de infecção no ambiente natural e demonstra a natureza complexa e variável desse sistema parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

The host-parasite relationship is a complex interaction in wich parasites can influence host populations and communities, but, on the other hand factors related to the host may also influence the prevalence and infectivity of the parasites. A good model for the study of parasite-host interaction dynamics and the role of parasites in the evolution of the life history of their hosts are avian haemosporidian - parasites with high diversity that infect a wide range of birds worldwide. Therefore, the present study explored the factors that influence the parasite-host interaction in natural environment, exploring (i) how ecological factors and birds' life-history traits may influence parasites' infection probability and prevalence, and (ii) how parasites can affect behavior and survival of their hosts. The birds were captured over 24 months using mist-nets in a tropical coastal vegetation region, named *Restinga* - a type of vegetation of the Atlantic Forest biome – located in Barreira do Inferno Rocket Launch Center (CLBI) of the Brazilian Air Force, in Parnamirim, State of Rio Grande do Norte. Initially, we tested whether the prevalence of *Plasmodium* and *Haemoproteus* is related to individual characteristics and species-specific traits of the hosts, and environmental factors of the study area. We detected a prevalence of 22.3% and 27 haemosporidian lineages infecting the 1,443 birds captured. *Plasmodium* prevalence was positively influenced by temperature, which may be related to its influence on vectors (Diptera: Culicidae) abundance in the study area. Migratory birds were less likely to be infected by *Haemoproteus*, but not by *Plasmodium*, which may indicate that *Haemoproteus* lineages detected should display higher specificity to CLBI resident birds. Among the *Haemoproteus* infections detected, there was a strong interaction between the white-lined tanager (*Tachyphonus rufus*) and the lineage *H.* (*Parahaemoproteus*) TARUF02, which led us to explore which factors influence the survival and capture of white-lined tanager, and the prevalence and probability of infection of this host by *Haemoproteus*. The survival probability was ~10% lower in infected birds that were breeding when compared to uninfected and non-breeding birds. This result indicates that even birds chronically infected by *Haemoproteus* may suffer substantial impacts on their survival and *fitness*. Birds were 14% more likely to be caught by mist-nets when infected, suggesting a change in behavior of infected birds that make them more susceptible to capture by nets. The avian haemosporidian community in CLBI adds new information on the distribution and richness of avian haemosporidian, depicting the ecological factors and host traits that influence the dynamics of infection in the natural environment, and demonstrates the complex and variable nature of this host-parasite system.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Fatores determinantes da prevalência e riqueza de hemosporídeos: um estudo temporal de comunidades de aves e parasitos no nordeste brasileiro

Tabela 1. Seleção por *Backward* dos efeitos principais influenciando a probabilidade da infecção por *Plasmodium* spp. A estrutura aleatória completa foi mantida em todos os modelos. O modelo *Plas.Glmm1* começa com todos os efeitos principais (fatores fixos), que são removidos sequencialmente. Em cada passo, removemos o efeito principal que explicava a menor quantidade de desvio (indicado na coluna Fatores fixos). O procedimento é repetido até que nenhum efeito possa ser removido sem causar perda significativa de ajuste do modelo (indicado pela coluna do valor de p). Nesse caso, isso ocorre somente quando a temperatura é removida do modelo.....24

Tabela 2. Os parâmetros dos modelos mínimos (GLMM binomiais) explicando a probabilidade de infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) spp. Ambos os modelos têm a mesma estrutura aleatória (ver tabelas 1,3 e 4).....24

Tabela 3. Seleção por *Backward* dos efeitos principais que influenciam a probabilidade de infecção por *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) spp. A estrutura aleatória completa foi mantida em todos os modelos. O modelo *Para.Glmm1* começa com todos os efeitos principais (fatores fixos), que são removidos sequencialmente. Em cada passo, removemos o efeito principal que explica a menor quantidade de desvio (indicado na coluna Fatores fixos). O procedimento é repetido até que nenhum efeito possa ser removido sem causar perda significativa de ajuste do modelo (indicado pela coluna do valor de p). Nesse caso, isso ocorre apenas quando o *status* migratório é removido do modelo, embora a melhora no desvio proporcionada pela massa corporal e período reprodutivo seja marginalmente significativa, indicando um possível papel desses fatores na probabilidade de infecção pelo *H*. (*Parahaemoproteus*).....25

Tabela 4. Correlação intra-classe ajustada (ICCadj) de fatores temporais e taxonômicos, aqui considerados como dois níveis da estrutura aleatória dos modelos construídos para analisar os fatores que predizem a probabilidade de infecção por *Plasmodium* e *Haemoproteus* em uma comunidade de aves no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil.....26

Tabela 5. Distribuição de linhagens de *Plasmodium* entre as espécies de aves capturadas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. O número de indivíduos capturados para cada espécie é indicado entre parênteses.....28

Tabela 6. Distribuição de linhagens de *Haemoproteus* entre as espécies de aves capturadas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. O número de indivíduos capturados para cada espécie é indicado entre parênteses.....30

CAPÍTULO 2 - Probabilidades de sobrevivência e captura da pipira-preta (*Tachyphonus rufus*) são influenciadas por *Haemoproteus*

Tabela 1. Resultados da seleção de modelos para modelos multi-estado com incerteza de estado ajustados aos dados de marcação e recaptura de uma população de pipira-preta no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Foram mantidas as estruturas de modelo mais parcimoniosas para cada um dos parâmetros de interesse seguindo os passos mostrados abaixo. Primeiro, a probabilidade de captura (*p*) foi modelada em função do parasito alvo, da época de reprodução e do sexo, usando uma estrutura geral para os demais parâmetros do modelo. Mantendo a estrutura de probabilidade de captura melhor suportada, a prevalência do parasito alvo (ω) foi modelada em função da estação reprodutiva e do sexo. Mantendo a estrutura de prevalência melhor suportada, a probabilidade de sobrevivência mensal (*S*) foi modelada como função do parasito alvo, da época de reprodução, do sexo e explorou-se a presença de aves transitórias. Finalmente, a probabilidade de uma ave passar de um estado não infectado para um estado infectado (Ψ^{NI}) foi modelada em função da estação reprodutiva e do sexo. O parâmetro *pi* é definido como a proporção de indivíduos liberados pela primeira vez no estado *u* que foram infectados pelo parasito alvo. O parâmetro Delta estima a probabilidade de se classificar/observar corretamente o estado dado que o indivíduo foi infectado (*I*) ou não infectado (*N*) pelo parasito alvo. O sinal de mais (+) significa um efeito aditivo entre duas ou mais covariáveis testadas e o ponto (.) significa nenhum efeito da covariável nos parâmetros de interesse.....57

Tabela 2. Indivíduos de pipira-preta capturados ao longo de 21 meses de estudo (abril de 2013 a dezembro de 2014) e seu estado de infecção por *Plasmodium* ou *Haemoproteus* detectado a partir do sequenciamento do gene mitocondrial do citocromo *b* destes parasitos. C = primeira captura do indivíduo; R1-R8 = recapturas; M/A = mês/ano em que a ave foi capturada; P = diagnóstico positivo sem identificação de linhagem; N = diagnóstico negativo; ND = positivo em uma captura anterior, mas não detectado no evento atual; TARUF02 = linhagem *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) TARUF02; PAMIT01 = linhagem *Plasmodium* PAMIT01; PADOM11 = linhagem *Plasmodium* PADOM11; UN203 = linhagem *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) UN203; BAFLA04 = linhagem *Plasmodium* BAFLA04.....61

Tabela 3. Linhagens de hemosporídeos detectadas em indivíduos de pipira-preta *Tachyphonus rufus* amostradas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. A= número de amostras nas quais esta linhagem foi detectada (incluindo recapturas); I = número de indivíduos infectados....65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Fatores determinantes da prevalência e riqueza de hemosporídeos: um estudo temporal de comunidades de aves e parasitos no nordeste brasileiro

Figura 1. Mapa da área do estudo, situada no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, onde se amostrou uma comunidade de aves infectadas por *Plasmodium* e *Haemoproteus*.....15

Figura 2. Climatograma representando as temperaturas médias mensais e a precipitação mensal total durante o período de estudo no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Dados climáticos obtidos através do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, coletados na Estação Meteorológica de Natal.....15

Figura 3. Inferência filogenética bayesiana representando a distribuição sazonal das linhagens de hemosporídeos detectadas em uma comunidade de aves do Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Os números localizados próximos aos ramos indicam os valores de probabilidade posterior. O comprimento dos ramos é ilustrado de acordo com o número de alterações de nucleotídeos (ver escala). As linhagens detectadas pela primeira vez estão sublinhadas. Siglas que precedem os nomes das linhagens: p. = *Plasmodium* spp.; h.h. = *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) spp.; h.p. = *H.* (*Parahaemoproteus*) spp. Grupo externo= *Leucocitozoon caulleryi*. Os clados HA e HB englobam as linhagens de *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) e *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*), respectivamente. Os clados PA e PB englobam as linhagens de *Plasmodium*. Os números nos círculos representam os diferentes clados avaliados.....32

CAPÍTULO 2 - Probabilidades de sobrevivência e captura da pipira-preta (*Tachyphonus rufus*) são influenciadas por *Haemoproteus*

Figura 1. Probabilidades mensais de sobrevivência de indivíduos de pipira-preta de acordo com a estação reprodutiva e a infecção por *Haemoproteus* TARUF02, Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil.....66

Figura 2. Climatograma representando as temperaturas médias mensais e a precipitação mensal total durante o período de estudo no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil.....70

LISTA DE APÊNDICES

CAPÍTULO 1 - Fatores determinantes da prevalência e riqueza de hemosporídeos: um estudo temporal de comunidades de aves e parasitos no nordeste brasileiro

Tabela S1. Espécies de aves capturadas com redes de neblina no período de Abril de 2013 a Março de 2015 no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, RN, através. Os traços de cada espécie foram obtidos na literatura. Os tipos de dieta principais das espécies incluem: I = insetívoro, O = onívoro, F = frugívoro, N = nectarívoro, G = granívoro.....44

Tabela S2. Aves migratórias capturadas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Rio Grande do Norte, Brasil. O *status* de infecção, gênero e linhagens dos parasitos, quando identificados, são indicados. O tamanho amostral e o número de infecções detectadas em cada espécie de ave, além do número de aves infectadas por cada linhagem, estão indicados entre parênteses. Como não foram sequenciadas todas as infecções diagnosticadas, o número de aves da coluna "*Status* de infecção" pode não ser equivalente ao número da coluna "Linhagem".....46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Hemosporídeos aviários como um modelo de estudo 2

1.2. Ciclo biológico do *Plasmodium* 4

2.3. Ciclo biológico do *Haemoproteus* 5

2. JUSTIFICATIVA 7

3. OBJETIVOS 9

3.1. Objetivo geral 9

3.2. Objetivos específicos 9

CAPÍTULO 1 - Fatores determinantes da prevalência e riqueza de hemosporídeos: um estudo temporal de comunidades de aves e parasitos no nordeste brasileiro 10

1. INTRODUÇÃO 11

2. MATERIAIS E MÉTODOS 14

2.1. Área de Estudo 14

2.2. Amostragem das aves 16

2.3. Extração e quantificação de DNA total obtido de sangue das aves amostradas 16

2.4. Diagnóstico molecular da infecção por *Plasmodium*/*Haemoproteus* 17

2.5. Análise da riqueza genética de *Plasmodium* e *Haemoproteus* 18

2.6. Modelagem dos fatores preditores da prevalência de malária nas aves 21

3. RESULTADOS 23

3.1. Prevalência geral de hemosporídeos na comunidade de aves amostrada 23

3.2. Fatores preditores da prevalência de hemosporídeos 23

3.3. Riqueza de hemosporídeos 27

4. DISCUSSÃO 33

5. CONCLUSÃO 36

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37

7. APÊNDICES 44

CAPÍTULO 2 - Infecção crônica por *Haemoproteus* reduz a sobrevivência e aumenta a probabilidade de captura de pipira-preta (*Tachyphonus rufus*) 47

1. INTRODUÇÃO 48

2. MATERIAIS E MÉTODOS 52

2.1. Características da espécie hospedeira, *Tachyphonus rufus*, e área de estudo 52

2.2. Amostragem das aves 52

2.3. Detecção molecular dos parasitos 53

2.4. Modelagem dos parâmetros do modelo como uma função das variáveis preditoras . 53

3. RESULTADOS 60

4. DISCUSSÃO 67

5. CONCLUSÃO 72

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

4. CONCLUSÕES GERAIS 80

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

6. MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA SCIENTIFIC REPORTS 87

1. INTRODUÇÃO

Os parasitos estão intimamente ligados aos seus hospedeiros em uma interação trófica cujos impactos devem variar desde efeitos subletais que impactam o *fitness* do hospedeiro até o declínio e extinção de populações (van Riper III et al. 1986; Atkinson et al. 1995, 2000; Ortego et al. 2008; Knowles et al. 2010; Cannell et al. 2013; Vanstreels et al. 2014; Asghar et al. 2015; Dinhopl et al. 2015). A caracterização dos custos do parasitismo é, em muitos casos, dificultada pela grande diversidade de parasitos dentro de uma mesma espécie, a qual pode abranger diversas linhagens mais ou menos virulentas, podendo ter efeitos que variam em diferentes hospedeiros (Poulin & Morand, 2000). De forma geral, a interação ocorre em uma variedade de escalas organizacionais que se estendem desde o nível individual, como efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro e a evasão do parasito, até a estruturação de comunidades e influência dos patógenos no *fitness* de seus hospedeiros, podendo, assim, constituir uma força seletiva atuando em populações naturais (Hudson et al. 2002; Poulin 2007). Desta forma, fica evidente que os parasitos possam ter efeitos que vão além de seus hospedeiros individuais, já que podem afetar direta e indiretamente as relações intra e interespecíficas que estruturam as populações e comunidades. De fato, parasitos podem alterar as interações interespecíficas como a competição e a predação, possibilitando, assim, desempenhar papel determinante na coexistência de espécies e na biodiversidade (Hatcher et al. 2006).

Da mesma forma que os parasitos influenciam as populações e comunidades de hospedeiros, diversos fatores podem ter influência sobre a infecção e prevalência dos parasitos. O contexto ecológico das interações parasito-hospedeiro pode afetar a transmissão e a persistência da infecção no ambiente silvestre (Wood et al. 2007) e fatores ambientais como sazonalidade (Cosgrove et al. 2008; Hamilton et al. 2009; Ferreira Junior et al. 2017), desmatamento (Chasar et al. 2009) e temperatura (Mouritsen & Jensen, 1997; Møller, 2010) têm sido associados ao risco de infecção por parasitos. A sazonalidade está relacionada tanto às mudanças comportamentais e fisiológicas das aves (período reprodutivo, por exemplo), quanto à abundância dos vetores, os quais, de forma geral, tem sua reprodução afetada pelos fatores climáticos, como temperatura e pluviosidade (Patz et al. 2000). A temperatura afeta ainda o desenvolvimento dos parasitos nos vetores e a frequência com que estes realizam o

repasto sanguíneo (Beier 1998; Patz et al. 2000). Além disso, alterações ambientais, como o desmatamento, podem alterar tanto os aspectos climáticos como também ser um fator estruturante da composição da comunidade de aves, já que algumas aves podem ser favorecidas pela abertura de clareiras e criação de pastos, por exemplo, enquanto outras espécies mais sensíveis não conseguiriam sobrevivem em ambientes modificados (Kofron and Chapman 1995; Brown and Sullivan 2005). Fatores relacionados ao hospedeiro são também relacionados à sua probabilidade de infecção e sobrevivência. Aves de sexos (Poulin 1996; Mccurdy et al. 1998; Calero-Riestra and García 2016) e tamanhos diferentes (Sutcliffe 1986; Atkinson and Van Riper III 1991; Scheuerlein and Ricklefs 2004) podem apresentar maior ou menor suscetibilidade à infecção pelo parasito, quer seja por diferenças comportamentais, fisiológicas ou pela maior atração que exercem sobre os vetores. Em parasitos transmitidos por vetores, devem ser consideradas ainda as características ambientais que limitam a abundância do vetor e a distribuição espacial e temporal destes (Sol et al. 2000). Estudos com *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, agente causador de malária em humanos, revelaram que as taxas de transmissão são, em grande parte, governadas por fatores ambientais, como altitude ou proximidade da água, os quais restringem a distribuição dos mosquitos vetores (Foley et al. 2003; Balls et al. 2004).

1.1. Hemosporídeos aviários como um modelo de estudo

Os hemosporídeos, como a malária, fazem parte de um grupo de protistas heteroxenos obrigatórios que podem infectar anfíbios, répteis, aves e mamíferos e usam dípteros hematófagos como vetores (Valkiunas 2005). Esses parasitos estão distribuídos em quase todo o mundo, estando ausentes apenas na Antártica (Vanstreels et al. 2013), e se diferem em sua gama de hospedeiros, distribuição geográfica, vetores e patogenicidade (Atkinson et al. 2008). A malária aviária foi há anos um importante modelo para o estudo da infecção de malária em humanos (Valkiunas 2005; Braga et al. 2011). Hoje, porém, as infecções por hemosporídeos em aves são frequentemente usadas como um modelo para estudos ecológicos e epidemiológicos, investigação das dinâmicas de interação parasito-hospedeiro, processos de coevolução e o papel de parasitos na evolução da história de vida dos seus hospedeiros (Lapointe et al. 2012).

Dentre os gêneros de hemosporídeos capazes de infectar aves, os mais estudados no Brasil são *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Esses parasitos infectam diferentes espécies

de aves com consequências que incluem efeitos subletais no *fitness* do hospedeiro (Ortego et al. 2008; Knowles et al. 2010), óbito de indivíduos naturalmente infectados (Cannell et al. 2013; Vanstreels et al. 2014; Dinhopl et al. 2015), e até mesmo o declínio e extinção de populações (van Riper III et al. 1986; Atkinson et al. 1995, 2000). A infecção pelos parasitos da malária consiste de duas fases - aguda e crônica. Na fase aguda da infecção, a qual ocorre logo após uma ave suscetível ser infectada, observam-se altas parasitemias. Entre os sinais clínicos verificados no hospedeiro nessa primeira fase estão letargia, anemia, penas eriçadas (Valkiunas, 2005; Lapointe *et al.*, 2012), aumento e enegrecimento de baço, fígado e rim devido à extensa deposição de pigmento da malária, e redução da massa e gordura corporal, podendo levar a ave à morte (Yorinks & Atkinson, 2000). Aves com infecção aguda podem apresentar ainda dificuldade para forragear e escapar de predadores (Yorinks & Atkinson, 2000).

A fase aguda é frequentemente seguida por um rápido declínio da intensidade da infecção que caracteriza uma fase crônica, pois anticorpos e respostas mediadas por células desenvolvem-se contra os parasitos, além de ocorrer a remoção das hemácias infectadas do sangue pelo baço (Cornet & Sorci 2014). Na fase crônica, a intensidade da infecção parece ser influenciada pela complexa interação de hormônios associados à reprodução, fotoperíodo sazonal e imunidade do hospedeiro (Lapointe et al. 2012). Essa fase da infecção por hemosporídeos é geralmente subclínica com efeitos em longo prazo, e pode persistir por toda a vida das aves infectadas, mantendo baixas intensidades (Bishop et al. 1938; Lapointe et al. 2012). Nesse cenário, os parasitos circulantes e os merontes exoeritrocíticos persistentes podem servir como uma fonte para a recrudescência de infecções (Beaudoin et al. 1971; Cranfield et al. 1994). A maioria das aves capturadas em estudos no ambiente silvestre está na fase crônica da infecção, a qual apresenta efeitos negativos na performace do hospedeiro que são difíceis e, em muitos casos, indetectáveis em estudos não experimentais (Valkiunas 2005; Woodworth et al. 2005; Valkiūnas et al. 2006).

Embora existam numerosos relatos de aves com infecções agudas seguidas de efeitos patogênicos associados à malária, casos de epizootias são raros e, frequentemente associados a aves cativas em coleções zoológicas e novas associações de parasito-hospedeiro após a introdução de parasitos ou mosquitos em ilhas remotas (Atkinson et al. 2008). Um exemplo clássico se refere à introdução acidental de

Plasmodium relictum e *Culex quinquefasciatus* nas ilhas do Havaí, devastando quase metade da avifauna nativa e limitando a distribuição das espécies remanescentes a altitudes mais elevadas, onde o mosquito vetor não consegue se dispersar (Warner 1968; van Riper III et al. 1986). Entretanto, é importante ressaltar que há pouca evidência de mortalidade em populações de aves silvestres que têm uma longa associação evolutiva com os parasitos. Mas, não se pode descartar o aumento de evidências de que a malária pode ter efeitos significativos no *fitness* do hospedeiro (Lachish et al. 2011), incluindo seleção de parceiros, através da alteração da cor das penas e canto dos machos, por exemplo (Hamilton and Zuk 1982; Spencer et al. 2005); redução do sucesso reprodutivo (Merino et al. 2000; Marzal et al. 2005); e tempo de vida, pela redução do tamanho dos telômeros e da probabilidade de sobrevivência (Puente et al. 2010; Asghar et al. 2015).

1.2. Ciclo biológico do *Plasmodium*

Os mosquitos hematófagos são os vetores dos parasitos do gênero *Plasmodium*. Estes insetos, pertencentes à família Culicidae, integram um grupo de artrópodes da ordem Diptera que habitam ambientes de água doce em seus estágios iniciais de desenvolvimento (Rueda 2008). Representam os principais insetos vetores de doenças e algumas espécies têm a capacidade de transportar muitos patógenos diferentes (WHO 2016), os quais são transmitidos aos seus hospedeiros pelas fêmeas dos mosquitos durante o repasto sanguíneo (Consoli & Oliveira, 1994).

O ciclo do *Plasmodium* no mosquito se inicia quando este se alimenta em uma ave infectada e ingere as formas sexuadas do parasito, denominadas macro e microgametócitos. No intestino médio do mosquito essas formas se diferenciam em macro e microgametas, respectivamente, os quais se fundem e formam zigotos móveis, ou oocinetos, que rompem a membrana peritrófica formada no intestino do inseto, atravessam o epitélio intestinal e se encistam na membrana basal do intestino, formando os oocistos. Através do processo de esporogonia são formados os esporozoítos que, com o rompimento do oocisto, seguem em direção às suas glândulas salivares. Os esporozoítos atravessam o parênquima da glândula salivar atingindo os ductos salivares onde permanecem até que o mosquito realize um novo repasto, infectando, assim, o hospedeiro vertebrado (Valkiunas 2005).

O hospedeiro vertebrado ao ser picado pelo mosquito infectado é inoculado com os esporozoítos, que penetram nas células do sistema reticular de vários órgãos, incluindo a pele, e dão origem à primeira geração de merontes exoeritrocíticos primários (criptozoítos). Os merozoítos desenvolvidos pelos criptozoítos induzem a segunda geração de merontes exoeritrocíticos primários (metacriptozoítos), que se desenvolvem nos macrófagos de diversos órgãos. Os metacriptozoítos possuem maior número de merozoítos que os criptozoítos. Os merozoítos formados dos metacriptozoítos são capazes de infectar as células eritrocíticas. Estes merozoítos podem reinfectar macrófagos tissulares e se desenvolverem em novos metacriptozoítos ou em fanerozoítos (merogonia exoeritrocítica secundária); ou podem invadir células eritrocíticas, onde ocorrem os processos de merogonia eritrocítica e gametogonia, que aparecem simultaneamente na corrente sanguínea. O meronte eritrocítico é formado após a invasão dos merozoítos, que se desenvolvem (recebem o nome de trofozoíto nessa fase) e então se dividem assexuadamente. Parte dos merozoítos formados nesse processo invade outros eritrócitos dando origem aos gametócitos, enquanto outra parte penetra nas células endoteliais de diversos órgãos, incluindo o cérebro, iniciando a merogonia exoeritrocítica secundária (fanerozoítos). Os fanerozoítos e os merozoítos eritróciticos mantém a parasitemia durante os estágios crônicos da infecção. Em adição, os fanerozoítos são os responsáveis pelas recaídas da infecção (Valkiunas 2005).

2.3. Ciclo biológico do *Haemoproteus*

Os parasitos do gênero *Haemoproteus* são divididos em dois subgêneros, *Haemoproteus e Parahaemoproteus*, os quais se diferenciam em seus hospedeiros vertebrados e seus vetores. O subgênero *Haemoproteus* infecta naturalmente hospedeiros vertebrados da ordem Columbiformes (Valkiunas 2005), que inclui as pombas e rolinhas, além de aves marinhas das ordens Suliformes (Work & Rameyer 1996; Padilla et al. 2006; Levin & Parker 2012) e Charadriiformes (Levin et al. 2012). Os vetores desse subgênero são os dípteros da família Hippoboscidae. As moscas hipoboscídeas tem desenvolvimento larval no interior do corpo da fêmea até o terceiro ínstar larval, quando esta é depositada e empupa quase imediatamente (Baker 1967). Quando se tornam adultos, ambos os sexos dos Hippoboscidae se alimentam exclusivamente de sangue (Baker 1967). O subgênero *Parahaemoproteus*, por sua vez, pode infectar aves de diversas ordens e tem como vetores os dípteros da família

Ceratopogonidae (Valkiunas 2005). Os ceratopogonídeos são insetos pequenos, geralmente com menos de 1,5 mm de comprimento, e possuem picada extremamente dolorosa (Lehane 2005). Somente as fêmeas realizam hematofagia e sua postura é feita em áreas úmidas e ricas em matéria orgânica, como áreas de mangue, ocos de árvore e bromélias (Mellor et al. 2000).

O ciclo biológico do *Haemoproteus* no inseto vetor é semelhante ao ciclo do *Plasmodium*. No hospedeiro vertebrado, o ciclo se inicia quando os esporozoítos presentes na glândula salivar do inseto vetor são inoculados no hospedeiro. Em seguida, ocorre a merogonia exoeritrócitica no endotélio vascular de diferentes tecidos como pulmões, rins, fígado, baço e musculatura esquelética. Após duas gerações de merogonia exoeritrócitica, os merozoítos desenvolvidos penetram em eritrócitos dando origem aos gametócitos. A merogonia não ocorre nas células sanguíneas, somente os gametócitos se desenvolvem em eritrócitos, sendo as únicas formas evolutivas visualizadas em esfregaço sanguíneo (Valkiunas 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Hospedeiros e seus parasitos são um excelente modelo de estudo para a compreensão de interações parasito-hospedeiro e avaliação dos seus possíveis efeitos na dinâmica das populações envolvidas. Essas interações entre espécies são moduladas por inúmeros fatores que determinam o sucesso de um parasito em infectar o seu hospedeiro, os quais compreendem características do hospedeiro (fatores fisiológicos), do parasito (como sua forma de transmissão) e até mesmo do ambiente abiótico (como o clima). O estudo das populações e comunidades de aves tropicais e seus parasitos hemosporídeos permite uma eficiente investigação do papel das características individuais e espécie-específicas das aves nas probabilidades de infecção por patógenos transmitidos por vetores. A dinâmica de infecção de aves por hemosporídeos no ambiente natural é resultado de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos que podem operar em pequenas escalas espaciais. Os hemosporídeos são um excelente modelo para estudos da dinâmica de interação parasito-hospedeiro devido à grande diversidade desse grupo, sua ampla gama de hospedeiros em todo o mundo e à variação substancial na prevalência entre as espécies hospedeiras, mesmo dentro de uma mesma comunidade de hospedeiros. A variação da prevalência de hemosporídeos entre regiões e entre diferentes ambientes dentro destas regiões como um resultado de diversos fatores que influenciam na transmissão e persistência da infecção no ambiente silvestre reforça que a amostragem de hemosporídeos aviários em ambientes pouco estudados tem implicações importantes no entendimento da ecologia e evolução dos hemosporídeos numa escala biogeográfica mais ampla. Diante disso, estudos locais de hemosporídeos aviários são valiosos para estimar a variação temporal e entre espécies hospedeiras na prevalência, bem como para quantificar a especificidade por hospedeiro desses parasitos por evitarem o fator potencialmente confundidor de variação espacial nestas propriedades ecológicas.

As Restingas representam uma fitofisionomia da Mata Atlântica que ocorre ao longo de toda a costa brasileira. Esses ambientes abrigam uma diversa avifauna e geralmente se situam em importantes rotas de aves migratórias representando, portanto, um ambiente interessante, porém, ainda inexplorado para a investigação de interações parasito-hospedeiro. Desta forma, um estudo de longo prazo de indivíduos hospedeiros que permita o acompanhamento da dinâmica de infecções por hemosporídeos aviários

em um habitat natural e protegido de alterações antrópicas torna-se uma valiosa oportunidade de se ampliar o entendimento do grau de generalidade da influência do ambiente ou da própria fisiologia ou comportamento do hospedeiro na interação entre hemosporídeos e aves em diferentes ambientes e comunidades já estudadas. Além disso, estudos de longo prazo são fundamentais para a compreensão das dinâmicas de interação parasito-hospedeiro e não têm sido explorados em trabalhos anteriores de malária aviária. Estudos de interação em comunidades locais nos permitem entender as peculiaridades de cada tipo ambiental, o que agrega importante conhecimento para formação da base teórica geral que servirá de instrumento para definição de estratégias de manejo, conservação e recuperação de espécies em ambientes naturais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os fatores que influenciam a interação parasito-hospedeiro no ambiente natural, observando como características das aves hospedeiras podem influenciar na capacidade de infecção e na prevalência dos parasitos e como estes podem afetar a probabilidade de captura e a sobrevivência das aves hospedeiras.

3.2. Objetivos específicos

a. Diagnosticar a infecção por hemosporídeos em aves silvestres de uma área de Restinga no nordeste brasileiro ao longo de um gradiente temporal, a partir da análise molecular dos parasitos.

b. Investigar o papel de fatores climáticos na probabilidade de infecção de aves por parasitos hemosporídeos.

c. Investigar o papel de características em nível individual e de traços da espécie hospedeira na probabilidade de infecção de aves por parasitos hemosporídeos.

d. Estimar a probabilidade de sobrevivência mensal de uma população de pipiras-pretas (*Tachyphonus rufus*, Thraupidae) em função da infecção por *Haemoproteus*, da estação reprodutiva e do sexo da ave.

e. Explorar a influência da estação reprodutiva e do sexo da pipira-preta na probabilidade de uma ave se tornar infectada por *Haemoproteus*.

f. Investigar a influência do *Haemoproteus*, da época de reprodução e do sexo da pipira-preta na probabilidade de captura de um indivíduo por redes de neblina.

g. Explorar a influência da estação e do sexo na prevalência de *Haemoproteus* em uma população silvestre de pipiras-pretas.

CAPÍTULO 1

Fatores determinantes da prevalência e riqueza de hemosporídeos: um estudo temporal de comunidades de aves e parasitos no nordeste brasileiro

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas emergentes são causadas por parasitos e patógenos que aumentam rapidamente sua faixa geográfica, gama de hospedeiros ou prevalência, e representam uma importante ameaça à saúde humana e da vida silvestre (Tompkins et al. 2015). Um fator comum às doenças emergentes é o envolvimento de várias espécies hospedeiras, vetoras ou parasitas em comunidades ecológicas complexas (Johnson et al. 2015). Vários fatores podem ser responsáveis pelo aumento das doenças emergentes, como a modificação de habitats por ação antrópica, a introdução de vetores e patógenos em novos ambientes e as alterações climáticas. Para se mitigar com êxito essas ameaças, torna-se necessária a identificação e compreensão dos fatores que promovem o aumento na prevalência e dispersão dessas doenças em seus hospedeiros.

Dentre as doenças com grande capacidade de se espalhar para novos ambientes e novos hospedeiros estão as infecções causadas pelos hemosporídeos aviários. Esses parasitos transmitidos por vetores são difundidos em aves de todos os continentes, com exceção da Antártica (Valkiunas 2005), são capazes de infectar uma ampla gama de espécies hospedeiras (Hellgren et al. 2009; Ricklefs et al. 2014), além serem capazes de infectar novas espécies hospedeiras ao longo de sua história evolutiva (Ricklefs et al. 2004, 2014). Os hemosporídeos podem exercer pressão seletiva em seus hospedeiros através de efeitos sobre o seu sucesso reprodutivo, tempo de vida e sobrevivência (Hamilton & Zuk, 1982; Scott, 1988; Spencer *et al.*, 2005; Asghar *et al.*, 2015), representando um importante fator modulador da estrutura de populações e comunidades de aves.

A prevalência, distribuição e riqueza de hemosporídeos variam amplamente entre as espécies hospedeiras (Ricklefs et al. 2005; Svensson-Coelho et al. 2013) e também podem ser moduladas por características ecológicas e da história de vida dos seus hospedeiros (Arriero & Møller 2008; Fecchio et al. 2013; Lutz et al. 2015; Matthews et al. 2015). Como exemplo, podemos citar alguns estudos que demonstraram que a altura e o tipo de ninho (Fecchio et al. 2011; Lutz et al. 2015; Matthews et al. 2015), bem como a altura de forrageamento (Laurance et al. 2013; Svensson-Coelho et al. 2013) podem influenciar a prevalência de hemosporídeos em aves devido ao aumento do contato entre vetor e hospedeiro (Cerný et al. 2011). O *status* migratório também pode influenciar a prevalência de hemosporídeos em aves. As espécies

migratórias estão expostas a diferentes faunas de vetores e parasitos devido à mudança de habitat durante seu ciclo anual, o que poderia tornar as espécies migratórias mais parasitadas do que as residentes (Møller & Erritzøe 1998; Waldenström et al. 2002). Fatores relacionados ao indivíduo hospedeiro, como idade (Atkinson et al. 1995) e filogenia (Fecchio *et al.*, 2017) também estão relacionados à suscetibilidade aos parasitos. Uma hipótese que relaciona a prevalência com a idade sustenta que a prevalência da infecção deve aumentar com ao longo da vida do indivíduo, como resultado do acúmulo de exposições aos parasitos (Ricklefs et al. 2005). A filogenia também pode ser um fator preditor da infecção, pois se sabe que há uma tendência de que um mesmo parasito infecte aves filogeneticamente mais próximas (Fecchio *et al.*, 2017). O ectoparasitismo é outro fator que pode afetar individualmente a probabilidade de infecção de um hospedeiro por hemosporídeos, pois gera estresse, e tem efeitos negativos sobre as condições corporais e resposta imune do indivíduo (Pryor and Casto 2017; Hoi et al. 2018), o que pode torná-lo mais susceptível à infecção por hemoparasitos.

Fatores abióticos e mudanças de habitat também podem influenciar a prevalência de hemosporídeos em uma comunidade de aves (Chasar *et al.*, 2009; Belo *et al.*, 2011; Lachish *et al.*, 2011; Ferreira Junior *et al.*, 2017). De fato, diversos estudos associaram o risco de infecção por hemosporídeos aviários a fatores ambientais como sazonalidade (Cosgrove et al. 2008; Ferreira Junior et al. 2017), desmatamento (Chasar et al. 2009) e temperatura (Møller 2010). Esses fatores ambientais podem influenciar diretamente os artrópodes, afetando a riqueza e a abundância dos vetores de *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Mudanças ambientais, tanto naturais quanto provocadas pelo homem, afetam o equilíbrio ecológico e o contexto no qual vetores e parasitos se reproduzem e transmitem doenças (Patz et al. 2000). Além disso, a prevalência de um parasito em uma determinada espécie hospedeira é fortemente influenciada pela proporção de hospedeiros suscetíveis na população e a proporção de hospedeiros que encontram o parasito, o que, por sua vez, é influenciado pela taxa de encontros entre vetor e hospedeiro (Hellgren et al. 2009; Medeiros et al. 2015). Inúmeros fatores, portanto, se interagem para determinar a prevalência dos parasitos nas aves, gerando resultados muito distintos entre estudos que testam as mesmas relações em diferentes comunidades de aves. Desta forma, faz-se necessário testar essas interações em

diferentes biomas, de forma a entender melhor os diversos fatores que se interagem e influenciam a dinâmica de infecção parasito-hospedeiro no ambiente natural.

Estudos locais de comunidades de hemosporídeos aviários permitiram estimar a variação da prevalência nas espécies hospedeiras e ao longo do tempo, bem como contribuir para o conhecimento sobre a diversidade e distribuição de hemosporídeos em diferentes ambientes ao redor do mundo (Lacorte et al. 2013; Svensson-Coelho et al. 2013; Lutz et al. 2015; Matthews et al. 2015; Ayadi et al. 2017). No Brasil, estudos nos últimos anos revelaram uma grande diversidade de parasitos em aves de diferentes ambientes (Belo et al. 2011; Fecchio et al. 2013; Lacorte et al. 2013; Ferreira Junior et al. 2017), mas o entendimento dos fatores que explicam a estrutura e distribuição desses parasitos ainda é incipiente. Apesar de ser um dos países mais ricos em espécies de aves do mundo (Piacentini et al. 2015) muitos ambientes naturais brasileiros ainda são inexplorados para estudos de malária aviária, cada um com sua avifauna e suas características ambientais particulares, fatores que devem ter um papel importante na determinação da diversidade e dinâmica da infecção por hemosporídeos em aves hospedeiras.

Um desses ambientes inexplorados em estudos com hemosporídeos no Brasil é a Restinga, uma vegetação costeira tropical distribuída em mosaico, e que ocorre em áreas de grande diversidade ecológica sob influência marinha e flúvio-marinha (Cerqueira 2000). Apesar de ser um tipo de vegetação do bioma Mata Atlântica, a Restinga possui características peculiares quanto à composição da flora e da fauna (Cerqueira 2000). Aqui nós estudamos os parasitos hemosporídeos de uma comunidade de aves em uma área de Restinga no nordeste do Brasil para testar se a prevalência de *Plasmodium* e *Haemoproteus* está relacionada a (1) características individuais do hospedeiro (idade, época de reprodução e presença de ectoparasitos), que podem influenciar os mecanismos de defesa imune do hospedeiro; (2) traços espécie-específicos (dieta, período de atividade, peso corporal médio das espécies, *status* de migração e tipo de ninho), as quais podem estar relacionadas com a exposição diferencial ao vetor; e (3) fatores climáticos (temperatura e precipitação) que podem influenciar a abundância e riqueza de vetores. Ao investigar quais fatores modulam a infecção por hemosporídeos em um bioma ainda inexplorado para estudos de

hemosporidioses podemos colocar esta relação a teste em um ambiente diferente, de forma a ver seu grau de generalidade em diferentes biomas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de Estudo

O estudo foi conduzido no Centro de Lançamento Barreira do Inferno (CLBI), uma base da Força Aérea Brasileira, localizada no município de Parnamirim (5°55'S 35°9'O), Estado do Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil e que abrange uma área protegida de ~ 1.800ha (Figura 1). A área de estudo está em uma região de Restinga, caracterizada pelo solo arenoso coberto por vegetação xerofítica, com predominância de plantas herbáceas e arbustivas, e classificada como Floresta Estacional Semidecidual. Três espécies de plantas têm elevada abundância no CLBI (*Myrcia ramuliflora*, *Maytenus erythroxyla* e *Byrsonima gardnerana*), mas a comunidade florística é dominada por espécies raras, com baixa abundância (para mais detalhes ver Silva *et al.*, 2015). Por ser uma área de acesso restrito, não há indícios de retirada de madeira ou queimadas. O clima é classificado como tropical, com verão seco e inverno chuvoso (Alvares et al. 2014). A temperatura média foi de 26,5°C e a precipitação total ficou em torno de 1.971,5 mm por ano durante o período do estudo (Figura 2). Desta forma, determinou-se como estação chuvosa o período que vai de março a setembro e como estação seca o período de outubro a fevereiro.

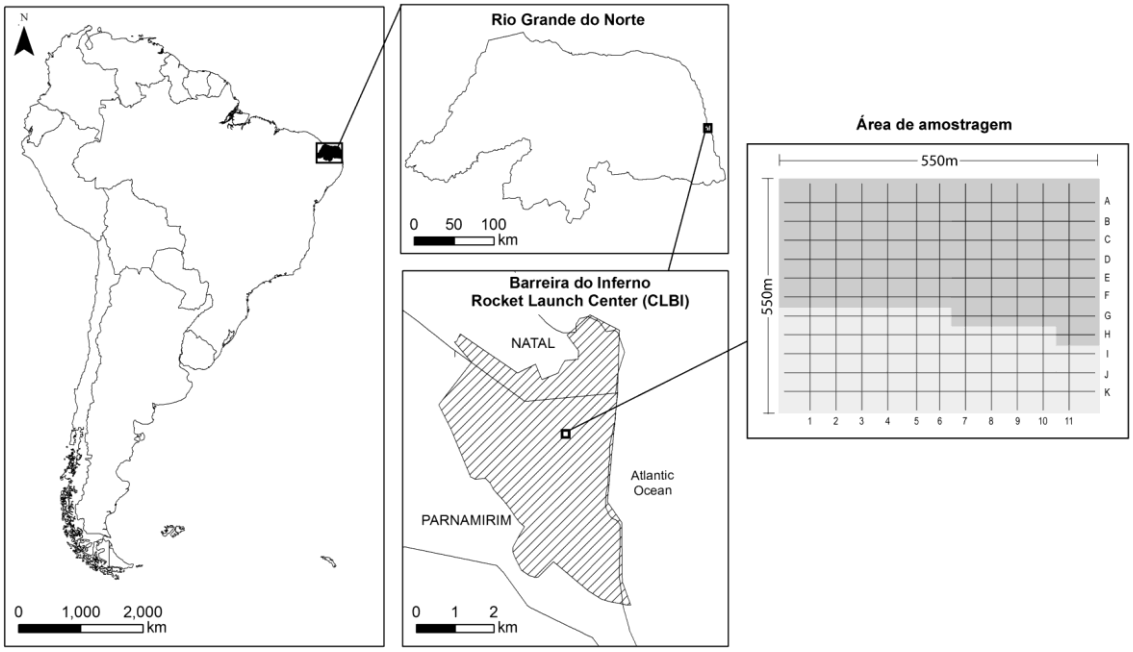

Figura 1. Mapa da área do estudo, situada no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, onde se amostrou uma comunidade de aves infectadas por *Plasmodium* e *Haemoproteus*.

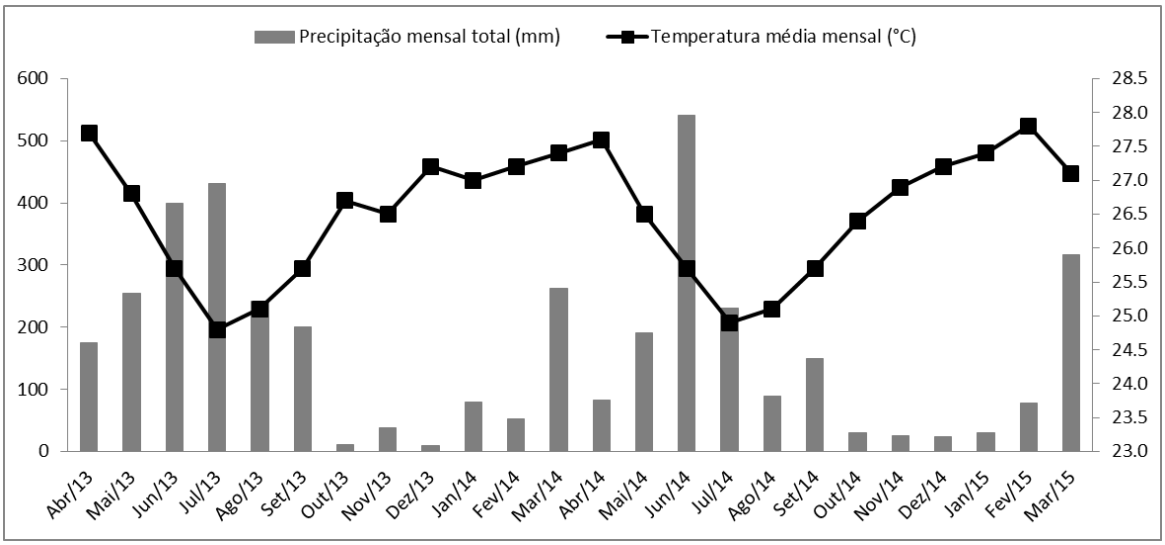

Figura 2. Climatograma representando as temperaturas médias mensais e a precipitação mensal total durante o período de estudo no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Dados climáticos obtidos através do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, coletados na Estação Meteorológica de Natal.

2.2. Amostragem das aves

O uso de redes de neblina e o anilhamento no trabalho de campo deste estudo foram aprovados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio e pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres - CEMAVE, permissão 3239. Foram utilizados os protocolos éticos padrão para animais silvestres. A captura das aves foi mantida pelo tempo mínimo e todos os espécimes foram liberados no mesmo lugar onde foram capturados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animal Experimentação (CETEA), Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (Protocolo #254/2011).

A infecção por hemosporídeos foi monitorada mensalmente em uma comunidade de aves dentro de uma parcela de 30 ha (550 m x 550 m) de abril de 2013 a março de 2015. As aves foram capturadas usando redes de neblina (Ecotone 18 m x 3 m, cinco bolsas e malha de 19 mm) montadas nas intersecções de 11 linhas horizontais e verticais espaçadas a intervalos de 50 m (121 pontos amostrados), sendo montada uma rede de neblina por ponto amostral (Figura 1). As amostragens foram realizadas em 36 a 49 pontos por mês de forma cíclica, de forma que todos os pontos fossem amostrados uma vez a cada três meses. As redes de neblina foram abertas às 4h50min, checadas a cada 30 minutos e fechadas às 9h50min, com um esforço amostral de 40 horas/rede em cada ponto amostral e um total de 4.840 horas/rede em todo o estudo (horas/rede = n° de redes x tempo de captura). As aves capturadas foram identificadas e marcadas em campo com anilhas metálicas individuais fornecidas pelo Centro de Pesquisas para Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE/ICMBio, permissão 3239). As aves recapturadas não foram utilizadas neste estudo. As aves foram avaliadas quanto à idade (adulto ou jovem), presença de placa de incubação e presença de ectoparasitos (presença ou ausência). O sangue das aves foi obtido através de punção da veia braquial com agulha estéril (13 mm x 4,5 mm), acondicionado em papel filtro e mantido refrigerado a 4°C, para posterior análise de hemosporídeos.

2.3. Extração e quantificação de DNA total obtido de sangue das aves amostradas

O DNA genômico do sangue das aves foi extraído pela técnica de fenol-clorofórmio seguida por precipitação com isopropanol a partir de modificações do método de Sambrook & Russell (2001). Uma fração de papel filtro contendo

aproximadamente15 µl de sangue foi cortado e acondicionado em um microtubo de 1,5 ml devidamente identificado. Posteriormente, ao microtubo foram adicionados 250 µL de tampão de lise (50mM de NaCl; 50mM de Tris-HCl pH = 7,4; 10mM de EDTA; 1% (v/v) de Triton X-100; 200µg/ml de Proteinase-K) e, em seguida, as amostras foram incubadas a 60°C em banho-maria por 18-24 h. O próximo passo consistiu em adicionar 125 µL de fenol tamponado (Phoneutria®) e 125 µL de clorofórmio puro ao material e, após breve agitação manual, os tubos foram centrifugados a 12.900g por cinco minutos. A fase superior da mistura foi coletada e acondicionada em novos microtubos de 1,5 ml. Ao produto foi adicionado 300 µL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1, sendo o material agitado manualmente e centrifugado a 12.900g por cinco minutos. Na etapa seguinte, a fase inferior da mistura foi cuidadosamente coletada e descartada. Ao líquido restante adicionaram-se 300 µL de clorofórmio puro, e o material foi centrifugado a 12.900g por cinco minutos. A fase inferior foi novamente descartada e aos microtubos foram adicionados 600 µL de isopropanol puro mantido a -20°C. Os microtubos foram levemente agitados até a observação do precipitado, sendo posteriormente centrifugados a 12.900g por 15 minutos. O líquido foi descartado e 600 µL de etanol 70% foram adicionados, mantendo-se a solução a -20°C. Após agitação manual, o material foi novamente centrifugado a 12.900g por 15 minutos, o álcool foi descartado e o material foi mantido em estufa a 37°C até a secagem total. O DNA foi eluído em solução TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) a temperatura ambiente por 18 h ou a 55°C por uma hora e estocado a -20°C. A quantificação do DNA de todas as amostras foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific®) segundo instruções do fabricante.

2.4. Diagnóstico molecular da infecção por *Plasmodium*/*Haemoproteus*

Para o diagnóstico molecular de hemosporídeos foi realizada PCR para amplificação de uma região altamente conservada do gene SSU rRNA mitocondrial segundo Fallon et al. (2003). Essa reação permite que os parasitos de ambos os gêneros, *Plasmodium* e *Haemoproteus*, sejam amplificados. Os *primers* utilizados na reação foram:

343F → 5'- GCTCACGCATCGCTTCT - 3'

496R → 5’- GACCGGTCATTTTCTTTG - 3’

Na reação de amplificação foram utilizados cerca de 100 ng do DNA-molde obtido das aves em 15 µL de reação contendo 1X de solução tampão I0 (Phoneutria®); 3 mM de MgCl2; 0.16 µM dNTP; 1 U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0.2mM de cada iniciador e água ultra pura estéril quantidade suficiente para (qsp). O programa da amplificação em termociclador consistiu em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 2 minutos e a extensão final a 72°C por 3 minutos, finalizando à temperatura de 4°C. Os controles positivos derivaram de DNA genômico de pintinhos experimentalmente infectados com *Plasmodium gallinaceum* gentilmente cedidos pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou - CPqRR, Belo Horizonte, MG. Como controle negativo adicionou-se água ultrapura estéril nas mesmas condições em que as amostras de campo foram adicionadas aos seus respectivos microtubos.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não desnaturante em tampão TBE 1X. O gel foi fixado em solução de álcool etílico e ácido acético, corado em solução de nitrato de prata e os fragmentos de DNA evidenciados em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (Sanguinetti et al. 1994).

2.5. Análise da riqueza genética de *Plasmodium* e *Haemoproteus*

As amostras dos animais positivos na PCR de diagnóstico foram submetidas à *Nested*-PCR, descrita por Hellgren et al. (2004), que amplifica um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade b (cyt *b*). Os *primers* utilizados foram:

HaemNFI → 5’- CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3’

HaemNR3 → 5’- ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3’

HaemF → 5’- ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3’

HaemR2 → 5’- GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3’

Para a primeira reação de amplificação foram utilizados cerca de 100 ng do DNA-molde em 25 µL de tampão de reação contendo 1X de solução tampão I0 (Phoneutria®); 3 mM MgCl2; 0,125 mM dNTP; 1U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,4mM dos iniciadores HaemNFI e HaemNR3 e água ultrapura estéril qsp. O programa da primeira reação consiste em 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 3 minutos e a extensão final a 72°C por 10 minutos, finalizando à temperatura de 4°C. Posteriormente, 1 µL do produto amplificado foi misturado a 24 µL do tampão da segunda reação, o qual é semelhante ao tampão da primeira, pela exceção de que os iniciadores utilizados foram o HaemF e HaemR2, na mesma concentração. A segunda reação é semelhante à primeira, consistindo, porém, em 35 ciclos. A utilização dos controles positivos e negativos seguiu os mesmos critérios da PCR de diagnóstico, assim como ocorreu para a revelação dos produtos amplificados.

2.5.1. Purificação dos produtos da *Nested*-PCR

O método utilizado para a purificação do material amplificado é o descrito por Sambrook e Russell (2001) com modificações. Aos produtos de duas *nested*-PCR (45µL) foi adicionado igual volume de uma solução de PEG 8.000 a 20%. Após agitação em vórtex por 15 segundos, a mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C e centrifugada por 15 minutos a 12.900g. O sobrenadante foi descartado e ao material precipitado foi adicionado 125µL de etanol 80%. Após a lavagem do sedimento e centrifugação por 5 minutos, a lavagem foi repetida. Após descartar o sobrenadante por inversão, o tubo foi incubado a 37°C para secagem. Foram adicionados 12 µL de água ultrapura estéril e o sedimento foi suspendido por pipetagem. Parte do DNA purificado (1 µL) foi avaliado em gel de poliacrilamida 6% e o restante foi conservado a -20°C até sua utilização.

2.5.2 Sequenciamento genético e precipitação dos produtos da reação

Os produtos purificados das PCRs foram sequenciados pelo método de dideoxinucleotídeos em sequenciador automático capilar ABI 3100® (Perkin Elmer, Estados Unidos), utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Aproximadamente 2 µL do produto de PCR purificado foi utilizado em cada reação, adicionando 1 µL dos iniciadores HaemF e HaemR2 na concentração de 10 pmol em microtubos separados, 1 µL de Big Dye, 1,5 µL de tampão Save Money (Applied Biosystems, EUA) e água ultrapura estéril em quantidade suficiente para 10 µL. Esta reação foi realizada em termociclador utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 96ºC por 15 segundos, anelamento a 50ºC por 15 segundos, extensão a 60ºC por 4 minutos, sendo esse ciclo repetido 30 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando acetato de sódio e etanol e homogeneizado em formamida. Os produtos foram sequenciados no Centro de Pesquisa René Rachou - CPqRR, Belo Horizonte, MG.

2.5.3. Edição das sequências genéticas e análises filogenéticas

Os eletrocromatogramas foram avaliados quanto à qualidade e foram editados no programa ChromasPro (Technelysium Pty Ltd). As sequências obtidas foram comparadas às depositadas em bancos de dados de livre acesso como o Genbank (http://www4.ncbi.nlm.nih.gov) e o MalAvi [(Bensch et al. 2009) - http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/]. Amostras contendo diferenças em um ou mais nucleotídeos foram consideradas linhagens distintas do citocromo *b*. Uma linhagem genética de um parasito se comporta como uma espécie biológica propriamente dita, com características biológicas distintas, e que não apresentam traços de recombinação entre elas (Bensch et al. 2004; Outlaw and Ricklefs 2014). Sequência genética se refere ao resultado obtido após o sequenciamento do parasito presente em cada ave, de forma que uma mesma linhagem possa ser detectada em várias aves de mesma espécie ou de espécies diferentes. As linhagens sem registros prévios na base de dados foram consideradas linhagens novas e depositadas no GenBank sob os números de acesso MH260577, MK291501-291507. Novas ocorrências de sequências previamente descritas também foram depositadas no GenBank sob os números de acesso MK264392-264411.

A relação filogenética entre as linhagens de parasitos encontradas foi realizada por inferência bayesiana utilizando o programa MrBayes 3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) com o modelo de evolução de nucleotídeos GTR + R + I, recomendado após análise no ModelTest (Posada & Crandall, 1998). Foram executadas

duas cadeias Markov simultaneamente por 5 milhões de gerações, as quais foram amostradas a cada 1.000 gerações. As primeiras 1.250 (25%) árvores foram descartadas e as árvores remanescentes foram utilizadas no cálculo das probabilidades posteriores. Utilizamos o *Leucocytozoon caulleryi* como grupo externo para enraizar a árvore filogenética.

2.6. Modelagem dos fatores preditores da prevalência de malária nas aves

Para testar quais fatores influenciam a prevalência de hemosporídeos na comunidade de aves, a probabilidade de infecção por indivíduo hospedeiro foi modelada - separadamente para cada gênero de parasito (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) - em função das condições climáticas e de fatores em nível individual e em nível da espécie dos hospedeiros. Escolhemos modelar a probabilidade de infecção por indivíduo em vez da prevalência por espécie (ver Fecchio *et al.*, 2013), pois temos variáveis preditoras em nível individual, que incluem idade do hospedeiro (adulto ou jovem), período reprodutivo (reprodução ou não-reprodução) e presença de ectoparasitos (presente ou ausente). O período de reprodução foi determinado pela presença de placa de incubação no momento da captura. Por outro lado, características específicas da espécie incluíam massa corporal média (g), *status* migratório (migratório ou residente), tipo de ninho (aberto ou fechado), dieta (frugívoro, nectarívoro, granívoro, insetívoro, onívoro e combinações de duas ou três dietas) e período de atividade (dia ou noite). Os dados das características espécie-específicas foram extraídas do Handbook of the Birds of the World Alive (del Hoyo et al. 2011) e do Wilman et al. (2014). A classificação da dieta foi feita considerando-se a guilda alimentar ou a combinação de guildas alimentares que abrangesse ao menos 80% da dieta total da ave, usando-se no máximo três guildas alimentares principais por espécie de ave. Foram consideradas como migratórias as espécies de aves com algum tipo de deslocamento sazonal na área, independentemente de se reproduzirem ou não na área de estudo, seguindo a classificação utilizada por Somenzari *et al.* (2018). Finalmente, como condições climáticas foram utilizados os dados de temperatura e pluviosidade, que foram centrados e dimensionados antes da análise. Os dados climáticos foram obtidos através do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa, coletados na Estação Meteorológica de Natal (INMET, 2017). Como em alguns casos não foi possível obter todos os fatores de nível individual no campo, removemos do conjunto de dados os indivíduos com informações ausentes antes

de proceder com as análises estatísticas. Assim, o conjunto de dados final incluiu 1.187 indivíduos de aves, pois foram eliminadas 279 aves da análise.

No entanto, existem diferentes níveis potenciais de pseudoreplicação (Hurlbert 1984) no conjunto de dados que precisariam ser levados em conta. Os indivíduos de aves que são taxonomicamente semelhantes (mesma espécie, gênero, família e ordem) teriam probabilidades de infecção semelhantes (Ricklefs & Fallon, 2002; Waldenström *et al.*, 2002). O mesmo vale para indivíduos capturados na mesma ocasião (mesmo mês e sazonalidade; Kim & Tsuda 2010; Ferreira Junior et al. 2017). Portanto, para controlar essas possíveis dependências, foi utilizado o pacote R *lme4* (Bates et al. 2015; R Core Team 2016; Harrison et al. 2018) para adequar os dados aos Modelos Lineares Mistos Generalizados (GLMM; Bolker *et al.*, 2009). O estado de infecção foi registrado como uma variável resposta binária (0: não infectado; 1: infectado) e modelado como um ensaio de Bernoulli com distribuição binomial e função de ligação *logit*. As características de nível individual e de espécie e as condições climáticas entraram como fatores fixos cruzados, sem interações; e os fatores temporal e filogenético foram inseridos como fatores aleatórios - aninhados dentro de cada dimensão (temporal e filogenética) e cruzados entre as dimensões - afetando, assim, o intercepto, mas não a inclinação do modelo.

O modelo final foi obtido por *Backward selection* apenas dos fatores fixos - a estrutura aleatória foi mantida completa em todos os modelos (Barr et al. 2013). A partir do modelo completo, usamos um teste de razão de verossimilhança para remover os fatores fixos que não contribuíram significativamente para o ajuste do modelo (Crawley 2013). O teste de razão de verossimilhança compara a probabilidade dos dados no modelo completo com a probabilidade dos dados em um modelo com menos fatores, e foi realizado usando a função análise de variância (ANOVA) no R. Em cada passo, removemos os fatores fixos que menos explicavam o desvio na variável resposta (probabilidade de infecção). A função *r.squaredGLMM* implementada no pacote R *MuMIn* (Barton 2018) foi usada para calcular o R^2 marginal e condicional para o modelo final; e a função *icc* implementada no pacote R *sjstats* para calcular a correlação intraclasse ajustada dos fatores aleatórios (ICCadj). O R^2 marginal fornece o percentual de variância da variável resposta explicado pelos fatores fixos, enquanto o R^2 condicional fornece o percentual total de variância explicado pelo modelo completo,

incluindo os fatores fixo e aleatório (Nakagawa & Schielzeth, 2013). Finalmente, a correlação intraclasse ajustada (ICCadj) dá a porcentagem da variância residual explicada por cada fator aleatório (Nakagawa et al. 2017). Não testamos sobredispersão dos dados, pois não há sobredispersão quando a variável resposta é binária (Crawley 2013). Todas estas análises foram feitas separadamente para cada gênero de parasito (*Plasmodium* e *Haemoproteus*), mas incluímos no conjunto de dados apenas espécies hospedeiras com pelo menos um indivíduo infectado pelo gênero de parasito que estava sendo analisado em cada ocasião. Como o número de aves infectadas por *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) era muito baixo (n = 9), foram incluídas nessas análises apenas aves infectadas por *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*).

3. RESULTADOS

3.1. Prevalência geral de hemosporídeos na comunidade de aves amostrada

No total, foram capturados 1.443 indivíduos de 25 famílias e 70 espécies de aves (Tabela S1), dos quais 322 (22,3%, 44 espécies) estavam infectados por *Plasmodium*/*Haemoproteus*. Entre as espécies melhor amostradas (n ≥ 7), a maior prevalência de infecção foi detectada em *Cyclarhis gujanensis* (n = 14, 64,3%), *Tachyphonus rufus* (n = 108, 64%) e *Columbina passerina* (n = 21, 52,4%). A maioria das espécies de aves capturadas é residente na região. Foram capturadas também 15 espécies migratórias, estando nove destas infectadas (*Elaenia cristata*, *Myiarchus tyrannulus*, *Turdus amaurochalinus*, *Elaenia albiceps*, *Elaenia spectabilis*, *Schistochlamys ruficapillus*, *Turdus flavipes*, *Cyanerpes cyaneus* e *Vireo chivi*; Tabela S2). Não utilizamos nas análises os dados relativos às recapturas das aves, porém, tivemos 387 aves recapturadas ao longo dos 24 meses do estudo.

3.2. Fatores preditores da prevalência de hemosporídeos

A análise de GLMM indicou que apenas a temperatura influenciou na probabilidade de infecção por *Plasmodium* (Tabela 1), com o aumento de um desvio padrão na temperatura (0,99 °C) no CLBI resultando em um aumento de 1,8 na razão de possibilidade de infecção por *Plasmodium* (*odds ratio*, Tabela 2).

Tabela 1. Seleção por *Backward* dos efeitos principais influenciando a probabilidade da infecção por *Plasmodium* spp. A estrutura aleatória completa foi mantida em todos os modelos. O modelo *Plas.Glmm1* começa com todos os efeitos principais (fatores fixos), que são removidos sequencialmente. Em cada passo, removemos o efeito principal que explicava a menor quantidade de desvio (indicado na coluna Fatores fixos). O procedimento é repetido até que nenhum efeito possa ser removido sem causar perda significativa de ajuste do modelo (indicado pela coluna do valor de p). Nesse caso, isso ocorre somente quando a temperatura é removida do modelo.

Modelo	Fatores fixos	Desvio	Chisq	GL	p
Plas.Glmm1	Completo[1]	242,88			
Plas.Glmm2	- Idade	242,88	0,00	1	0,980
Plas.Glmm3	- Preciptação	242,95	0,07	1	0,790
Plas.Glmm4	- Ectoparasitos	243,09	0,14	2	0,920
Plas.Glmm5	- *Status* de migração	244,72	1,62	1	0,200
Plas.Glmm6	- Tipo de ninho	245,80	1,08	1	0,290
Plas.Glmm7	- Massa corporal	248,18	2,37	1	0,120
Plas.Glmm8	- Estação reprodutiva	249,43	1,25	2	0,530
Plas.Glmm9 (null)	- Temperatura	257,62	8,19	1	0,004**

[1]Modelo completo: *Plasmodium* sp. *status* de infecção ~ Intercepto + Idade + Precipitação + Ectoparasitos + *Status* de Migração + Tipo de ninho + Massa corporal + Estação reprodutiva + Temperatura + (Intercepto|Estação/Mês) + (Intercepto|Ordem/Família/Gênero/Espécie), família = binomial(link = "logit").

Tabela 2. Os parâmetros dos modelos mínimos (GLMM binomiais) explicando a probabilidade de infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) spp. Ambos os modelos têm a mesma estrutura aleatória (ver tabelas 1,3 e 4).

Gênero do parasito	**Efeitos principais**	**Estimativa**	**Erro padrão**	**Odds ratio**	**Z valor**	**P valor**	**R^2m**	**R^2c**
Plasmodium	Intercepto	- 2,85	0,32	0,05	- 8,69	2e-16*	0,08	0,24
	Temperatura	0,59	0,21	1,80	2,73	0,0060*		
Haemoproteus	Intercepto	- 0,70	0,19	0,49	- 3,60	0,0003*	0,43	0,43
	Migração	- 3,37	0,54	0,03	- 6,42	4,32e-10*		

Por outro lado, a probabilidade de infecção por parasitos do subgênero *Parahaemoproteus* foi afetada apenas pelo *status* migratório da ave (Tabela 3). Neste caso, observou-se que a possibilidade de infecção por parasitos do subgênero *Parahaemoproteus* em aves migratórias é igual a 0,03 daquela encontrada em aves

residentes (Tabela 2). Todos os outros fatores fixos estavam ausentes dos modelos finais de *Plasmodium* e *H.* (*Parahaemoproteus*).

Tabela 3. Seleção por *Backward* dos efeitos principais que influenciam a probabilidade de infecção por *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) spp. A estrutura aleatória completa foi mantida em todos os modelos. O modelo *Para.Glmm1* começa com todos os efeitos principais (fatores fixos), que são removidos sequencialmente. Em cada passo, removemos o efeito principal que explica a menor quantidade de desvio (indicado na coluna Fatores fixos). O procedimento é repetido até que nenhum efeito possa ser removido sem causar perda significativa de ajuste do modelo (indicado pela coluna do valor de p). Nesse caso, isso ocorre apenas quando o *status* migratório é removido do modelo, embora a melhora no desvio proporcionada pela massa corporal e período reprodutivo seja marginalmente significativa, indicando um possível papel desses fatores na probabilidade de infecção pelo *H.* (*Parahaemoproteus*).

Modelo	Fatores fixos	Desvio	Chisq	GL	p
Para.Glmm1	Completo[1]	179,81			
Para.Glmm2	- Precipitação	179,88	0,07	1	0,790
Para.Glmm3	- Ectoparasitos	180,44	0,56	2	0,754
Para.Glmm4	- Tipo de ninho	181,36	0,91	1	0,338
Para.Glmm5	- Idade	182,34	1,97	1	0,322
Para.Glmm6	- Temperatura	183,07	0,73	1	0,391
Para.Glmm7	- Massa corporal	185,83	2,75	1	0,096
Para.Glmm8	- Estação reprodutiva	190,34	4,64	2	0,098
Para.Glmm9 (null)	- *Status* de migração	200,34	9,86	1	0,001**

[1]Modelo completo: *H.* (*Parahaemoproteus*) spp. *status* de infecção ~ Intercepto + Idade + Precipitação + Ectoparasitos +*Status* de Migração+Tipo de ninho+Massa corporal+Estação reprodutiva+Temperatura+ (Intercepto|Estação/Mês) + (Intercepto|Ordem/Família/Gênero/Espécie), família = binomial(link = "logit").

No GLMM para *H.* (*Parahaemoproteus*), o ICCadj (variância residual explicada pelos fatores aleatórios do modelo) foi igual à zero para todos os fatores aleatórios analisados (Tabela 4), e os R^2 marginais (variância explicada pelos fatores fixos) e condicionais (variância explicada pelos fatores fixos e aleatórios) foram idênticos ($R^2m = R^2c = 0,43$; Tabela 2). Estes resultados indicam, portanto, que os fatores aleatórios (variáveis taxonômicas e temporais) não explicam a dispersão dos resíduos do modelo. Nesse caso, o GLMM colapsa em um GLM simples, já que os fatores aleatórios (que definem uma GLMM) não são importantes no modelo. No GLMM para *Plasmodium*, o ICCadj também foi igual a zero para quase todos os fatores aleatórios, com exceção do fator aleatório 'espécie', que foi igual a 0,17 (Tabela 4), indicando que 17% da variância residual está correlacionada dentro das espécies. Assim, os R^2 marginais e condicionais não eram idênticos ($R^2m = 0,08$ e $R^2c = 0,24$, Tabela 2) e, portanto, a espécie da ave tem uma pequena influência na probabilidade de infecção por *Plasmodium*. Isso indica que, excluindo-se os demais fatores, aves de espécies diferentes terão uma pequena diferença na sua probabilidade de se infectarem por *Plasmodium*. Nesse estudo utilizamos dados referentes à classificação taxonômica das aves, considerando que esta é semelhante à classificação filogenética conhecida atualmente.

Tabela 4. Correlação intra-classe ajustada (ICCadj) de fatores temporais e taxonômicos, aqui considerados como dois níveis da estrutura aleatória dos modelos construídos para analisar os fatores que predizem a probabilidade de infecção por *Plasmodium* e *Haemoproteus* em uma comunidade de aves no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil.

Dimensão	**Fator aleatório**	**ICC_{adj}** ***Plasmodium* spp.**	**ICC_{adj}** ***H.* (*Parahaemoproteus*) spp.)**
Temporal	Estação	0	0
	Mês:Estação	0	0
Taxonômico	Família	0	0
	Gênero:Família	0	0
	Espécie:Gênero:Família	0,1728	0

3.3. Riqueza de hemosporídeos

Todas as amostras positivas na PCR de diagnóstico foram submetidas a uma reação de *nested*-PCR - cujo alvo é o cyt *b* do parasito - que amplificou com sucesso as infecções de 145 dos indivíduos positivos, sendo 102 amostras sequenciadas com sucesso. Identificamos 27 linhagens de cyt *b*, das quais 18 eram linhagens de *Plasmodium*, detectadas em 35 aves (18 espécies; Tabela 5), e nove linhagens de *Haemoproteus*, detectadas em 67 aves (15 espécies; Tabela 6). Quinze dos 322 indivíduos infectados (4,6%) apresentaram infecções múltiplas, com base em picos duplos nos cromatogramas, e foram retirados do conjunto de dados devido à impossibilidade de identificação dos parasitos. Entre as linhagens de *Haemoproteus*, 3 são linhagens de *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) detectadas em 9 aves (2 espécies), e 6 são linhagens de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) detectadas em 58 aves (13 espécies). Oito linhagens foram detectadas pela primeira vez (cinco de *Plasmodium* e três de *H.* (*Parahaemoproteus*)) (Figura 3). Das 27 linhagens, 14 (52%) foram detectadas apenas uma vez. Das 13 linhagens detectadas pelo menos duas vezes, oito (30%) foram encontradas em mais de uma espécie hospedeira (Tabela 5 e Tabela 6). A maioria das linhagens detectadas em apenas uma espécie hospedeira foi encontrada em apenas um indivíduo (14 linhagens) e as linhagens restantes foram encontradas em dois (2 linhagens), três (1 linhagem) ou quatro (2 linhagens) indivíduos.

As relações filogenéticas das linhagens dos parasitos mostram que as linhagens de *Plasmodium* são parafiléticas a um clado distinto e bem suportado de linhagens de *Haemoproteus*, se verificado a partir do ponto de ramificação n° 2 (Figura 3). As linhagens de *Haemoproteus* formam dois clados diferentes, sendo um clado de linhagens de *H.* (*Haemoproteus*) (clado HA) e o outro clado de linhagens de *H.* (*Parahaemoproteus*) (clado HB), os quais partem do ponto de ramificação n° 3, um clado monofilético. Embora o suporte nodal tenha sido geralmente elevado para ambos os gêneros de parasitos, a árvore filogenética incluiu algumas politomias, especialmente para *Plasmodium* (Figura 3).

Tabela 5. Distribuição de linhagens de *Plasmodium* entre as espécies de aves capturadas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. O número de indivíduos capturados para cada espécie é indicado entre parênteses.

		Linhagens de *Plasmodium*									
Espécies de aves	**Família**	**BAFLA03**	**BAFLA04**	**CALON01**	**CPCT57**	**DENPET03**	**FOGRI01**	**FOMEL04**	**H012**	**HYAMA01**	**LECOR02**
Cantorchilus longirostris (25)	Troglodytidae			2							
Coereba flaveola (114)	Thraupidae		3			3					
Cyanocorax cyanopogon (2)	Corvidae								1		
Cyclarhis gujanensis (14)	Vireonidae										
Elaenia albiceps (244)	Tyrannidae	1	1								
Elaenia spectabilis (9)	Tyrannidae		1								
Formicivora grisea (19)	Thamnophilidae						1	1			
Herpsilochmus pectoralis (24)	Thamnophilidae										1
Herpsilochmus sellowi (27)	Thamnophilidae										1
Hylophilus amaurocephalus (29)	Vireonidae									1	
Leptotila verreauxi (9)	Columbidae		1								
Piaya cayana (8)	Cuculidae				1						
Polioptila plumbea (15)	Polioptilidae										
Tachyphonus rufus (108)	Thraupidae		1								
Turdus amaurochalinus (156)	Turdidae					1					
Turdus flavipes (11)	Turdidae					1					
Turdus leucomelas (98)	Turdidae										

		Linhagens de *Plasmodium*								
Espécies de aves	**Família**	**PADOM09**	**PADOM11**	**PADOM17**	**PAMIT01**	**POPLU01**	**TUAMA01**	**TURNUD02**	**U12**	**Total**
Cantorchilus longirostris (25)	Troglodytidae									2
Coereba flaveola (114)	Thraupidae	1								7
Cyanocorax cyanopogon (2)	Corvidae				1					1
Cyclarhis gujanensis (14)	Vireonidae				1					1
Elaenia albiceps (244)	Tyrannidae	1		1				1		5
Elaenia spectabilis (9)	Tyrannidae									1

Formicivora grisea (19)	Thamnophilidae								2
Herpsilochmus pectoralis (24)	Thamnophilidae								1
Herpsilochmus sellowi (27)	Thamnophilidae								1
Hylophilus amaurocephalus (29)	Vireonidae								1
Leptotila verreauxi (9)	Columbidae								1
Piaya cayana (8)	Cuculidae								1
Polioptila plumbea (15)	Polioptilidae	1				1			2
Tachyphonus rufus (108)	Thraupidae		1						2
Turdus amaurochalinus (156)	Turdidae						1	1	3
Turdus flavipes (11)	Turdidae	1							2
Turdus leucomelas (98)	Turdidae				1				1

Tabela 6. Distribuição de linhagens de *Haemoproteus* entre as espécies de aves capturadas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. O número de indivíduos capturados para cada espécie é indicado entre parênteses.

		Linhagens de *Haemoproteus*									
Espécies de aves	**Família**	**COTAL01**	**ELALB01**	**NYMAC01**	**PAPOL03**	**SocH3**	**SocH4**	**TARUF02**	**UN203**	**VIREO02**	**Total**
Coereba flaveola (114)	Thraupidae							1			1
Columbina passerina (21)	Columbidae					4	1				5
Columbina talpacoti (14)	Columbidae	4									4
Coryphospingus pileatus (5)	Thraupidae							1			1
Cyclarhis gujanensis (14)	Vireonidae							1	5		6
Elaenia albiceps (244)	Tyrannidae		1						1		2
Formicivora grisea (10)	Thamnophilidae							1			1
Myiarchus tyrannulus (4)	Tyrannidae		1								1
Neopelma pallescens (27)	Pipridae							1			1
Nystalus maculatus (10)	Bucconidae			3							3
Pachyramphus polychopterus (7)	Tityridae				2						2
Tachyphonus rufus (108)	Thraupidae							37			37
Tangara cayana (67)	Thraupidae							1			1
Turdus flavipes (11)	Turdidae							1			1
Vireo chivi (10)	Vireonidae									1	1

Apesar da maior riqueza de linhagens de *Plasmodium* detectadas em aves, houve maior número de aves infectadas por *Haemoproteus* (35 e 67 aves, respectivamente), principalmente por *H.* (*Parahaemoproteus*). A linhagem de *Plasmodium* mais prevalente foi a BAFLA04, detectada em 7 aves, sendo quatro capturadas na estação chuvosa e três na estação seca (Figura 3). Entre as linhagens de *Parahaemoproteus* destacamos a linhagem TARUF02, que foi detectada em 44 aves (21 na estação chuvosa e 23 na estação seca) e têm uma aparente preferência em infectar aves da espécie *Tachyphonus rufus*. Do total de 44 aves infectadas por esta linhagem, 37 eram da espécie *T. rufus*, e as outras sete ocorrências dessa linhagem foram detectadas em sete diferentes espécies de aves (Tabela 5 e Tabela 6). Além disso, registramos apenas duas infecções por outras linhagens em indivíduos de *T. rufus* (PADOM11 e BAFLA04).

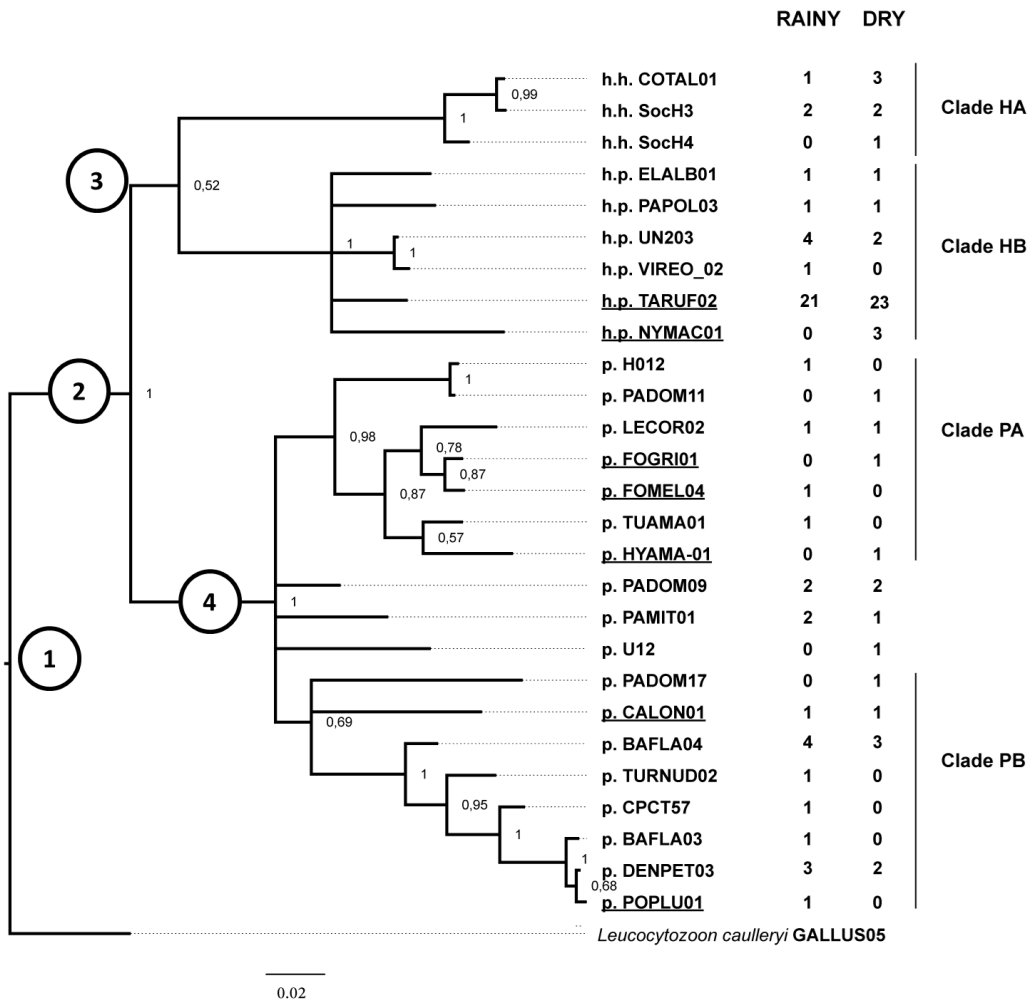

Figura 3. Inferência filogenética bayesiana representando a distribuição sazonal das linhagens de hemosporídeos detectadas em uma comunidade de aves do Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Os números localizados próximos aos ramos indicam os valores de probabilidade posterior. O comprimento dos ramos é ilustrado de acordo com o número de alterações de nucleotídeos (ver escala). As linhagens detectadas pela primeira vez estão sublinhadas. Siglas que precedem os nomes das linhagens: p. = *Plasmodium* spp.; h.h. = *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) spp.; h.p. = *H.* (*Parahaemoproteus*) spp. Grupo externo= *Leucocitozoon caulleryi*. Os clados HA e HB englobam as linhagens de *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) e *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*), respectivamente. Os clados PA e PB englobam as linhagens de *Plasmodium*. Os números nos círculos representam os diferentes clados avaliados.

4. DISCUSSÃO

O CLBI abriga uma comunidade rica de linhagens de hemosporídeos de aves distribuídas entre 63% (44/70) das espécies de aves amostradas neste estudo, com uma prevalência total de parasitos de ~ 22%. Estimativas para a prevalência de hemosporídeos em comunidades de aves do Brasil mostram uma grande variação entre diferentes biomas e entre diferentes locais no mesmo bioma. A prevalência estimada nos locais estudados no bioma Cerrado variou de 21% a 42% (Belo et al. 2011; Fecchio et al. 2013; Lacorte et al. 2013). Em áreas estudadas dentro de outros biomas e fitofisionomias brasileiros também foi observada uma grande variação nas estimativas de prevalência, por ex. 17,4% (Fecchio et al. 2017) para 21,7% (Svensson-Coelho et al. 2013) na Região Amazônica; 38,5% (Lacorte et al. 2013) para 42% (Ferreira Junior et al. 2017) em Florestas Tropicais Secas; e 12,4% a 39,6% em Mata Atlântica (Ribeiro et al. 2005; Sebaio et al. 2010; Lacorte et al. 2013).

Em nosso estudo, houve uma maior riqueza de linhagens de *Plasmodium*, que tem sido uma característica comum dos estudos que investigaram hemosporídeos em muitas regiões do Brasil (Belo et al. 2011; Lacorte et al. 2013; Svensson-Coelho et al. 2013; Ferreira Junior et al. 2017) e foi relatado em uma revisão feita por Clark et al. (2014). No entanto, ao contrário do que foi observado nesses estudos, houve mais registros de linhagens de *Haemoproteus* no CLBI. Uma maior prevalência de *Haemoproteus* também foi observada em um estudo realizado em uma área do bioma Caatinga no nordeste do Brasil, localizado a 300 km de distância do CLBI (Khan 2019). Além desses estudos, uma prevalência maior de *Haemoproteus* em comparação a *Plasmodium* no Brasil foi relatada apenas por Fecchio *et al.* (2013) em um estudo de comunidade realizado no bioma Cerrado no Brasil Central. Uma hipótese a ser testada em estudos futuros é a possibilidade de que a reprodução e a abundância de culicídeos (Culicidae) no CLBI sejam reduzidas em relação à reprodução de ceratopogonídeos e moscas hipoboscídeas, vetores de *Haemoproteus*. Os culicídeos, vetores de *Plasmodium*, são totalmente dependentes de água para o desenvolvimento das suas formas imaturas (Forattini 2002; Rueda 2008), enquanto os ceratopogonídeos, que se reproduzem em áreas úmidas ricas em matéria orgânica (Mellor et al. 2000), e as moscas hipoboscídeas, cujo desenvolvimento larval ocorre no interior do corpo da fêmea (Baker 1967), que são os vetores de *Haemoproteus*, tem pouca ou nenhuma dependência de água para seu desenvolvimento, respectivamente. Se considerarmos as

características ambientais e climáticas do CLBI, caracterizado por chuvas concentradas em alguns poucos meses do ano, altas temperaturas e solo arenoso – o que dificulta a formação de poças d'água para reprodução de insetos – é plausível sugerir que esse ambiente favorece mais a reprodução de vetores de *Haemoproteus*, enquanto os vetores de *Plasmodium* devem ter uma maior abundância concentrada nos meses chuvosos. O estudo desses insetos vetores poderia contribuir para o melhor entendimento do que torna essas regiões tão diferentes das outras regiões brasileiras estudadas e também elucidar o motivo do Brasil ser, em geral, uma exceção ao padrão mundial de maior riqueza de linhagens de *Haemoproteus*.

O comportamento migratório de aves do CLBI teve associação significativa e inversa com a probabilidade de infecção por *H.* (*Parahaemoproteus*). Esperava-se uma prevalência mais alta em espécies migratórias, pois durante seu ciclo anual elas estão expostas a diferentes parasitos e patógenos em comparação com espécies residentes (Waldenström et al. 2002). Não foi encontrada nenhuma relação entre *status* de migração e prevalência de *Plasmodium*. O conhecimento atual da especificidade de hospedeiro das linhagens de parasitos prediz que os parasitos do gênero *Haemoproteus* tendem a ser mais específicos para seus hospedeiros que os parasitos do gênero *Plasmodium* (Ishtiaq et al. 2007, 2010; Dimitrov et al. 2010). Portanto, é possível que as aves migratórias não sejam hospedeiros adequados para um número de linhagens de hemosporídeos com as quais se sobrepõem geograficamente durante seu ciclo anual. Se isso for verdade na comunidade de aves estudada, as aves migratórias podem ser menos propensas a serem infectadas por *Haemoproteus* no CLBI quando comparadas a aves residentes, devido à maior especificidade que esse parasito apresenta em relação a seus hospedeiros locais. Alternativamente, os resultados aqui apresentados podem estar relacionados à hipótese de que a seleção vivenciada por aves migratórias em suas áreas de reprodução e invernada resultou em maior investimento em defesa imunológica, tornando essas aves menos propensas a infecções (Møller & Erritzøe, 1998).

Apesar da ausência de dados sobre a ocorrência e abundância de mosquitos no CLBI para uma adequada avaliação da relação vetor-parasito-hospedeiro, a relação positiva observada entre temperatura e prevalência de *Plasmodium*, pode estar relacionada aos efeitos da temperatura sobre os vetores deste parasito. Para os hemosporídeos aviários, a temperatura é comumente descrita como um importante fator abiótico que influencia o desenvolvimento do parasito e as condições de reprodução do

vetor (Beier 1998; Santiago-Alarcon et al. 2012). Tem sido demonstrado que o desenvolvimento de diferentes parasitos da malária em vetores pode ser influenciado pelo clima e geralmente é dificultado por temperaturas muito baixas (LaPointe et al. 2010; Zamora-Vilchis et al. 2012). A temperatura também determina a taxa na qual os mosquitos se desenvolvem em adultos, a frequência do repasto sanguíneo e a taxa em que os parasitos são adquiridos (Patz et al. 2000). Zamora-Vilchis et al. (2012) já haviam demonstrado que em áreas com temperaturas mais elevadas (a temperatura em seu estudo variou de ~16°C a 22°C) as aves apresentaram maior prevalência de hemosporídeos, indicando que maiores temperaturas parecem proporcionar um excelente ambiente para a transmissão desses parasitos. Em um clima mais quente, a abundância de vetores tende a aumentar, e a transmissão de doenças transmitidas por vetores poderia ser maior.

Outros estudos já investigaram os efeitos de características de nível individual e de características espécie-específicas na prevalência de hemosporídeos e produziram resultados conflitantes entre si. A dieta foi um importante preditor da prevalência de parasitos nas investigações conduzidas por Ribeiro et al. (2005), que relataram maior prevalência de *Plasmodium* em aves insetívoras quando comparadas a aves com outras dietas. No entanto, semelhante ao nosso estudo, eles não observaram influência do tipo de ninho, sexo do hospedeiro e idade na infecção por *Plasmodium* (Ribeiro et al. 2005). Matthews et al. (2015) também não observaram efeito de características individuais, como sexo e idade na prevalência de hemosporídeos, tendo, no entanto, demonstrado que algumas variações na prevalência do parasito foram determinadas por traços da história de vida do hospedeiro, entre os quais podem-se citar tamanho corporal, hábitos de nidificação e comportamento migratório. O estudo desenvolvido por Ricklefs et al. (2005) também verificou influencia do sexo e idade na infecção, mas concluiu que a massa corporal e a altura do ninho foram fatores importantes para o aumento da prevalência de hemosporídeos nas aves. Tais resultados conflitantes encontrados entre diferentes estudos podem surgir de diferenças na composição da comunidade de aves, clima, geografia e tipos de habitat, mas também podem refletir efeitos espúrios, como resultado de erros estatísticos do tipo II.

5. CONCLUSÃO

Nesta primeira investigação de parasitos hemosporídeos de aves em um habitat altamente diverso e inexplorado do Brasil, foi demonstrado que aves de Restinga abrigam uma comunidade diversificada de hemosporídeos aviários. Aves migratórias tem menor probabilidade de serem infectadas por *Haemoproteus*, porém, o fator migração não é um bom preditor da infecção por *Plasmodium*. As outras características individuais e de nível específico não foram importantes para determinar a probabilidade de infecção por *Plasmodium* ou *Haemoproteus* neste estudo, o que indica uma grande variação da influência desses fatores sobre a prevalência de hemosporídeos em diferentes comunidades de aves, uma vez que os resultados aqui encontrados são divergentes daqueles indicados por outros estudos. A temperatura, mas não a precipitação, parece predizer a prevalência de *Plasmodium* em nossa comunidade de aves, o que pode estar relacionado ao efeito da temperatura sobre os mosquitos, vetores desse parasito. O maior número de aves infectadas por linhagens de *Haemoproteus* em comparação a *Plasmodium* é um achado incomum no Brasil, e nos leva a sugerir que o Nordeste do Brasil possa ter uma dinâmica diferente da infecção por *Haemoproteus* quando comparado a outras regiões estudadas do país. Futuras investigações em biomas nordestinos e amostragem de vetores de hemosporídeos são necessárias para melhor entendermos a dinâmica de transmissão e elucidar os fatores que promovem níveis mais altos de infecção por *Haemoproteus* em aves desta região.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, et al (2014) Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorol Zeitschrift 22:711–728. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507

Arriero E, Møller AP (2008) Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. J Evol Biol 21:1504–1513. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01613.x

Asghar M, Hasselquist D, Hansson B, et al (2015) Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. Science (80) 347:436–438. doi: 10.1126/science.1261121

Atkinson CT, Woods KL, Dusek RJ, et al (1995) Wildlife disease and conservation in Hawaii : Pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). Parasitology 111:S59–S69.

Ayadi T, Selmi S, Hammouda A, et al (2017) Diversity, prevalence and host specificity of avian parasites in southern Tunisian oases. Parasitology 1–8. doi: 10.1017/ S0031182017002141

Baker JR (1967) A review of the role played by the Hippoboscidae as vectors of endoparasites. J Parasitol 53:412–418.

Barr DJ, Levy R, Scheepers C, Tily HJ (2013) Random effects structure for confirmatory hypothesis testing: Keep it maximal. J Mem Lang 68:1–43. doi: 10.1016/j.jml.2012.11.001

Barton K (2018) Package "MuMIn." cran.r-project.org

Bates D, Mächler M, Bolker BM, Walker SC (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. J Stat Softw 67:1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01

Beier JC (1998) Malaria parasite development in mosquitoes. Annu Rev Entomol 43:519–543. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.519

Belo NO, Pinheiro RT, Nia E, et al (2011) Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct Cerrado habitats in Brazil. doi: 10.1371/journal.pone.0017654

Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris J (2009) MalAvi : a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. Mol Ecol Resour 9:1353–1358. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02692.x

Bensch S, Pérez-Tris J, Waldenström J, Hellgren O (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? Evolution (N Y) 58:1617–1621. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01742.x

Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, et al (2009) Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. Trends Ecol Evol 24:127–135. doi: 10.1016/j.tree.2008.10.008

Cerný O, Votýpka J, Svobodová M (2011) Spatial feeding preferences of ornithophilic mosquitoes, blackflies and biting midges. Med Vet Entomol 25:104–108. doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00875.x

Cerqueira R (2000) Biogeografia de Restingas. In: Esteves F, Lacerda L (eds) Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras. NUPEM/UFRJ, Macae, Rio de Janeiro, Brasil, pp 65–75

Chasar A, Loiseau C, Valkiūnas G, et al (2009) Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. Mol Ecol 18:4121–4133. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04346.x

Clark NJ, Clegg SM, Lima MR (2014) A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): New insights from molecular data. Int J Parasitol 44:329–338. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.01.004

Cosgrove CL, Wood MJ, Day KP, Sheldon BC (2008) Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. J Anim Ecol 77:540–548. doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01370.x

Crawley MJ (2013) The R book, Second Edi. John Wiley & Sons Ltd, London

del Hoyo J, Elliott A, Christie DA (2011) Handbook of the birds of the world alive. Lynx Edicions, Barcelona

Dimitrov D, Zehtindjiev P, Bensch S (2010) Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome *b* lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria. Acta Parasitol 55:201–209. doi: 10.2478/s11686-010-0029-z

Fallon ASM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E (2003) Detecting avian malaria: an improved Polymerase Chain Reaction diagnostic. J Parasitol 89:1044–1047. doi: 10.1645/GE-3157

Fecchio A, Lima MR, Silveira P, et al (2011) High prevalence of blood parasites in social birds from a neotropical savanna in Brazil. Emu 111:132–138. doi: 10.1071/MU10063

Fecchio A, Lima MR, Svensson-Coelho M, et al (2013) Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. Parasitology 140:181–192. doi: 10.1017/S0031182012001412

Fecchio A, Pinheiro R, Felix G, et al (2017) Host community similarity and geography shape the diversity and distribution of haemosporidian parasites in Amazonian birds. Ecography (Cop) 0:1–10. doi: 10.1111/ecog.03058

Ferreira Junior FC, Rodrigues RA, Ellis VA, et al (2017) Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. PLoS One 12:1–18.

Forattini OP (2002) Culicidologia Médica vol. 2, 1° Edição. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo

Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds : a role for parasites? Science (80) 218:384–387.

Harrison XA, Donaldson L, Correa-Cano ME, et al (2018) A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. PeerJ 6:e4794. doi: 10.7717/peerj.4794

Hellgren O, Pérez-Triz J, Bensch S (2009) A jack-of-all-trades and still a master of some: prevalence and host range in avian malaria and related blood parasites. Ecology 90:2840–2849. doi: 10.1890/08-1059.1

Hellgren O, Waldenström J, Bensch S (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. J Parasitol 90:797–802. doi: 10.1645/GE-184R1

Hoi H, Darolová A, Krištofík J, Hoi C (2018) The effect of the ectoparasite *Carnus hemapterus* on immune defence, condition, and health of nestling European Bee-eaters. J Ornithol 159:291–302. doi: 10.1007/s10336-017-1500-5

Hurlbert SH (1984) Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. Ecol Monogr 54:187–211.

INMET (2017) Instituto Nacional de Meteorologia. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa - BDMEP. Brasília, DF, Brasil. http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep. Accessed 11 Dec 2017

Ishtiaq F, Clegg SM, Phillimore AB, et al (2010) Biogeographical patterns of blood parasite lineage diversity in avian hosts from southern Melanesian islands. J Biogeogr 37:120–132. doi: 10.1111/j.1365-2699.2009.02189.x

Ishtiaq F, Gering E, Rappole JH, et al (2007) Prevalence and diversity of avian Hematozoan parasites in Asia: a regional survey. J Wildl Dis 43:382–398.

Johnson PTJ, De Roode JC, Fenton A (2015) Why infectious disease research needs community ecology. Science (80). doi: 10.1126/science.1259504

Khan AU (2019) Diversity of avian haemosporidian parasites in Brazil: From large to small scale. Universidade Federal de Minas Gerais

Kim KS, Tsuda Y (2010) Seasonal changes in the feeding pattern of *Culex pipiens pallens* govern the transmission dynamics of multiple lineages of avian malaria parasites in Japanese wild bird community. Mol Ecol 19:5545–5554. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04897.x

Lachish S, Knowles SCL, Alves R, et al (2011) Infection dynamics of endemic malaria in a wild bird population: Parasite species-dependent drivers of spatial and temporal variation in transmission rates. J Anim Ecol 80:1207–1216. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01893.x

Lacorte GA, Flix GMF, Pinheiro RRB, et al (2013) Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites - a molecular survey from southeast Brazil. PLoS One 8:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0057770

LaPointe DA, Goff ML, Atkinson CT (2010) Thermal constraints to the sporogonic development and altitudinal distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawai'i. J Parasitol 96:318–324. doi: 10.1645/GE-2290.1

Laurance SGW, Jones D, Westcott D, et al (2013) Habitat fragmentation and ecological traits influence the prevalence of avian blood parasites in a Tropical Rainforest landscape. PLoS One 8:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0076227

Lutz HL, Hochachka WM, Engel JI, et al (2015) Parasite prevalence corresponds to host life history in a diverse assemblage of afrotropical birds and haemosporidian parasites. PLoS One 10:1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0121254

Matthews AE, Ellis VA, Hanson AA, et al (2015) Avian haemosporidian prevalence and its relationship to host life histories in eastern Tennessee. J Ornithol 157:1–16. doi: 10.1007/s10336-015-1298-y

Medeiros MCI, Ricklefs RE, Brawn JD, Hamer GL (2015) *Plasmodium* prevalence across avian host species is positively associated with exposure to mosquito vectors. Parasitology 142:1612–1620. doi: 10.1017/s0031182015001183

Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) Culicoides biting midges : their role as arbovirus vectors. Annu Rev Entomol 45:307–340.

Møller AP (2010) Host-parasite interactions and vectors in the barn swallow in relation to climate change. Glob Chang Biol 16:1158–1170. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.02035.x

Møller AP, Erritzøe J (1998) Host immune defence and migration in birds. Evol Ecol 12:945–953.

Nakagawa S, Johnson PCD, Schielzeth H (2017) The coefficient of determination R^2 and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. J R Soc Interface 14:1–11. doi: http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2017.0213

Nakagawa S, Schielzeth H (2013) A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. Methods Ecol Evol 4:133–142. doi: 10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x

Outlaw DC, Ricklefs RE (2014) Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): How to move forward in the molecular era. Parasitology 141:1223–1232. doi: 10.1017/S0031182014000560

Patz J a., Graczyk TK, Geller N, Vittor AY (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int J Parasitol 30:1395–1405. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00141-7

Piacentini V de Q, Aleixo A, Agne, Carlos Eduardo Maurício GN, et al (2015) Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. Rev Bras Ornitol 23:91–298. doi: urn:lsid:zoobank.org:pub:30856542-FFD1-44CA-B249-9F321CD4CF4C

Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST : testing the model of DNA substitution. Bioinforma Appl NOTE 14:817–818.

Pryor LJE, Casto JM (2017) Ectoparasites as developmental stressors: Effects on somatic and physiological development. J Exp Zool Part A Ecol Integr Physiol 327:311–321. doi: 10.1002/jez.2097

R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing.

Ribeiro SF, Sebaio F, Branquinho FCS, et al (2005) Avian malaria in Brazilian passerine birds: Parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. Parasitology 130:261–267. doi: 10.1017/S0031182004006596

Ricklefs RE, Fallon SM (2002) Diversification and host switching in avian malaria parasites. Proc R Soc London B 269:885–892. doi: 10.1098/rspb.2001.1940

Ricklefs RE, Fallon SM, Bermingham E (2004) Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. Syst Biol 53:111–119. doi: 10.1080/10635150490264987

Ricklefs RE, Outlaw DC, Svensson-Coelho M, et al (2014) Species formation by host shifting in avian malaria parasites. Proc Natl Acad Sci 111:14816–14821. doi: 10.1073/pnas.1416356111

Ricklefs RE, Swanson BL, Fallon SM, et al (2005) Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. Ecol Monogr 75:543–559. doi: 10.1890/04-1820

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3 : Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinforma Appl Note 19:1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180

Rueda LM (2008) Global diversity of mosquitoes (Insecta : Diptera : Culicidae) in freshwater. Hydrobiologia 595:477–487. doi: 10.1007/s10750-007-9037-x

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ (1994) RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17:914–921.

Santiago-Alarcon D, Palinauskas V, Schaefer HM (2012) Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: Untangling parasite life cycles and their taxonomy. Biol Rev 87:928–964. doi: 10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x

Scott ME (1988) The impact of infection and disease on animal populations: Implications for conservation biology. Conserv Biol 2:40–56. doi: 10.1111/j.1523-1739.1988.tb00334.x

Sebaio F, Braga ÉM, Branquinho F, et al (2010) Blood parasites in Brazilian Atlantic Forest birds: Effects of fragment size and habitat dependency. Bird Conserv Int 20:432–439. doi: 10.1017/S0959270910000110

Silva JLA, Souza AF, Jardim JG, Goto BT (2015) Community assembly in harsh environments: the prevalence of ecological drift in the heath vegetation of South America. Ecosphere 6:1–18.

Somenzari M, Amaral PP, Cueto VR, et al (2018) An overview of migratory birds in Brazil.

Spencer K a, Buchanan KL, Leitner S, et al (2005) Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. Proc R Soc B Biol Sci 272:2037–2043. doi: 10.1098/rspb.2005.3188

Svensson-Coelho M, Blake JGJG, Loiselle B a, et al (2013) Diversity, prevalence, and host specificity of avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a western Amazon assemblage.

Tompkins DM, Carver S, Jones ME, et al (2015) Emerging infectious diseases of wildlife: A critical perspective. Trends Parasitol 31:149–159. doi: 10.1016/j.pt.2015.01.007

Valkiunas G (2005) Avian malaria parasites and other Haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida

Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, et al (2002) Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. Mol Ecol 11:1545–1554. doi: 10.1046/j.1365-294X.2002.01523.x

Wilman H, Belmaker J, Simpson J, et al (2014) EltonTraits 1.0: Species-level foraging attributes of the world's birds and mammals. Ecology 95:2027–2027. doi: 10.1890/13-1917.1

Zamora-Vilchis I, Williams SE, Johnson CN (2012) Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: Implications for disease in a warming climate. PLoS One 7:1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0039208

7. APÊNDICES

Tabela S1. Espécies de aves capturadas com redes de neblina no período de Abril de 2013 a Março de 2015 no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, RN, através. Os traços de cada espécie foram obtidos na literatura. Os tipos de dieta principais das espécies incluem: I = insetívoro, O = onívoro, F = frugívoro, N = nectarívoro, G = granívoro.

	Traços				
Espécie	**Dieta**	**Período de atividade**	**Status de migração**	**Tipo de ninho**	**Massa corporal (g)**
Basileuterus culicivorus	I	Diurno	Residente	Aberto	10,5
Camptostoma obsoletum	I	Diurno	Residente	Fechado	8,1
Cantorchilus longirostris	O	Diurno	Residente	Fechado	21,3
Chiroxiphia pareola	I/F	Diurno	Residente	Aberto	16,84
Cnemotriccus fuscatus	I	Diurno	Residente	Aberto	13,6
Coccyzus melacoryphus	I	Diurno	Migratória	Aberto	49,71
Coereba flaveola	F/N	Diurno	Residente	Fechado	10,01
Columbina passerina	F/G	Diurno	Residente	Aberto	35,36
Columbina picui	G	Diurno	Migratória	Aberto	47
Columbina talpacoti	G	Diurno	Residente	Aberto	46,04
Coryphospingus pileatus	I/G	Diurno	Residente	Aberto	15,3
Cyanerpes cyaneus	I/F/N	Diurno	Residente	Aberto	14
Cyanocorax cyanopogon	I/F	Diurno	Residente	Aberto	146
Cyanoloxia brissonii	F	Diurno	Residente	Aberto	27,5
Cyclarhis gujanensis	I	Diurno	Residente	Aberto	28,8
Dacnis cayana	I/F	Diurno	Residente	Aberto	13
Dendroplex picus	I	Diurno	Residente	Fechado	41,34
Elaenia albiceps	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	15,5
Elaenia chiriquensis	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	15,4
Elaenia cristata	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	18,2
Elaenia flavogaster	I/F	Diurno	Residente	Aberto	24,8
Elaenia spectabilis	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	27,3
Empidonomus varius	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	27,1
Euphonia chlorotica	F	Diurno	Residente	Fechado	11
Euscarthmus meloryphus	I	Diurno	Residente	Aberto	6,8
Formicivora grisea	I	Diurno	Residente	Aberto	10,36
Galbula ruficauda	I	Diurno	Residente	Fechado	26,5
Hemitriccus margaritaceiventer	I	Diurno	Residente	Fechado	8,4
Herpsilochmus pectoralis	I	Diurno	Residente	Aberto	10,86
Herpsilochmus sellowi	I	Diurno	Residente	Aberto	7,5
Hydropsalis torquata	I	Noturno	Residente	Aberto	58,5

Hylophilus amaurocephalus	O	Diurno	Residente	Aberto	11,59
Leptotila verreauxi	G/F/I	Diurno	Residente	Aberto	146,88
Mimus gilvus	I	Diurno	Residente	Aberto	51,99
Myiarchus ferox	I/F	Diurno	Residente	Aberto	27,5
Myiarchus tyrannulus	I	Diurno	Migratória	Aberto	35,45
Myiodynastes maculatus	O	Diurno	Migratória	Aberto	43,2
Myiopagis viridicata	O	Diurno	Residente	Aberto	11,51
Myiothlypis flaveola	I	Diurno	Residente	Fechado	13,19
Neopelma pallescens	I	Diurno	Residente	Aberto	18,2
Nyctidromus albicollis	I	Noturno	Residente	Aberto	57,84
Nystalus maculatus	I	Diurno	Residente	Fechado	42
Pachyramphus polychopterus	I/F	Diurno	Residente	Fechado	20,8
Phaeomyias murina	I/F	Diurno	Residente	Aberto	10
Piaya cayana	I	Diurno	Residente	Aberto	101,98
Picumnus fulvescens	I	Diurno	Residente	Fechado	11,32
Pitangus sulphuratus	O	Diurno	Residente	Fechado	62,85
Polioptila plumbea	I	Diurno	Residente	Aberto	6
Procacicus solitarius	I	Diurno	Residente	Fechado	79,76
Schistochlamys ruficapillus	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	31,2
Sporophila albogularis	G	Diurno	Residente	Aberto	9,7
Synallaxis frontalis	I	Diurno	Residente	Fechado	14
Synallaxis scutata	I	Diurno	Residente	Fechado	15,4
Tachyphonus rufus	I/F	Diurno	Residente	Aberto	34,4
Tangara cayana	F	Diurno	Residente	Aberto	18
Tangara palmarum	F/G	Diurno	Residente	Aberto	39
Tangara sayaca	F/G	Diurno	Migratória	Aberto	32,49
Taraba major	I	Diurno	Residente	Aberto	59,2
Thamnophilus doliatus capistratus	I	Diurno	Residente	Aberto	27,03
Thamnophilus pelzelni	I	Diurno	Residente	Aberto	20,9
Tolmomyias flaviventris	I	Diurno	Residente	Fechado	12,2
Troglodytes musculus	I	Diurno	Residente	Fechado	10,85
Trogon curucui	I	Diurno	Residente	Fechado	54
Turdus amaurochalinus	I/F	Diurno	Migratória	Aberto	57,9
Turdus flavipes	F	Diurno	Migratória	Aberto	65,14
Turdus leucomelas	I	Diurno	Residente	Aberto	69,1
Turdus rufiventris	I/F	Diurno	Residente	Aberto	69,44
Vireo chivi	O	Diurno	Migratória	Aberto	16,06

Tabela S2. Aves migratórias capturadas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Rio Grande do Norte, Brasil. O *status* de infecção, gênero e linhagens dos parasitos, quando identificados, são indicados. O tamanho amostral e o número de infecções detectadas em cada espécie de ave, além do número de aves infectadas por cada linhagem, estão indicados entre parênteses. Como não foram sequenciadas todas as infecções diagnosticadas, o número de aves da coluna "*Status* de infecção" pode não ser equivalente ao número da coluna "Linhagem".

Espécie		***Status* de infecção**	**Gênero**	**Linhagem**
Nome científico	**Nome popular**			
Coccyzus melacoryphus (2)	Papa-lagarta-acanelado	Não infectado	-	-
Columbina picui (1)	Rolinha-picui	Não infectado	-	-
Cyanerpes cyaneus (1)	Saíra-beija-flor	Infectado (1)	Não sequenciado	-
Elaenia albiceps (244)	Guaracava-de-crista-branca	Infectado (40)	*Plasmodium* e *Haemoproteus*	*Plasmodium* BAFLA03 (1), BAFLA04 (1), PADOM09 (1), PADOM17 (1), TURNUD02, *Haemoproteus* ELALB01(1), UN203 (1)
Elaenia chiriquensis (2)	Chibum	Não infectado	-	-
Elaenia cristata (96)	Guaracava-de-topete-uniforme	Infectado (12)	Não sequenciado	-
Elaenia spectabilis (9)	Guaracava-grande	Infectado (2)	*Plasmodium*	BAFLA04 (1)
Empidonomus varius (1)	Peitica	Não infectado	-	-
Myiarchus tyrannulus (4)	Maria-cavaleira-de-rabo-enferrujado	Infectado (1)	*Haemoproteus*	ELALB01 (1)
Myiodynastes maculatus (1)	Bem-te-vi-rajado	Não infectado	-	-
Schistochlamys ruficapillus (9)	Bico-de-veludo	Infectado (2)	Não sequenciado	-
Tangara sayaca (7)	Sanhaçu-cinzento	Não infectado	-	-
Turdus amaurochalinus (156)	Sabiá-poca	Infectado (20)	*Plasmodium*	U12 (1), TUAMA01 (1), DENPET03 (1)
Turdus flavipes (11)	Sabiá-una	Infectado (3)	*Plasmodium* e *Haemoproteus*	*Plasmodium* DENPET03 (1), PADOM09 (1) *Haemoproteus* TARUF02 (1)
Vireo chivi (10)	Juruviara-boreal	Infectado (5)	*Haemoproteus*	VIREO02 (1)

CAPÍTULO 2

Infecção crônica por *Haemoproteus* reduz a sobrevivência e aumenta a probabilidade de captura de pipira-preta (*Tachyphonus rufus*)

1. INTRODUÇÃO

Os parasitos podem ter uma forte influência na sobrevivência, reprodução e dispersão de seus hospedeiros. Muitos estudos já demonstraram que o parasitismo induz alterações no comportamento do hospedeiro (Eberhard 2000; Møller 2008) ou afeta sua capacidade de evitar a predação (Hudson *et al.*, 1992; Lafferty & Morris, 1996). Os parasitos podem também reduzir o sucesso reprodutivo ou o tempo de vida de seus hospedeiros (Dufva 1996; Marzal et al. 2005; Asghar et al. 2015). Um dos parasitos mais comuns em aves silvestres são os hemosporídeos e seu estudo em populações de hospedeiros vertebrados contribuiu muito para o conhecimento de vários aspectos da ecologia e evolução da relação parasito-hospedeiro (Bensch et al. 2000). No entanto, os impactos dos hemoparasitos na sobrevivência, reprodução e comportamento do hospedeiro permanecem pouco compreendidos, especialmente em populações silvestres, onde resultados contraditórios foram descritos. Por exemplo, alguns pesquisadores sugeriram que a infecção por hemosporídeos está associada a reduções na massa corporal do hospedeiro (Dawson & Bortolotti, 2000; Schrader *et al.*, 2003; Garvin *et al.*, 2006), mas outros estudos não conseguiram identificar essa influência (Bennett et al. 1988; Shurulinkov et al. 2012). Além disso, enquanto alguns achados indicaram uma redução na sobrevivência de aves infectadas por hemosporídeos (Dawson and Bortolotti 2000; Marzal et al. 2008; Puente et al. 2010; Kulma et al. 2013), outros pesquisadores não observaram correlação entre infecção por hemosporídeos e sobrevivência do hospedeiro (Tella et al. 1996; Schrader et al. 2003; Podmokła et al. 2017) e um estudo de longo prazo relatou maior sobrevida em aves infectadas em comparação com aves não infectadas (Zylberberg et al. 2015). Os mesmos resultados contraditórios existem quando se examina o efeito dos hemosporídeos no sucesso reprodutivo das aves. Enquanto alguns achados indicaram uma influência negativa da infecção na proporção de ninhegos que sobrevivem e se tornam adultos (Merino et al. 2000; Marzal et al. 2005), outros pesquisadores observaram um maior sucesso reprodutivo em aves infectadas por hemosporídeos (Sanz et al. 2001; Marzal et al. 2008; Podmokła et al. 2014).

Diferentes espécies de hemosporídeos podem causar efeitos distintos sobre o *fitness* do hospedeiro (Lachish et al. 2011), portanto, estudos espécie-específicos podem revelar relações que são mascaradas quando um hospedeiro é infectado por múltiplas

espécies de parasitos hemosporídeos. Uma avaliação mais precisa das interações entre hospedeiros e parasitos é obtida a partir de estudos detalhados de parasitos específicos, em vez de tratá-los coletivamente (Bensch et al. 2007). Além disso, estudos focados em uma única população hospedeira podem revelar informações valiosas e *insights* que podem ser aplicados à conservação de espécies.

Em estudos populacionais, a probabilidade de infecção e a prevalência do parasito podem variar em função de características individuais como o sexo, a idade e as estações do ano (período reprodutivo *versus* período não-reprodutivo) (Norris et al. 1994; Richner et al. 1995; Calero-Riestra & García 2016; Carlson et al. 2018). A exposição diferencial e a vulnerabilidade ao parasito são duas forças interagentes que podem ser responsáveis pela diferença na infecção entre hospedeiros e entre os sexos (Zuk & McKean, 1996). Por exemplo, comportamentos que diferem entre machos e fêmeas, como hábitos alimentares, uso do habitat ou esforço parental, podem aumentar ou reduzir a exposição de um gênero de ave a um parasito específico (por exemplo, Drobney et al. 1983, Tinsley 1989, Richner et al. 1995). Além disso, o estresse e as diferenças hormonais entre os sexos podem tornar alguns indivíduos mais suscetíveis a uma infecção específica do parasito (Poulin 1996). Níveis elevados de testosterona durante a estação reprodutiva, observados em algumas espécies de aves, podem estar correlacionados com a supressão da resposta imune aos parasitos (Hegner & Wingfield, 1987). Consequentemente, as aves podem tornar-se mais suscetíveis a infecções durante a época de reprodução, criando uma demanda conflitiva entre a reprodução (isto é, o investimento parental) e a defesa imunológica (Ardia 2005).

Um fator limitante em estudos de malária aviária que usam abordagem molecular é a incerteza sobre os gêneros e linhagens dos parasitos detectados em algumas amostras de hospedeiros. Isso acontece porque os dois gêneros de parasitos têm a mesma pequena subunidade do gene 16S rRNA usado no diagnóstico da PCR, portanto os sítios de ligação dos *primers* são conservados em uma ampla gama de parasitos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* (Fallon et al. 2003). Assim, os gêneros dos parasitos não podem ser distinguidos pelo diagnóstico de PCR, em vez disso, é necessária uma análise de sequenciamento de alta qualidade para determinar o parasito alvo. Infelizmente, sequências de alta qualidade são difíceis de produzir para todas as amostras em estudos de malária aviária (por exemplo, Ricklefs *et al.* 2005;

Fallon *et al.* 2006; Fallon & Ricklefs 2008; Svensson-Coelho *et al.* 2013), e consequentemente, os estudos permanecem com um grande número de amostras PCR positivas para as quais não é possível determinar claramente o parasito, ou seja, *Plasmodium* ou *Haemoproteus*.

Neste estudo explorou-se uma relação parasito-hospedeiro entre a espécie de ave pipira-preta *Tachyphonus rufus* e uma linhagem de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*). Este gênero de hemosporídeo é uma escolha adequada para se investigar interações parasito-hospedeiro específicas, uma vez que os estudos com hemosporídeos indicam que *Haemoproteus* é, em geral, mais específico que *Plasmodium* na infecção de seus hospedeiros (Atkinson & Van Riper III, 1991; Bennett *et al.*, 1993; Bensch *et al.*, 2000; Ayadi *et al.*, 2017). Explorou-se a influência do parasito alvo, da estação (reprodução/não-reprodução) e do sexo na probabilidade de sobrevivência das aves entre as ocasiões de amostragem mensal (sobrevivência mensal). Esperava-se uma relação negativa entre a infecção por *Haemoproteus* e a sobrevivência. Aves podem se tornar mais suscetíveis a infecções por outros patógenos e à predação devido a efeitos adversos derivados de uma infecção, como um alto investimento em defesa imunológica e o uso de recursos importantes do hospedeiro pelo parasito (por exemplo, parasitos drenam energia de seus hospedeiros extraindo nutrientes; Price 1980; Hudson et al. 1992; Puente et al. 2010). Investigou-se também se a época reprodutiva ou o sexo eram fatores que influenciavam a sobrevivência das aves, pois traços espécie-específicos e fatores fisiológicos do indivíduo podem ser importantes reguladores da sobrevivência (Sorci et al. 1996; Szekely et al. 2014). Também foi considerada a ocorrência de aves transientes, que não estão disponíveis para captura em ocasiões subsequentes na área de estudo.

Explorou-se também a influência da estação reprodutiva e do sexo na probabilidade de uma ave transitar de um estado não infectado para um estado infectado entre ocasiões de captura. Esperava-se uma maior probabilidade de infecção nas aves durante a época de reprodução, porque as mudanças comportamentais que ocorrem nesse período podem levar a uma maior exposição ou vulnerabilidade ao *Haemoproteus* (Drobney et al. 1983; Ardia 2005). Além disso, esperava-se que a probabilidade de infecção pudesse variar entre os sexos, já que a exposição ao vetor pode ocorrer de forma diferente em aves de diferentes gêneros (Tinsley, 1989; Zuk & McKean, 1996).

Explorou-se a influência da infecção por *Haemoproteus*, da época de reprodução e do sexo na probabilidade de captura de um indivíduo, dado que ele estava vivo e na área de estudo durante uma ocasião de amostragem específica. Esperava-se que a probabilidade de captura fosse influenciada pelo sexo, porque machos e fêmeas têm diferentes comportamentos de movimento, o que poderia levar a uma probabilidade de captura diferencial (Borrás & Senar, 1986; Domènech & Senar, 1998). Esperava-se que as probabilidades de captura fossem diferentes durante a época de reprodução, porque as aves podem alterar o seu comportamento de movimento devido ao cuidado parental, aumentando a probabilidade de serem capturadas por redes de neblina (Nichols et al. 1994). Também esperava-se que as aves infectadas tivessem probabilidade de captura diferente das aves não infectadas porque, em muitas situações, os parasitos podem induzir mudanças no comportamento, níveis de atividade ou processos fisiológicos, o que poderia influenciar a amostragem de aves em um determinado estado de infecção (Jennelle et al. 2007; Podmokła et al. 2017).

Finalmente, explorou-se a influência da estação e do sexo na proporção da população infectada pelo parasito alvo durante cada ocasião, o que é análogo à prevalência do parasito alvo na população de aves. Esperava-se uma maior prevalência de parasitos durante a época de reprodução, pois as mudanças fisiológicas podem aumentar a suscetibilidade dessas aves à infecção por *Haemoproteus* (Richner et al. 1995). Também esperava-se que aves de diferentes gêneros poderiam ter prevalências diferentes, já que machos e fêmeas podem ter diferentes suscetibilidades ao parasito (Zuk 1990; Poulin 1996).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Características da espécie hospedeira, *Tachyphonus rufus*, e área de estudo

A pipira-preta (*Tachyphonus rufus*) é uma ave passeriforme da família Thraupidae, endêmica dos neotrópicos e muito comum no litoral nordeste do Brasil, nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Sick 1997). Esta espécie se alimenta predominantemente de frutas e insetos e forrageia nos estratos baixo e médio da vegetação (del Hoyo et al. 2011; Sigrist 2014). Esta espécie é ideal para se investigar o impacto de parasitos na dinâmica individual e populacional: machos e fêmeas adultos têm tamanho similar (34,4g), são tipicamente encontrados em pares e são sexualmente dimórficos, permitindo fácil identificação em campo. Por ser uma espécie residente, não há indícios de que as aves se locomovam por grandes áreas (del Hoyo et al. 2011), tornando mais efetivo o estudo populacional através da captura-marcação-recaptura. No local do presente estudo, a estação reprodutiva da espécie se estende de fevereiro a maio (Macario et al. 2017), e esse foi o período do ano considerado como período reprodutivo para testar as diferenças sazonais nas taxas vitais, ou seja, sobrevivência e probabilidades de transição.

Os detalhes sobre a área de estudo estão descritos no capítulo 1 (sessão 2.1. Área de Estudo, pág. 12).

2.2. Amostragem das aves

A dinâmica da infecção por *Haemoproteus* em uma população de pipira-preta em uma área de 30 ha (550 m x 550 m) no Centro de Lançamento Barreira do Inferno (CLBI) foi avaliada no período entre abril de 2013 a dezembro de 2014 (21 meses). A metodologia para captura das aves está descrita no capítulo 1 (sessão 2.1. Área de Estudo, pág. 12). Os indivíduos de pipira-preta capturados foram sexados de acordo com características da plumagem, sendo os machos pretos com coberteiras alares e área inferior das asas na cor branca, e fêmeas com plumagem castanha uniforme (Sick 1997). Todos os indivíduos foram marcados com anilhas metálicas numeradas individuais fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE / ICMBio). Amostras de sangue foram coletadas para todas as aves (primeira captura e recapturas) para investigação de hemosporídeos em cada ocasião de captura.

2.3. Detecção molecular dos parasitos

Para a investigação molecular dos parasitos foram utilizados os protocolos descritos no Capítulo 1 (sessões 2.3 a 2.5, páginas 14-17).

Nas análises realizadas, cada ave da população está em um dos dois estados mutuamente exclusivos durante cada ocasião de captura: infectado (*I*) ou não infectado (*N*) por linhagens de *Haemoproteus*. A combinação dos procedimentos de análise molecular descritas foram utilizadas para classificar cada ave capturada como: (1) infectada (*I*), quando a amostra de sangue foi PCR positiva para *Plasmodium*/*Haemoproteus* e o parasito foi identificado via sequenciamento como sendo do gênero *Haemoproteus*; (2) não infectada (*N*) por linhagens de *Haemoproteus*, quando a amostra de sangue foi negativa para hemosporídeos na PCR ou quando a ave foi positiva e o sequenciamento indicou que a ave estava infectada com linhagens de *Plasmodium*; ou (3) estado incerto (*u*) quando o sangue era positivo para *Plasmodium*/*Haemoproteus* na PCR, mas o parasito não pôde ser identificado via sequenciamento. Indivíduos de aves podem fazer a transição entre estados infectados e não infectados ao longo do tempo. Consideramos que, uma vez infectada, a ave manterá a infecção por muitos anos ou até por toda a sua vida de forma crônica e com baixa parasitemia (Bishop et al. 1938; Atkinson et al. 2001; Santiago-Alarcon et al. 2013). Portanto, nos casos em que houve a detecção da infecção em um indivíduo em uma ocasião, porém em uma próxima recaptura o indivíduo apresentou diagnóstico negativo para este parasito, assumimos que houve uma falha de detecção, ou seja, um falso negativo.

2.4. Modelagem dos parâmetros do modelo como uma função das variáveis preditoras

Exploramos as hipóteses através do modelo multi-estado de captura-marcação com incerteza de estado (Kendall et al. 2004), que permite três estados (diagnósticos de infecção) observados sendo, dois estados certos (isto é, categorias/diagnósticos certos: infectado (*I*) e não-infectado (*N*) por *Haemoproteus*) e um único estado incerto (ou seja, categoria/diagnóstico incerto: infectado sem identificação do gênero do parasito (*u*)) nos históricos de captura dos indivíduos. Nos modelos multi-estado mais simples considera-se que o indivíduo pode ter sido capturado em mais de um “estado”, ou seja, em cada ocasião de captura ele pode estar em uma condição diferente (Nichols et al. 1994). Esses

diferentes estados podem representar áreas geográficas, condições reprodutivas (reproduzindo ou não-reproduzindo), condições corporais (nutrido ou sub-nutrido), estados de infecção (infectado ou não infectado), etc. (Nichols and Kendall 1995). Nesses modelos, são estimadas as probabilidades de transição entre estes estados, as probabilidades de sobrevivência e as probabilidades de detecção para cada um dos estados. Portanto, em um estudo com dois estados dos indivíduos, por exemplo, os históricos de captura poderão apresentar três possíveis situações: A (capturado no estado A), B (capturado no estado B) ou "0" (não detectado). Esses modelos multiestado assumem, portanto, que os estados dos indivíduos são registrados corretamente (Nichols and Kendall 1995). No nosso estudo, adicionou-se um terceiro estado de infecção, o estado incerto, pois há uma probabilidade de que o parasito alvo não tenha sido detectado em aves infectadas devido à dificuldade de sequenciamento de todas as amostras infectadas. Esta classificação potencialmente incorreta tenderia a produzir probabilidades subestimadas de infecção se calculada usando-se os modelos multiestado tradicionais (Nichols et al. 1994). Assim, neste estudo, os dois estados certos incluíram quando uma ave foi capturada e os testes foram negativos (*N*) ou positivos para *Haemoproteus* (*I*), e o estado incerto incluiu quando uma ave foi capturada, mas os testes foram ambíguos (isto é, o *Haemoproteus* pode ou não estar presente no indivíduo naquele momento - ou ocasião). Finalmente, quando uma ave não foi capturada em uma ocasião específica, o histórico de detecção contém um zero (0) para essa ocasião.

Nossos modelos incluem dois parâmetros (ou seja, δ^{I} e δ^{N}) para estimar a probabilidade de se classificar corretamente/observar o estado, dado que o indivíduo estava infectado (*I*) ou não infectado (*N*), respectivamente. Especificamente, δ^{I} representa a probabilidade de os testes detectarem o parasito alvo em aves infectadas por linhagens de *Haemoproteus*, isto é, a probabilidade de não ocorrer um falso negativo. Da mesma forma, o parâmetro δ^{N} representa a probabilidade de se classificar corretamente uma ave não infectada por *Haemoproteus* como não infectada através dos testes, ou seja, a probabilidade de não ocorrer um falso positivo. Como não houve detecção de falsos positivos, o δ^{N} foi fixado em 1 (ou 100% de classificação correta de indivíduos não infectados). Além disso, o modelo de incerteza de estado inclui *pi*, definido como a proporção de indivíduos liberados pela primeira vez no estado *u* que se

tornaram infectados (*I*). Como havia apenas um indivíduo liberado pela primeira vez no estado *u*, as estimativas para esse parâmetro foram ignoradas.

As variáveis dependentes focais, sobrevivência do hospedeiro (*S*) e probabilidades de transição de um estado não infectado para um estado infectado (Ψ^{NI}), foram utilizadas no modelo como uma função das variáveis preditoras (ou seja, nossas hipóteses). Todos os modelos/hipóteses foram ajustados aos históricos de captura dos indivíduos com 21 ocasiões mensais de captura usando o *design* robusto multi-estado com incerteza de estado no programa MARK (White & Burnham, 1999). O *design* robusto envolve a amostragem em duas escalas temporais. Na maior escala estão as ocasiões primárias, que permitem mudanças na população através de nascimentos, mortes, emigração e imigração. Nessa escala utilizam-se modelos de população aberta para estimar parâmetros como a sobrevivência. Dentro de cada ocasião primária há múltiplas ocasiões secundárias separadas por um período relativamente curto de tempo. Nas ocasiões secundárias assume-se que a população é fechada e podem-se usar os modelos apropriados para estimativa da abundância. Desta forma, como nossas amostragens foram realizadas em apenas uma ocasião, considera-se que, do ponto de vista estatístico, nossos dados não foram coletados sob um design robusto. Para adequar os dados à análise, uma *Dummy* ou ocasião "fictícia" (uma coluna de zeros) foi adicionada para cada uma das ocasiões mensais (primárias) (n = 21) e a probabilidade de captura para essas ocasiões foi definida como zero. O cálculo de sobrevivência da população foi feito entre meses (ou seja, nossa ocasião primária), sendo os indivíduos colocados nas linhas e os meses nas colunas. Para explorar a hipótese dos indivíduos transientes, avaliamos se os indivíduos recém-capturados em cada nova ocasião (ou mês) teria uma sobrevivência distinta dos demais indivíduos (aqueles que já haviam sido capturados nos outros meses). Como não se tem na literatura informações sobre o comportamento territorial da pipira-preta (caso a espécie seja territorialista, não haveria a ocorrência de indivíduos transientes), torna-se importante explorar essa hipótese. Não considerar possíveis animais transientes em estudos de captura e recaptura deve subestimar a probabilidade de sobrevivência de aves residentes (Pradel et al. 1997).

Usamos o Critério de Informação de Akaike, ajustado para amostras pequenas (AICc), para determinar quais os modelos/hipóteses concorrentes e fatores associados eram os mais parcimoniosos (Burnham & Anderson, 2002). A estratégia de "*step-down*"

(Lebreton et al. 1992) foi utilizada para avaliar os modelos candidatos. Usando a estrutura de modelo mais parametrizada, contendo todas os fatores de interesse para a probabilidade de sobrevivência (*S*), probabilidade de transição (Ψ^{NI}) e proporção da população infectada pelo parasito alvo (ω), primeiro exploraram-se as diferentes estruturas/hipóteses para probabilidade de captura (*p*) (Tabela 1: Passo 1). Mantendo os melhores modelos suportados para probabilidade de captura (estruturas *p* com Δ AICc $\leq$ 2), ajustaram-se quatro estruturas de modelo representando possíveis influências da estação e do sexo na prevalência do parasito alvo (ω), usando as estruturas mais parametrizadas para os outros parâmetros (ou seja, Ψ^{NI} e *S*; Tabela 1: Passo 2). A mesma estratégia foi adotada para identificar os modelos mais bem suportados para probabilidade de sobrevivência (*S*) e a probabilidade de um indivíduo ser infectado (probabilidade de transição, Ψ^{NI}, Tabela 1: Passos 3-4). Devido à incerteza na seleção de modelos, foram apresentadas as estimativas médias dos parâmetros reais através da média ponderada dos modelos (Burnham & Anderson, 2002).

Tabela 1. Resultados da seleção de modelos para modelos multi-estado com incerteza de estado ajustados aos dados de marcação e recaptura de uma população de pipira-preta no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. Foram mantidas as estruturas de modelo mais parcimoniosas para cada um dos parâmetros de interesse seguindo os passos mostrados abaixo. Primeiro, a probabilidade de captura (*p*) foi modelada em função do parasito alvo, da época de reprodução e do sexo, usando uma estrutura geral para os demais parâmetros do modelo. Mantendo a estrutura de probabilidade de captura melhor suportada, a prevalência do parasito alvo (ω) foi modelada em função da estação reprodutiva e do sexo. Mantendo a estrutura de prevalência melhor suportada, a probabilidade de sobrevivência mensal (*S*) foi modelada como função do parasito alvo, da época de reprodução, do sexo e explorou-se a presença de aves transitórias. Finalmente, a probabilidade de uma ave passar de um estado não infectado para um estado infectado (Ψ^{NI}) foi modelada em função da estação reprodutiva e do sexo. O parâmetro *pi* é definido como a proporção de indivíduos liberados pela primeira vez no estado *u* que foram infectados pelo parasito alvo. O parâmetro Delta estima a probabilidade de se classificar/observar corretamente o estado dado que o indivíduo foi infectado (*I*) ou não infectado (*N*) pelo parasito alvo. O sinal de mais (+) significa um efeito aditivo entre duas ou mais covariáveis testadas e o ponto (.) significa nenhum efeito da covariável nos parâmetros de interesse.

Passo 1 - Modelagem da probabilidade de captura (*p*)

Modelo	AICc	Delta AICc	Peso AICc	Probabilidade do modelo	N° Parâmetros	Desvio
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), ω(Estação+Sexo), Delta(.), pi (.)}	14774,23	0,00	0,80	1,00	15	14740,59
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Sexo), ω(Estação+Sexo), Delta(.), pi (.)}	14777,40	3,17	0,17	0,21	15	14743,76
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(.), ω(Estação+Sexo), Delta(.), pi (.)}	14781,46	7,23	0,02	0,03	14	14750,30
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Estação), ω(Estação+Sexo), Delta(.), pi (.)}	14783,29	9,06	0,01	0,01	15	14749,66

Passo 2 - Modelagem da prevalência (ω)

Modelo	AICc	Delta AICc	Peso AICc	Probabilidade do modelo	N° Parâmetros	Desvio
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), ω(.), Delta(.), pi (.)}	14770,20	0,00	0,49	1,00	13	14741,48
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), ω (Estação), Delta(.), pi (.)}	14771,40	1,20	0,27	0,55	14	14740,24
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), ω (Sexo), Delta(.), pi (.)}	14772,41	2,22	0,16	0,33	14	14741,26
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), ω (Estação+Sexo), Delta(.), pi (.)}	14773,64	3,45	0,09	0,18	15	14740,01

Passo 3 - Modelagem da probabilidade de transição (Ψ^{NI})

Modelo	AICc	Delta AICc	Peso AICc	Probabilidade do modelo	N° Parâmetros	Desvio
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), ω (.), Delta(.), pi (.)}	14768,24	0,00	0,30	1,00	12	14741,93
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), ω (.), Delta(.), pi (.)}	14769,19	0,95	0,19	0,62	11	14745,25
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14769,41	1,17	0,17	0,56	13	14740,69
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14770,21	1,97	0,11	0,37	13	14741,49
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Sexo), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14770,72	2,48	0,09	0,29	12	14744,41
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação + Sexo), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14771,41	3,17	0,06	0,21	14	14740,25
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14771,49	3,25	0,06	0,20	12	14745,18
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Sexo), p(Parasito), ω a(Estação), Delta(.), pi (.)}	14773,37	5,13	0,02	0,08	13	14744,66

Passo 4 – Modelagem da probabilidade mensal de sobrevivência (*S*)

Modelo	AICc	Delta AICc	Peso AICc	Probabilidade do modelo	N° Parâmetros	Desvio
{S(.),Ψ^{NI}(Estação), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14764,74	0,00	0,13	1,00	8	14747,71
{S(Parasito), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14764,89	0,15	0,12	0,93	9	14745,59
{S(Estação), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14765,13	0,39	0,11	0,82	9	14745,83

{S(.),Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14765,77	1,03	0,08	0,60	9	14746,47
{S(Parasito), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14765,95	1,21	0,07	0,55	10	14744,35
{S(.),Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14766,14	1,40	0,07	0,50	7	14751,34
{S(Estação), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14766,19	1,45	0,06	0,48	10	14744,59
{S(Estação), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14766,21	1,47	0,06	0,48	8	14749,18
{S(Parasito), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14766,23	1,49	0,06	0,47	8	14749,20
{S(Sexo), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14766,89	2,14	0,04	0,34	9	14747,58
{S(Transientes), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14766,97	2,22	0,04	0,33	9	14747,66
{S(Sexo), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14767,95	3,20	0,03	0,20	10	14746,34
{S(Transientes), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14768,03	3,28	0,03	0,19	10	14746,42
{S(Sexo), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14768,23	3,49	0,02	0,17	8	14751,20
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14768,24	3,50	0,02	0,17	12	14741,93
{S(Transientes), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14768,30	3,55	0,02	0,17	8	14751,26
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (.), p(Parasito), Ω(.), Delta(.), pi (.)}	14769,19	4,44	0,01	0,11	11	14745,25
{S(Parasito + Estação + Sexo + Transientes), Ψ^{NI} (Estação), p(Parasito), Ω(Estação), Delta(.), pi (.)}	14769,41	4,66	0,01	0,10	13	14740,69

3. RESULTADOS

No total, foram capturados 94 indivíduos de pipira-preta (35 fêmeas, 44 machos, 15 com sexo indefinido), totalizando 164 ocorrências (Tabela 2). Dentre essas ocorrências, 61 indivíduos foram capturados uma única vez, 19 tiveram uma recaptura, quatro tiveram duas recapturas, três foram recapturados três vezes, cinco foram recapturados quatro vezes, um indivíduo teve cinco recapturas e um indivíduo teve oito recapturas. O número de aves capturadas em diferentes meses variou de dois (abril/2013) a 15 (março/2014) e o período chuvoso teve menor número de capturas (n=60) quando comparado ao período seco (n=103).

Das 164 amostras de sangue coletadas, 112 foram positivas para *Plasmodium* ou *Haemoproteus* e foram submetidas à *nested*-PCR, que amplificou 71 infecções com sucesso e as 41 amostras positivas remanescentes foram designadas como incertas (*u*). Em dois indivíduos houve a detecção de duas linhagens de parasito infectando a ave em diferentes ocasiões de captura, enquanto os demais indivíduos (n=62) foram infectados por apenas uma linhagem. Apenas 30 indivíduos da população não estavam infectados, sendo 27 destes indivíduos sem nenhuma recaptura e apenas três que foram recapturados apenas uma vez. A análise de sequenciamento e a busca no Genbank revelaram a presença de cinco linhagens infectando pipiras-pretas no local de estudo, incluindo três linhagens de *Plasmodium*, detectadas em seis amostras e duas linhagens de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*), detectadas em 65 amostras de sangue (Tabela 3). Entre as amostras positivas para *Haemoproteus*, 64 pertenciam a uma única linhagem, TARUF02, detectada aqui pela primeira vez. Como a linhagem TARUF02 representou quase todas as infecções por *Haemoproteus* detectadas em nosso estudo (64 de 65 no total) e representou 90% das sequências amplificadas do citocromo *b* (n = 71), dominando as infecções por hemosporídeos em pipira-preta no CLBI, esta linhagem ficou definida como o parasito alvo em todas as análises de modelagem realizadas neste estudo. Portanto, as sete infecções por outras linhagens que foram detectadas na população foram categorizadas como estado não infectado (*N*). Em vários indivíduos analisados verificou-se que a infecção por esta linhagem de *Haemoproteus* pôde ser detectada ao longo de várias recapturas em diferentes meses, indicando que, possivelmente, haja uma infecção crônica por este parasito na população.

Tabela 2. Indivíduos de pipira-preta capturados ao longo de 21 meses de estudo (abril de 2013 a dezembro de 2014) e seu estado de infecção por *Plasmodium* ou *Haemoproteus* detectado a partir do sequenciamento do gene mitocondrial do citocromo *b* destes parasitos. C = primeira captura do indivíduo; R1-R8 = recapturas; M/A = mês/ano em que a ave foi capturada; P = diagnóstico positivo sem identificação de linhagem; N = diagnóstico negativo; ND = positivo em uma captura anterior, mas não detectado no evento atual; TARUF02 = linhagem *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) TARUF02; PAMIT01 = linhagem *Plasmodium* PAMIT01; PADOM11 = linhagem *Plasmodium* PADOM11; UN203 = linhagem *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) UN203; BAFLA04 = linhagem *Plasmodium* BAFLA04.

	Recapturas																	
	C		**R1**		**R2**		**R3**		**R4**		**R5**		**R6**		**R7**		**R8**	
Indivíduo	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico	M/A	Diagnóstico
1	jul/13	TARUF02	set/13	TARUF02														
2	jul/13	N	dez/14	N														
3	set/13	N	mar/14	N														
4	set/13	TARUF02	fev/14	TARUF02														
5	set/13	TARUF02	mar/14	ND														
6	jun/13	TARUF02	set/13	TARUF02														
7	ago/13	TARUF02	set/13	TARUF02	dez/13	TARUF02	fev/14	PAMIT01	mar/14	TARUF02								
8	may/13	P	fev/14	P	abr/14	TARUF02												
9	ago/13	TARUF02	fev/14	TARUF02														
10	nov/13	N	dez/13	TARUF02														
11	jan/14	TARUF02	fev/14	TARUF02	dez/14	P												
12	jun/14	P	nov/14	P														
13	dez/13	N	mai/14	P	jun/14	N	set/14	P	out/14	N								
14	dez/13	PADOM11	jan/14	TARUF02	fev/14	TARUF02	abr/14	P	mai/14	ND	ago/14	TARUF02						
15	jan/14	TARUF02	mar/14	TARUF02	mai/14	P	ago/14	P	nov/14	P								
16	jan/14	TARUF02	out/14	P														

17	out/14	P	nov/14	N														
18	set/14	P	nov/14	P														
19	abr/13	N	dez/13	UN203														
20	mai/13	N	out/13	TARUF02														
21	jun/13	TARUF02	out/13	TARUF02														
22	jun/13	TARUF02	jul/13	TARUF02	ago/13	TARUF02	out/13	TARUF02	nov/13	P	dez/13	TARUF02	fev/14	TARUF02	abr/14	P	nov/14	TARUF02
23	set/13	P	mar/14	BAFLA04	jul/14	BAFLA04	set/14	ND										
24	out/13	TARUF02	abr/14	ND	jul/14	P												
25	mar/14	TARUF02	set/14	N														
26	mai/13	TARUF02	dez/13	ND	fev/14	TARUF02	mar/14	ND	set/14	TARUF02								
27	mai/13	TARUF02	jan/14	TARUF02	ago/14	ND	set/14	TARUF02										
28	dez/13	N	ago/14	N														
29	mai/13	N	nov/13	TARUF02	fev/14	TARUF02	mai/14	ND	set/14	P								
30	set/13	N	dez/13	P	jun/14	BAFLA04												
31	ago/13	N	set/13	TARUF02														
32	nov/13	TARUF02	jan/14	TARUF02														
33	dez/13	N	jan/14	TARUF02	mar/14	TARUF02	set/14	P										
34	abr/13	N																
35	mar/14	TARUF02																
36	jun/14	N																
37	set/13	TARUF02																
38	set/13	TARUF02																
39	nov/14	N																
40	dez/14	P																
41	jun/13	P																
42	mar/14	P																
43	jun/14	N																
44	out/14	N																

45	set/13	N								
46	dez/14	N								
47	out/13	TARUF02								
48	out/13	TARUF02								
49	nov/13	P								
50	dez/13	P								
51	dez/13	P								
52	mar/14	N								
53	mar/14	TARUF02								
54	mar/14	P								
55	mar/14	N								
56	out/14	N								
57	abr/14	P								
58	mai/14	N								
59	mai/14	N								
60	jan/14	P								
61	jan/14	P								
62	jan/14	TARUF02								
63	fev/14	N								
64	jul/14	N								
65	ago/14	N								
66	nov/14	N								
67	nov/14	N								
68	nov/14	P								
69	out/14	P								
70	nov/14	TARUF02								
71	set/14	N								
72	dez/13	TARUF02								

73	out/13	N								
74	mai/13	TARUF02								
75	fev/14	P								
76	fev/14	P								
77	set/14	TARUF02								
78	fev/14	P								
79	dez/13	P								
80	out/13	N								
81	out/13	N								
82	jul/14	N								
83	set/13	N								
84	jul/13	TARUF02								
85	nov/13	TARUF02								
86	ago/13	N								
87	dez/14	TARUF02								
88	dez/14	P								
89	dez/14	N								
90	dez/14	N								
91	dez/14	TARUF02								
92	dez/14	N								
93	dez/14	TARUF02								
94	dez/14	P								

Tabela 3. Linhagens de hemosporídeos detectadas em indivíduos de pipira-preta *Tachyphonus rufus* amostradas no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. A= número de amostras nas quais esta linhagem foi detectada (incluindo recapturas); I = número de indivíduos infectados.

Linhagem	**Gênero do parasito**	**A**	**I**	**Genbank**
BAFLA04	*Plasmodium*	04	03	MK264394
PADOM11	*Plasmodium*	01	01	MK264401
PAMIT01	*Plasmodium*	01	01	MK264403
TARUF02	*Haemoproteus (Parahaemoproteus)*	64	32	MH260577
UN203	*Haemoproteus (Parahaemoproteus)*	01	01	MK264410

A probabilidade de sobrevivência mensal foi influenciada negativamente pela infecção pelo parasito alvo e pela época de reprodução (Tabela 1: Passo 4). As probabilidades de sobrevivência mensal foram sempre maiores em aves não infectadas (não reprodutiva: 0,94 com IC 95% = 0,73-0,99; reprodutiva: 0,90 com IC 95% = 0,66-0,98), quando comparado às aves infectadas (não reprodutiva: 0,91 com IC 95% = 0,73-0,98; reprodutiva: 0,86 com IC 95% = 0,62-0,96), independente se estavam se reproduzindo ou não. E em aves que estavam se reproduzindo, a probabilidade de sobrevivência mensal foi menor em relação às aves que não estavam se reproduzindo (Figura 1).

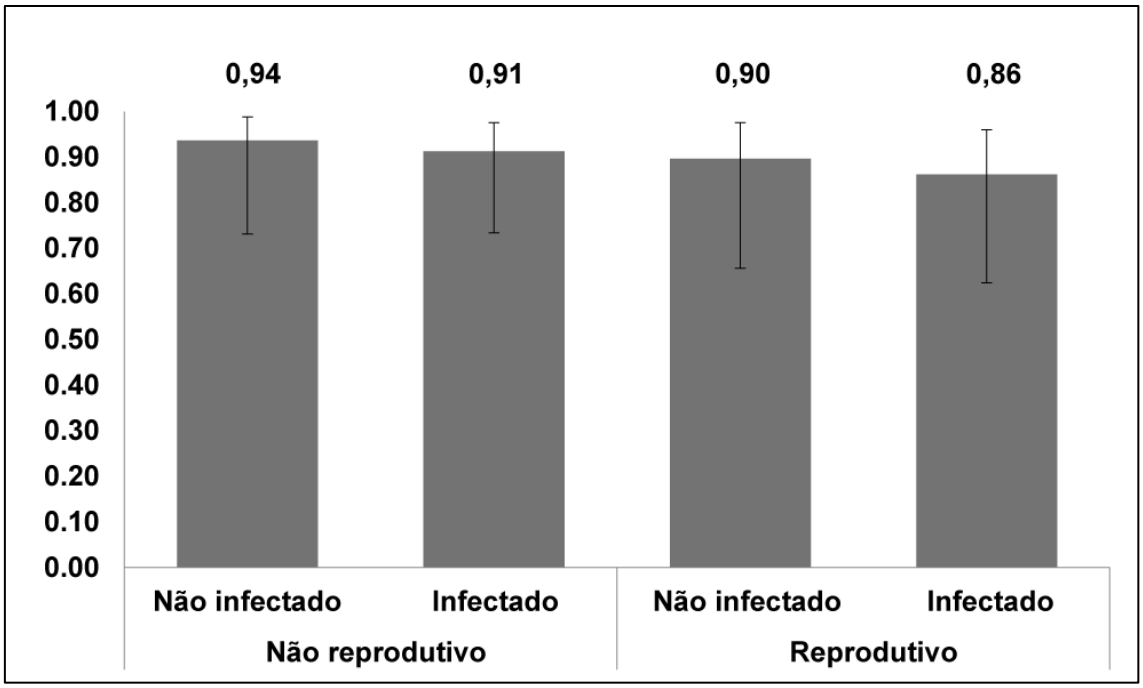

Figura 1. Probabilidades mensais de sobrevivência de indivíduos de pipira-preta de acordo com a estação reprodutiva e a infecção por *Haemoproteus* TARUF02, Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil.

Pipiras-pretas fora do período reprodutivo apresentaram maior probabilidade de serem infectadas por *H.* (*Parahaemoproteus*) TARUF02 ($\widehat{\Psi}_{NBr}^{NI} = 0{,}09$; 95% IC = 0,04-0,20), quando comparadas àquelas que estavam se reproduzindo ($\widehat{\Psi}_{Br}^{NI} = 0{,}02$; 95% IC = 0,00-0,49), porém não houve variação na probabilidade de infecção entre aves macho e fêmea (Tabela 1: Passo 3).

A probabilidade de se classificar corretamente uma ave infectada como infectada por *H.* (*Parahaemoproteus*) TARUF02 (ou seja, a probabilidade de não ocorrer falsos negativos, δ^I) foi de 63% (ou 0,63 com IC 95% = 0,53-0,72). A prevalência de *Haemoproteus* TARUF02 (ω) em nossa população foi ligeiramente maior durante a estação reprodutiva (0,36 com IC 95% = 0,13-0,66) quando comparada com a estação não-reprodutiva (0,32 com IC 95% = 0,13-0,58), mas o sexo do hospedeiro teve pouca influência na prevalência (Tabela 1: Passo 2).

Aves infectadas tiveram uma maior probabilidade de captura (0,18 com IC 95%= 0,11-0,28) do que aves não infectadas (0,04 com IC 95%= 0,02-0,10). No

entanto, a probabilidade de captura variou pouco entre a estação e o sexo (Tabela 1: Passo 1).

4. DISCUSSÃO

A infecção por *Haemoproteus* reduziu a sobrevivência das aves infectadas, o que pode indicar que mesmo uma infecção crônica pelo parasito tem o potencial de causar impactos substanciais à população hospedeira. Vale ressaltar que tal efeito negativo sobre a sobrevivência das aves foi detectado mesmo em um curto período, pois são probabilidades de sobrevivência mensais. Isso significa que a probabilidade de uma ave infectada em fevereiro sobreviver à estação reprodutiva de 4 meses é de apenas (0,86) ^ 4 = 55%, enquanto a probabilidade de uma ave não infectada sobreviver à estação reprodutiva é de (0,90) ^ 4 = 66%. Para aves fora da época de reprodução, a probabilidade de uma ave infectada em junho sobreviver à estação de 8 meses de não reprodução é de apenas (0,91) ^ 8 = 47%, enquanto a probabilidade de sobrevivência de uma ave não infectada fora da época de reprodução é (0,94) ^ 8 = 60%. Geralmente, os parasitos drenam importantes recursos do hospedeiro e, para combater a infecção, parte da energia do hospedeiro é dedicada a manter seu sistema imunológico equilibrado, reduzindo o desempenho fisiológico, por exemplo, com a redução da capacidade de transporte de oxigênio ou redução da taxa metabólica (Hayworth *et al.* 1987; Rigdon & Rostorfer 1946; Schall 1982).

Estudos prévios sugerem que os parasitos hemosporídeos reduzem a sobrevivência de outras espécies hospedeiras silvestres, como o Chapim-azul *Cyanistes caeruleus* (Puente et al. 2010; Lachish et al. 2011), a Andorinha-dos-beirais *Delichon urbica* (Marzal et al. 2008) e o Falcão americano *Falco sparverius* (Dawson & Bortolotti, 2000). No entanto, em populações silvestres, as infecções por hemosporídeos não são consideradas principais reguladores de populações de aves (Bennett et al. 1976), exceto para infecções em populações que nunca tiveram contato com hemosporídeos, como foi observado no Havaí (van Riper III et al. 1986; Atkinson et al. 2000). Este estudo demostra que as infecções por *Haemoproteus* podem ser um importante fator regulador de populações, mesmo em infecções crônicas. Também já foi demonstrado que as infecções crônicas por *Plasmodium relictum* causam consequências negativas

sobre uma população silvestre de aves onde a malária é endêmica (Knowles et al. 2010), reforçando as evidências de que os hemosporídeos têm papel importante na regulação das populações aviárias não apenas em infecções agudas, mas também em aves cronicamente infectadas. Se uma ave infectada sobrevive à fase aguda da infecção, ela ainda pode ser influenciada negativamente pelo parasito durante uma fase crônica (Hayworth et al. 1987).

Verificou-se ainda que a probabilidade de sobrevivência foi menor durante o período reprodutivo na população de pipira-preta, indicando que mudanças no comportamento e na fisiologia relacionados à reprodução podem influenciar a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos nessa população de aves. De fato, Macario *et al.* (2017) relataram que a probabilidade de sobrevivência durante a estação não-reprodutiva foi 1,5 vezes maior do que durante a época de reprodução para a mesma população de pipira-preta no CLBI. Outros estudos também mostraram menor probabilidade de sobrevivência durante a época de reprodução em outras espécies de aves (Sorci et al. 1996; Sankamethawee et al. 2011; Macario et al. 2017). Demonstrou-se que a infecção por *Haemoproteus* associada à estação reprodutiva reduziu a probabilidade de sobrevivência mensal em aproximadamente 10%. Em outras palavras, um indivíduo que está se reproduzindo e também está infectado por *Haemoproteus* pode ter uma probabilidade de sobrevivência ~ 10% menor do que uma ave não infectada fora da estação reprodutiva.

Não foram encontradas diferenças na probabilidade de sobrevivência entre machos e fêmeas na população estudada. A diferença na sobrevivência entre sexos foi mostrada para espécies com diferenças consideráveis no tamanho corporal entre machos e fêmeas, com o maior sexo mostrando menor sobrevida devido a maiores exigências nutricionais ou maior dificuldade em evitar predadores (Milonoff & Lindén, 1989; Martín *et al.*, 2007). No entanto, pipiras-pretas macho e fêmea têm tamanhos corporais semelhantes, o que pode ter contribuído para os resultados deste estudo. Além disso, diferenças específicas de sexo na mortalidade são frequentemente atribuídas a diferentes características de comportamento, ecologia e história de vida, as quais podem produzir diferentes taxas de exposição a predadores e outros agentes de mortalidade (Pettersson et al. 2004; Szekely et al. 2014). Sugere-se que na população de estudo, ambos os sexos devem ser igualmente expostos a fatores que ameaçam sua sobrevivência, como

predação ou infecção por parasitos. De fato, taxas similares de sobrevivência entre sexos foi relatada em outras espécies da família Thraupidae (por exemplo, Tico-tico-rei-cinza *Coryphospingus pileatus*, Tavares-Damasceno *et al.* 2017) e em outros passeriformes (ver Pearce-Higgins *et al.*, 2007; Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 2008; França and Marini, 2010; Blake and Loiselle, 2013).

Não foram observadas diferenças sexo-específicas na probabilidade de uma ave ser infectada pelo parasito alvo. O comportamento de viver em pares, como observado em pipiras-pretas (Sigrist 2014), pode induzir uma exposição semelhante de machos e fêmeas aos vetores, limitando a influência do sexo na probabilidade de uma ave se infectar.

A probabilidade de transição de um estado não infectado para um estado infectado foi 7% maior fora da época reprodutiva. A estação reprodutiva da pipira-preta no CLBI estende-se do final da estação seca até o início da estação chuvosa (fevereiro a maio) (Macario et al. 2017). Durante esse período do ano, pode haver uma menor disponibilidade de corpos hídricos adequados para o desenvolvimento de ceratopogonídeos, vetores *H.* (*Parahaemoproteus*), devido à baixa precipitação nos meses que antecederam a época de reprodução das aves (Figura 2). De fato, a abundância de ceratopogonídeos pode estar positivamente correlacionada com a precipitação do mês anterior (Garvin & Greiner, 2003). Portanto, uma menor disponibilidade de corpos d'água deve reduzir a abundância de vetores, levando a uma probabilidade reduzida das aves se infectarem durante a época de reprodução. Infelizmente, não temos dados sobre a diversidade de vetores de *Haemoproteus* no CLBI, o que limita nossa capacidade de sugerir outras possíveis explicações para nossos achados. Para um melhor entendimento da dinâmica de transmissão de TARUF02 em pipiras-pretas, é necessário a identificação dos ceratopogonídeos atuando como vetores deste parasito no CLBI. A falta de informação sobre vetores hemosporídeos de aves tem sido um grande desafio e um fator limitante no estudo da dinâmica da infecção aviária por malária em aves silvestres, e é uma questão que requer mais atenção.

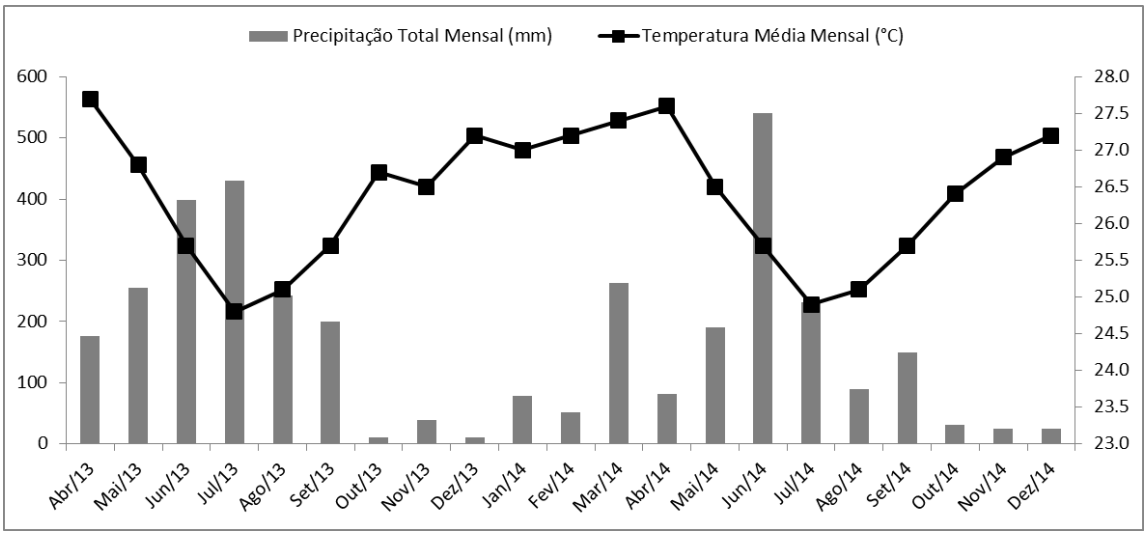

Figura 2. Climatograma representando as temperaturas médias mensais e a precipitação mensal total durante o período de estudo no Centro de Lançamento Barreira do Inferno, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil.

A prevalência de *Haemoproteus* TARUF02 na população de pipira-preta (32-36%) foi maior do que a prevalência observada em estudos de infecções por hemosporídeos em outras populações de aves silvestres (por exemplo, Schrader *et al.* 2003, Cosgrove *et al.* 2008, Ayadi *et al.* 2017, Fecchio *et al.* 2017). A linhagem TARUF02 domina as infecções por hemosporídeos em pipiras-pretas no CLBI, uma relação que merece atenção, já que TARUF02 provavelmente tem certa especificidade por esta espécie hospedeira e provavelmente uma vantagem em infectá-la ao competir com outras linhagens. Apesar desta linhagem de parasito ter sido detectada em aves filogeneticamente distantes da pipira preta (ver Capítulo 1), o número de ocorrências foi muito reduzido se comparado ao número de pipiras-pretas infectadas por esse parasito, demonstrando que, possivelmente, a ocorrência em outros hospedeiros seja acidental e que o parasito não tenha tanto sucesso na infecção de outras espécies de aves. Como previsto, a prevalência do parasito alvo foi ~ 4% maior durante a época de reprodução, quando comparada com a estação não reprodutiva. Tanto a reprodução quanto a defesa contra o parasito podem ser onerosas para a ave, e durante a época de reprodução o indivíduo pode enfrentar uma demanda conflitiva entre investir na prole ou na defesa imunológica (Richner et al. 1995). Essa associação entre os níveis de investimento parental e a prevalência de hemosporídeos foi demonstrada em várias espécies de aves e demonstra que o esforço reprodutivo aumenta a suscetibilidade à infecção por

hemosporídeos (Gustafsson et al. 1994; Norris et al. 1994; Richner et al. 1995; Ardia 2005). Na população de aves aqui estudada, como a probabilidade de se infectar é menor durante a estação reprodutiva, a prevalência mais elevada nesse período do ano não deve ser decorrente de um maior número de aves sendo infectadas, e sim de um aumento na detecção da infecção em aves que já estavam infectadas. A detecção molecular dos parasitos pode ser limitada pela intensidade da infecção, ou parasitemia. Em aves que sobrevivem à fase aguda da infecção verifica-se uma redução da parasitemia em decorrência da ação do sistema imunológico, que caracteriza a fase crônica da infecção (Valkiunas 2005; Cornet and Sorci 2014). A baixa parasitemia na infecção crônica pode dificultar a detecção do parasito pelas análises moleculares. Porém, se um indivíduo em estágio crônico da infecção passa por algum evento de estresse que leve a uma imunossupressão, o que inclui o esforço reprodutivo, pode ocorrer uma recaída da infecção, caracterizada pelo aumento na parasitemia e, consequentemente, favorecimento da detecção molecular do parasito. Desta forma, aves com infecção crônica, porém latente, no início do ciclo reprodutivo devem sofrer uma redução na resposta imune em decorrência do esforço parental, o que pode levar a uma recaída de infecções por *Haemoproteus* e, consequentemente, um aumento no sucesso de detecção molecular dos parasitos.

Observamos que as aves infectadas pela linhagem TARUF02 apresentaram uma probabilidade de captura 14% maior do que as aves não infectadas, sugerindo diferenças no comportamento entre as aves nesses diferentes estados de infecção. Outros estudos também relataram maiores probabilidades de captura para indivíduos infectados, o que, se não fosse contabilizado, influenciaria as estimativas de prevalência (Sorci *et al.*, 1996; Senar & Conroy, 2004; Jennelle *et al.*, 2007; Podmokła *et al.*, 2017). Inúmeras hipóteses podem ser testadas para se determinar a causa dessa captura diferencial em aves infectadas por TARUF02, e uma explicação definitiva provavelmente só será definida com base em estudos experimentais. Uma possibilidade é a de que a infecção afete a capacidade de voo, levando as aves infectadas a voar mais baixo e aumentando suas chances de serem capturadas pelas redes de neblina. De fato, parasitos podem ter efeitos diversos sobre o comportamento e sobrevivência dos seus hospedeiros, sendo capazes de, além dos efeitos fisiológicos, afetar ainda sua capacidade de voo, comportamento ou personalidade, por exemplo (Schall 1982; Lafferty and Morris 1996; Holliman 1997; Eberhard 2000; Møller 2008; Poulin 2013; Kekäläinen et al. 2014).

Essas mudanças comportamentais podem acarretar alguns custos de adaptação para os indivíduos infectados. Se as redes de neblina fossem um predador, por exemplo, as aves infectadas seriam mais suscetíveis à predação, o que é consistente com a nossas evidências de que a infecção reduz a sobrevivência das aves. O efeito da infecção por hemosporídeos na predação de aves já foi demonstrado por Møller e Nielsen (2007) em um estudo feito com duas espécies de aves raptoras e suas presas, que mostrou que espécies de aves com maior prevalência de hemosporídeo apresentaram maior probabilidade de serem predadas. Da mesma forma, Navarro *et al.* (2004) demonstraram uma associação entre o aumento no risco de predação e o aumento na prevalência e intensidade da infecção por *Haemoproteus* em um estudo experimental feito com pardais *Passer domesticus*.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo com a população de pipiras-pretas demonstrou-se que a infecção crônica por *Haemoproteus* pode acarretar efeitos substanciais na sobrevida e captura do hospedeiro. Indivíduos de pipira-preta infectados por TARUF02 têm menor probabilidade de sobrevivência e podem ser mais suscetíveis à predação. Este estudo permitiu observar uma interação parasito-hospedeiro muito específica em um ambiente natural, ainda pouco explorada na literatura. Além disso, a abordagem de modelagem usada nas análises deste estudo poderia ser adotada por estudos envolvendo outras interações parasito-hospedeiro. Os resultados observados aqui representam uma importante contribuição ao atual conhecimento teórico da interação parasito-hospedeiro, podendo ser base para discussões de estratégias de manejo e conservação de espécies da vida silvestre infectadas por diferentes parasitos. Estudos focados em interações parasito-hospedeiro usando uma comunidade inteira de organismos podem falhar em revelar diferenças espécie-específicas dos efeitos do parasito no hospedeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardia DR (2005) Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune function in tree swallows. J Anim Ecol 74:517–524. doi: 10.1111/j.1365-2656.2005.00950.x

Asghar M, Hasselquist D, Hansson B, et al (2015) Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. Science (80) 347:436–438. doi: 10.1126/science.1261121

Atkinson CT, Dusek RJ, Lease JK (2001) Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. J Wildl Dis 37:20–27. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.20

Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, Iko WM (2000) Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. J Wildl Dis 36:197–204. doi: 10.7589/0090-3558-36.2.197

Atkinson CT, Van Riper III C (1991) Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M (eds) Bird-parasite interactions: Ecology, evolution, and behaviour. Oxford University Press, New York, pp 19–48

Ayadi T, Selmi S, Hammouda A, et al (2017) Diversity, prevalence and host specificity of avian parasites in southern Tunisian oases. Parasitology 1–8. doi: 10.1017/S0031182017002141

Bennett GF, Bishop MA, Peirce MA (1993) Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. Syst Parasitol 26:171–179. doi: 10.1007/BF00009724

Bennett GF, Caines JR, Bishop MA (1988) Influence of blood parasites on the body mass of passeriform birds. J Wildl Dis 24:339–343. doi: 10.7589/0090-3558-24.2.339

Bennett GF, Greiner EC, Threlfall W (1976) Protozoans. In: Page LA (ed) Wildlife Diseases. Plenum Press, New York, New York, pp 25–33

Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, et al (2000) Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. Proc R Soc B 267:1583–1589. doi: 10.1098/rspb.2000.1181

Bensch S, Waldenström J, Jonzén N, et al (2007) Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. J Anim Ecol 76:112–122. doi: 10.1111/j.1365-2656.2006.01176.x

Bishop BYANN, Tate P, Thorpe MV (1938) The duration of *Plasmodium relictum* infection in canaries. Parasitology 30:388–391.

Blake JG, Loiselle BA (2013) Apparent survival rates of forest birds in eastern Ecuador revisited: Improvement in precision but no change in estimates. PLoS One 8:1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0081028

Borrás A, Senar J (1986) Sex, age and condition bias of decoy-trapped Citril Finches (*Serinus citrinella*). Miscelània Zoològica 10:403–406.

Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretical approach, Second. Springer, New York

Calero-Riestra M, García JT (2016) Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. Malar J 15:1–11. doi: 10.1186/s12936-016-1220-y

Carlson ML, Proudfoot GA, Gentile K, et al (2018) Haemosporidian prevalence in northern saw-whet owls *Aegolius acadicus* is predicted by host age and average annual temperature at breeding grounds. J Avian Biol 49:1–11. doi: 10.1111/jav.01817

Cornet S, Sorci G (2014) Avian malaria models of disease. Encycl Malar 1–11. doi: 10.1007/978-1-4614-8757-9

Cosgrove CL, Wood MJ, Day KP, Sheldon BC (2008) Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. J Anim Ecol 77:540–548. doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01370.x

Dawson RD, Bortolotti GR (2000) Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American Kestrels. Auk 117:373–380. doi: 10.1642/0004-8038(2000)117[0373:EOHPOC]2.0.CO;2

del Hoyo J, Elliott A, Christie DA (2011) Handbook of the birds of the world alive. Lynx Edicions, Barcelona

Domènech J, Senar JC (1998) Trap type can bias estimates of sex ratio. J F Ornithol 69:380–385.

Drobney RD, Train CT, Fredrickson LH (1983) Dynamics of the platyhelminth fauna of wood ducks in relation to food habits and reproductive state. J Parasitol 69:375–380.

Dufva R (1996) Blood parasites, health, reproductive success, and egg volume in female Great Tits *Parus major*. J Avian Biol 27:83. doi: 10.2307/3676964

Eberhard WG (2000) Spider manipulation by a wasp larva. Nature 406:255–256. doi: 10.1038/35018636

Fallon ASM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E (2003) Detecting avian malaria: an improved Polymerase Chain Reaction diagnostic. J Parasitol 89:1044–1047. doi: 10.1645/GE-3157

Fallon SM, Fleischer RC, Graves GR (2006) Malarial parasites as geographical markers in migratory birds? Biol Lett 2:213–216. doi: 10.1098/rsbl.2005.0429

Fallon SM, Ricklefs RE (2008) Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. J Avian Biol 39:514–522. doi: 10.1111/j.2008.0908-8857.04308.x

Fecchio A, Svensson-Coelho M, Bell J, et al (2017) Host associations and turnover of haemosporidian parasites in manakins (Aves: Pipridae). Parasitology 144:984–993. doi: 10.1017/S0031182017000208

França LF, Marini MT (2010) Negative population trend for Chapada Flycatchers (*Suiriri islerorum*) despite high apparent annual survival. J F Ornithol 81:227–236. doi: 10.1111/j.1557-9263.2010.00279.x

Garvin MC, Greiner EC (2003) Ecology of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in southcentral Florida and experimental Culicoides vectors of the avian hematozoan *Haemoproteus* danilewskyi Kruse. J Wildl Dis 39:170–178. doi: 10.7589/0090-3558-39.1.170

Garvin MC, Szell CC, Moore FR (2006) Blood parasites of Nearctic–Neotropical migrant passerine birds during spring trans-Gulf migration: Impact on host body condition. J Parasitol 92:990–996. doi: 10.1645/GE-758R.1

Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, et al (1994) Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. Philos Trans R Soc B Biol Sci 346:323–331. doi: 10.1098/rstb.1994.0149

Hayworth AM, Van Riper, III C, Weathers WW (1987) Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in Canaries (*Serinus canarius*). J Parasitol 73:850–853. doi: 10.2307/3282431

Hegner RE, Wingfield JC (1987) Effects of experimental manipulation of testosterone levels on parental investment and breeding success in male House Sparrows. Auk 104:462–469. doi: 10.2307/4087545

Holliman RE (1997) Toxoplasmosis, behaviour and personality. J Infect 35:105–110. doi: 10.1016/S0163-4453(97)91380-3

Hudson PJ, Dobson AP, Newborn D (1992) Do parasites make prey vulnerable to predation? Red Grouse and parasites. J Anim Ecol 61:681–692. doi: 10.2307/5623

Jennelle CS, Cooch EG, Conroy MJ, Senar JC (2007) State-specific detection probabilities and disease prevalence. Ecol Appl 17:154–167.

Kekäläinen J, Lai Y Te, Vainikka A, et al (2014) Do brain parasites alter host personality? — Experimental study in minnows. Behav Ecol Sociobiol 68:197–204. doi: 10.1007/s00265-013-1634-2

Knowles SCL, Palinauskas V, Sheldon BC (2010) Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: Experimental evidence from a wild bird population. J Evol Biol 23:557–569. doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01920.x

Kulma K, Low M, Bensch S, Qvarnström A (2013) Malaria infections reinforce competitive asymmetry between two *Ficedula* flycatchers in a recent contact zone. Mol Ecol 22:4591–4601. doi: 10.1111/mec.12409

Lachish S, Knowles SCL, Alves R, et al (2011) Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population : the importance of ecological structure. J Anim Ecol 80:1196–1206. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01836.x

Lafferty KD, Morris AK (1996) Altered behaviour of parasitized killifish increases susceptibility to predation by birds final hosts. Ecology 77:1390–1397. doi: 10.2307/2265536

Lebreton J-D, Burnham KP, Clobert J, David RA (1992) Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. Ecol Monogr 62:67–118. doi: 10.2307/2937171

Macario P, Pichorim M, Doherty PF, et al (2017) Apparent survival and cost of reproduction for White-lined Tanager (*Tachyphonus rufus*, Thraupidae) in the northern Atlantic Rainforest, Brazil. PLoS One 12:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0185890

Martín CA, Alonso JC, Alonso JA, et al (2007) Sex-biased juvenile survival in a bird with extreme size dimorphism, the great bustard *Otis tarda*. J Avian Biol 38:335–346. doi: 10.1111/j.2007.0908-8857.03811.x

Marzal A, Bensch S, Reviriego M, et al (2008) Effects of malaria double infection in birds: One plus one is not two. J Evol Biol 21:979–987. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01545.x

Marzal A, De Lope F, Navarro C, Møller AP (2005) Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. Oecologia 142:541–545. doi: 10.1007/s00442-004-1757-2

Merino S, Moreno J, Jose Sanz J, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in Blue Tits (*Parus caeruleus*). Proc R Soc B Biol Sci 267:2507–2510. doi: 10.1098/rspb.2000.1312

Milonoff M, Lindén H (1989) Sexual size dimorphism of body components in Capercaillie chicks. Ornis Scand 20:29–35.

Møller AP (2008) Flight distance and blood parasites in birds. Behav Ecol 19:1305–1313. doi: 10.1093/beheco/arn074

Møller AP, Nielsen JT (2007) Malaria and risk of predation: A comparative study of birds. Ecology 88:871–881. doi: 10.1890/06-0747

Navarro C, De Lope F, Marzal A, Møller AP (2004) Predation risk, host immune response, and parasitism. Behav Ecol 15:629–635. doi: 10.1093/beheco/arh054

Nichols JD, Hines JE, Pollock KH, et al (1994) Estimating breeding proportions and testing hypotheses about costs of reproduction with capture-recapture data. Ecology 75:2052–2065.

Nichols JD, Kendall WL (1995) The use of multi-state capture-recapture models to address questions in evolutionary ecology. J Appl Stat 22:835–846.

Norris K, Anwar M, Read AF (1994) Reproductive effort influences the prevalence of Haematozoan parasites in Great Tits. J Anim Ecol 63:601–610.

Pearce-Higgins JW, Brace RC, Hornbuckle J (2007) Survival of Band-tailed Manakins. Condor 109:167–172.

Pettersson LB, Ramnarine IW, Becher SA, et al (2004) Sex ratio dynamics and fluctuating selection pressures in natural populations of the Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata*. Behav Ecol Sociobiol 55:461–468. doi: 10.1007/s00265-003-0727-8

Podmokła E, Dubiec A, Drobniak SM, et al (2017) Effect of haemosporidian infections on host survival and recapture rate in the Blue Tit. J Avian Biol 48:796–803. doi: 10.1111/jav.01108

Podmokła E, Dubiec A, Drobniak SM, et al (2014) Avian malaria is associated with increased reproductive investment in the Blue Tit. J Avian Biol 45:219–224. doi: 10.1111/j.1600-048X.2013.00284.x

Poulin R (2013) Parasite manipulation of host personality and behavioural syndromes. J Exp Biol 216:18–26. doi: 10.1242/jeb.073353

Poulin R (1996) Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? Am Nat 147:287–295.

Pradel R, Hines JE, Lebreton J-DD, Nichols JD (1997) Capture-recapture survival models taking account of transients. Biometrics 53:60–72. doi: 10.2307/2533097

Price PW (1980) Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press

Puente JM del la, Merino S, Tomás G, et al (2010) The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. Biol Lett 6:663–665. doi: 10.1098/rsbl.2010.0046

Richner H, Christe P, Oppliger A (1995) Paternal investment affects prevalence of malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 92:1192–4. doi: 10.1073/pnas.92.4.1192

Ricklefs RE, Swanson BL, Fallon SM, et al (2005) Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. Ecol Monogr 75:543–559. doi: 10.1890/04-1820

Rigdon RH, Rostorfer HH (1946) Effect of oxygen on *P. lophurae* infected ducks. Procedings Soc Exp Biol Med 63:165–167.

Ruiz-Gutiérrez V, Gavin TA, Dhondt AA (2008) Habitat fragmentation lowers survival of a tropical forest bird. Ecol Appl 18:838–846.

Sankamethawee W, Pierce AJ, Hardesty BD, Gale GA (2011) Seasonal variability in survivorship of a cooperatively breeding tropical passerine. Ecol Res 26:429–436. doi: 10.1007/s11284-011-0802-y

Santiago-Alarcon D, Mettler R, Segelbacher G, Schaefer HM (2013) Haemosporidian parasitism in the blackcap *Sylvia atricapilla* in relation to spring arrival and body condition. J Avian Biol 44:521–530. doi: 10.1111/j.1600-048X.2013.00181.x

Sanz JJ, Arriero E, Moreno J, Merino S (2001) Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. Oecologia 126:339–344. doi: 10.1007/s004420000530

Schall J (1982) Lizards infected with malaria: physiological and behavioral consequences. Science (80-) 217:1057–1059. doi: 10.1126/science.7112113

Schrader MS, Walters EL, James FC, Greiner EC (2003) Seasonal prevalence of a haematozoan parasite of Red-Bellied Woodpeckers (*Melanerpes carolinus*) and its association with host condition and overwinter survival. Auk 120:130–137. doi: 10.1642/0004-8038(2003)120[0130:SPOAHP]2.0.CO;2

Senar JC, Conroy MJ (2004) Multi-state analysis of the impacts of avian pox on a population of Serins (*Serinus serinus*): The importance of estimating recapture rates. Anim Biodivers Conserv 27:133–146.

Shurulinkov P, Chakarov N, Daskalova G (2012) Blood parasites, body condition, and wing length in two subspecies of Yellow Wagtail (*Motacilla flava*) during migration. Parasitol Res 110:2043–2051. doi: 10.1007/s00436-011-2733-5

Sick H (1997) Ornitologia Brasileira, 2° Edição. Rio de Janeiro

Sigrist T (2014) Guia de campo Avis Brasilis - Avifauna brasileira, 4° Edição. Avis Brasilis, São Paulo

Sorci G, Sorci G, Clobert J, et al (1996) Cost of reproduction and cost of parasitism in the common lizard, *Lacerta vivipara*. Oikos 76:121–130. doi: 10.2307/3545754

Svensson-Coelho M, Blake JGJG, Loiselle B a, et al (2013) Diversity, prevalence, and host specificity of avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a western Amazon assemblage.

Szekely T, Liker A, Freckleton RP, et al (2014) Sex-biased survival predicts adult sex ratio variation in wild birds. Proc R Soc B Biol Sci 281:20140342–20140342. doi: 10.1098/rspb.2014.0342

Tavares-Damasceno JP, Silveira JLG de S, Câmara T, et al (2017) Effect of drought on demography of Pileated Finch (*Coryphospingus pileatus*: Thraupidae) in northeastern Brazil. J Arid Environ 147:1–8. doi: 10.1016/j.jaridenv.2017.09.006

Tella JL, Forero MG, Gajón A, et al (1996) Absence of blood-parasitization effects on Lesser Kestrel fitness. Auk 113:253–256.

Tinsley RC (1989) The effects of host sex on transmission sucess. Parasitol Today 5:190–195.

Valkiunas G (2005) Avian malaria parasites and other Haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida

van Riper III C, van Riper SG, Goff ML, Laird M (1986) The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecol Monogr 56:327–344.

White GC, Burnham KP (1999) Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. Bird Study 46 (Supple:S120-139. doi: 10.1080/00063659909477239

Zuk M (1990) Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. Parasitol Today 6:231–233. doi: 10.1016/0169-4758(90)90202-F

Zuk M, McKean KA (1996) Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. Int J Parasitol 26:1009–1024. doi: 10.1016/S0020-7519(96)00086-0

Zylberberg M, Derryberry EP, Breuner CW, et al (2015) *Haemoproteus* infected birds have increased lifetime reproductive success. Parasitology 142:1033–1043. doi: 10.1017/S0031182015000256

4. CONCLUSÕES GERAIS

1. O presente estudo ampliou o número de linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus* já conhecidos e demonstrou que a Restinga abriga uma comunidade diversificada de hemosporídeos.
2. As análises dos fatores que influenciam na prevalência de hemosporídeos indicaram que a temperatura é um importante fator influenciador da probabilidade de infecção por *Plasmodium* em aves do CLBI.
3. As aves migratórias apresentaram menor probabilidade de se infectarem por *Haemoproteus* no CLBI, porém, aves residentes e migratórias são igualmente prováveis de se infectarem por *Plasmodium*.
4. Resultados divergentes entre estudos que testam a influência de fatores individuais e espécie-específicos dos hospedeiros na prevalência de hemosporídeos podem indicar que esta é resultado de uma soma de fatores que variam em diferentes biomas e fitofisionomias em todo o globo. Porém, deve-se também considerar a possibilidade de que algumas relações observadas em outros estudos representem efeitos espúrios detectados por análises estatísticas inadequadas.
5. A infecção crônica por *Haemoproteus* pode causar efeitos substanciais à sobrevivência de pipiras-pretas e este efeito é intensificado em aves que estejam se reproduzindo.
6. A probabilidade de infecção por *Haemoproteus* é maior em aves fora do período reprodutivo, porém a prevalência deste parasito é mais elevada em aves que estão se reproduzindo.
7. A infecção por *Haemoproteus* aumenta a probabilidade de captura de pipiras-pretas, o que pode indicar maior suscetibilidade de aves infectadas à predação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asghar M, Hasselquist D, Hansson B, et al (2015) Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. Science (80) 347:436–438. doi: 10.1126/science.1261121

Atkinson CT, Dusek RJ, Woods KL, Iko WM (2000) Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. J Wildl Dis 36:197–204. doi: 10.7589/0090-3558-36.2.197

Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB (2008) Parasitic diseases of wild birds. Wiley-Blackwell

Atkinson CT, Van Riper III C (1991) Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye JE, Zuk M (eds) Bird-Parasite Interactions: Ecology, evolution, and behaviour. Oxford University Press, New York, pp 19–48

Atkinson CT, Woods KL, Dusek RJ, et al (1995) Wildlife disease and conservation in Hawaii : Pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). Parasitology 111:S59–S69.

Baker JR (1967) A review of the role played by the Hippoboscidae as vectors of endoparasites. J Parasitol 53:412–418.

Balls MJ, Bødker R, Thomas CJ, et al (2004) Effect of topography on the risk of malaria infection in the Usambara Mountains , Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg 98:400–408. doi: 10.1016/j.trstmh.2003.11.005

Beaudoin RL, Applegate JE, Davis DE, McLean RG (1971) A Model For The Ecology of Avian Malaria. J Wildl Dis 7:5–13.

Beier JC (1998) Malaria Parasite Development in Mosquitoes. Annu Rev Entomol 43:519–543. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.519

Bishop B, Tate P, Thorpe MV (1938) The duration of *Plasmodium relictum* infection in canaries. Parasitology 30:388–391.

Braga ÉM, Silveira P, Belo NO, Valkinas G (2011) Recent advances in the study of avian malaria: An overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp. in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 106:3–11. doi: 10.1590/S0074-02762011000900002

Brown WP, Sullivan PJ (2005) Avian community composition in isolated forest fragments: a conceptual revision. Oikos 111:1–8. doi: 10.1111/j.0030-1299.2005.13725.x

Calero-Riestra M, García JT (2016) Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. Malar J 15:1–11. doi: 10.1186/s12936-016-1220-y

Cannell BL, Krasnec K V., Campbell K, et al (2013) The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild little penguins (*Eudyptula minor*). Vet Parasitol 197:74–84. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.04.025

Chasar A, Loiseau C, Valkiūnas G, et al (2009) Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. Mol Ecol 18:4121–4133. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04346.x

Consoli RAGB, Oliveira RL (1994) Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: Fiocruz

Cornet S, Sorci G (2014) Avian malaria models of disease. Encycl Malar 1–11. doi: 10.1007/978-1-4614-8757-9

Cosgrove CL, Wood MJ, Day KP, Sheldon BC (2008) Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. J Anim Ecol 77:540–548. doi: 10.1111/j.1365-2656.2008.01370.x

Cranfield MR, Graczyk TK, Beall FB, et al (1994) Subclinical avian malaria infections in African Black-Footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. J Wildl Dis 30:372–376.

Dinhopl N, Nedorost N, Mostegl MM, et al (2015) In situ hybridization and sequence analysis reveal an association of *Plasmodium* spp. with mortalities in wild passerine birds in Austria. Parasitol Res 114:1455–1462. doi: 10.1007/s00436-015-4328-z

Ferreira Junior FC, Rodrigues RA, Ellis VA, et al (2017) Habitat modification and seasonality influence avian haemosporidian parasite distributions in southeastern Brazil. PLoS One 12:1–18.

Foley DH, Torres EP, Mueller I, et al (2003) Host-dependent *Anopheles flavirostris* larval distribution reinforces the risk of malaria near water. Trans R Soc Trop Med Hyg 97:283–287.

Hamilton KM, Shaw PW, Morritt D (2009) Prevalence and seasonality of *Hematodinium* (Alveolata : Syndinea) in a Scottish crustacean community. ICES J Mar Sci 66:1837–1845.

Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds : A role for parasites? Science (80) 218:384–387.

Hatcher MJ, Dick JTA, Dunn AM (2006) How parasites affect interactions between competitors and predators. Ecol Lett 9:1253–1271. doi: 10.1111/j.1461-0248.2006.00964.x

Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, et al (2002) The ecology of wildlife diseases. Oxford University Press

Knowles SCL, Palinauskas V, Sheldon BC (2010) Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: Experimental evidence from a wild bird population. J Evol Biol 23:557–569. doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01920.x

Kofron CP, Chapman A (1995) Deforestation and bird species composition in Liberia, West Africa. Trop Zool 8:239–256. doi: 10.1080/03946975.1995.10539284

Lachish S, Knowles SCL, Alves R, et al (2011) Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population : the importance of ecological structure. J Anim Ecol 80:1196–1206. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01836.x

Lapointe DA, Atkinson CT, Samuel MD (2012) Ecology and conservation biology of avian malaria. Ann N Y Acad Sci 1249:211–226. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06431.x

Lehane M (2005) The biology of blood-sucking in insects, 2nd edn. Cambridge

Levin II, Parker PG (2012) Prevalence of *Hemoproteus iwa* in Galapagos Great Frigatebirds (*Fregata minor*) and their obligate fly ectoparasite (*Olfersia spinifera*). J Parasitol 98:924–929. doi: 10.1645/GE-3027.1

Levin II, Valkiun G, Iezhova TA, et al (2012) Novel *Haemoproteus* species (Haemosporida : Haemoproteidae) from the Swallow-Tailed Gull (Lariidae), with remarks on the host range of hippoboscid-transmitted avian hemoproteids. J Parasitol 98:847–854. doi: 10.1645/GE-3007.1

Marzal A, De Lope F, Navarro C, Møller AP (2005) Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. Oecologia 142:541–545. doi: 10.1007/s00442-004-1757-2

Mccurdy DG, Shutler D, Mullie A, Forbes MR (1998) Sex-biased parasitism of avian hosts : relations to blood parasite taxon and mating system. Oikos 82:303–312.

Mellor PS, Boorman J, Baylis M (2000) Culicoides Biting midges: their role as arbovirus vectors. Annu Rev Entomol 45:307–340.

Merino S, Moreno J, Jose Sanz J, Arriero E (2000) Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in Blue Tits (*Parus caeruleus*). Proc R Soc B Biol Sci 267:2507–2510. doi: 10.1098/rspb.2000.1312

Møller AP (2010) Host-parasite interactions and vectors in the barn swallow in relation to climate change. Glob Chang Biol 16:1158–1170. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.02035.x

Mouritsen KN, Jensen KT (1997) Parasite transmission between soft-bottom invertebrates: temperature mediated infection rates and mortality in *Corophium volutator*. Mar Ecol Prog Ser 151:123–134. doi: 10.3354/meps151123

Ortego J, Cordero PJ, Aparicio JM, Calabuig G (2008) Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). J Ornithol 149:337–343. doi: 10.1007/s10336-008-0287-9

Padilla LR, Whiteman NK, Merkel J, et al (2006) Health Assesment of seabirds on Isla Genovesa, Galapagos Islands. Ornithol Monogr 86–97.

Patz J a., Graczyk TK, Geller N, Vittor AY (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int J Parasitol 30:1395–1405. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00141-7

Poulin R (2007) Evolutionary ecology of parasites, 2nd edn. Princeton University Press, Princeton, New Jersey

Poulin R (1996) Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? Am Nat 147:287–295.

Poulin R, Morand S (2000) The diversity of parasites. Q Rev Biol 75:277–293. doi: 10.1086/393500

Puente JM del la, Merino S, Tomás G, et al (2010) The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. Biol Lett 6:663–665. doi: 10.1098/rsbl.2010.0046

Rueda LM (2008) Global diversity of mosquitoes (Insecta : Diptera : Culicidae) in freshwater. Hydrobiologia 595:477–487. doi: 10.1007/s10750-007-9037-x

Scheuerlein A, Ricklefs RE (2004) Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. Proc R Soc B Biol Sci 271:1363–1370. doi: 10.1098/rspb.2004.2726

Sol D, Jovani R, Torres J (2000) Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. Ecography (Cop) 23:307–314. doi: 10.1034/j.1600-0587.2000.d01-1639.x

Spencer KA, Buchanan KL, Leitner S, et al (2005) Parasites affect song complexity and neural development in a songbird. Proc R Soc B Biol Sci 272:2037–2043. doi: 10.1098/rspb.2005.3188

Sutcliffe JF (1986) Black fly host location: a review. Can J Zool 64:1041–1053. doi: 10.1139/z86-156

Valkiunas G (2005) Avian malaria parasites and other Haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida

Valkiūnas G, Žičkus T, Shapoval AP, Iezhova TA (2006) Effect of *Haemoproteus belopolskyi* (Haemosporida: Haemoproteidae) on body mass of the Blackcap *Sylvia atricapilla*. J Parasitol 92:1123–1125. doi: 10.1645/ge-3564-rn.1

van Riper III C, van Riper SG, Goff ML, Laird M (1986) The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. Ecol Monogr 56:327–344.

Vanstreels RET, Kolesnikovas CKM, Sandri S, et al (2014) Outbreak of avian malaria associated to multiple species of *Plasmodium* in magellanic penguins undergoing rehabilitation in southern Brazil. PLoS One 9:19–21. doi: 10.1371/journal.pone.0094994

Vanstreels RET, Miranda FR, Ruoppolo V, et al (2013) Investigation of blood parasites of pygoscelid penguins at the King George and Elephant Islands, South Shetlands Archipelago, Antarctica. Polar Biol. doi: 10.1007/s00300-013-1401-x

Warner RE (1968) The Role of Introduced Diseases in the Extinction of the Endemic Hawaiian Avifauna. Condor 70:101–120.

WHO | World Health Organization (2016) Mosquito-borne diseases. In: WHO. http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/. Accessed 7 Aug 2017

Wood MJ, Cosgrove CL, Wilkin TA, et al (2007) Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. Mol Ecol 16:3263–3273. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03362.x

Woodworth BL, Atkinson CT, LaPointe DA, et al (2005) Host population persistence in the face of introduced vector-borne diseases: Hawaii amakihi and avian malaria. Proc Natl Acad Sci 102:1531–1536. doi: 10.1073/pnas.0409454102

Work TM, Rameyer RA (1996) *Haemoproteus iwa* n. sp. in Great Frigatebirds (Fregata minor [Gmelin]) from Hawaii : Parasite morphology and prevalence. J Parasitol 82:489–491.

Yorinks N, Atkinson CT (2000) Effects of malaria on activity budgets of experimentally infected juvenile apapane (*Himatione sanguinea*). Auk 117:731–738.

6. MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA SCIENTIFIC REPORTS

Probabilities of survival and capture of White-lined Tanagers (*Tachyphonus rufus*) are influenced by an avian blood parasite

Raquel A. Rodrigues[1], Rodrigo L. Massara[2], Larissa L. Bailey[3], Mauro Pichorim[4], Patrícia A. Moreira[5], Érika M. Braga[1,*]

[1]*Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

[2]*Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; Instituto SerraDiCal de Pesquisa e Conservação, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

[3]*Department of Fish, Wildlife and Conservation Biology and Graduate Degree Program in Ecology, Colorado State Univ., Fort Collins, CO, USA.*

[4]*Departamento de Botânica e Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.*

[5]*Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil.*

*Correspondence: Érika M. Braga (https://orcid.org/0000-0001-5550-7157), Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. E-mail: embraga@icb.ufmg.br

Parasites may have important influences in survival and behavior of host populations. However, different parasites may impose distinct effects on host fitness and, therefore, understanding host–parasite interactions requires species-specific studies. We used a multi-state mark-recapture model that accounts for transient individuals and infection state uncertainty to assess whether survival and captured probabilities of a common host (White-lined Tanager) are influenced by *Haemoproteus* infection, host sex, or season. Likewise, we explored whether sex and breeding season influenced the probability a bird becomes infected by *Haemoproteus* and if these variables may also influence the prevalence of the parasite in the bird population. Survival probability was negatively influenced by the parasite infection and was lower during the breeding season. Birds had higher probability of becoming infected by *Haemoproteus* during the non-breeding season and estimated prevalence of *Haemoproteus* in the population was ~ 5% higher during the breeding season when compared to the non-breeding season. Infected birds had a higher capture probability than uninfected birds, which may suggest that infected birds suffer negative consequences that could make them more susceptible to predation. Overall, our findings indicate that chronic *Haemoproteus* infection can result in substantial effects on survival and behavior of this bird population.

Introduction

Parasites may have a strong influence on survival, reproduction, and dispersal of their hosts. Many studies have shown that parasitism induces changes in host behavior[1,2] or affects host ability to avoid predation[3,4]. Parasites may reduce the reproductive success or lifespan of their hosts[5–7]. One of the most common parasites of wild birds are haemosporidians, a vector-borne protozoans that infect a number of host species worldwide. The two main genera of avian haemosporidians are *Plasmodium*, transmitted by mosquitoes (Culicidae), and *Haemoproteus*, transmitted primarily by *Culicoides* biting midges (Ceratopogonidae for the subgenus *Parahaemoproteus*) and louse flies (Hippoboscidae for the subgenus *Haemoproteus*)[8]. The study of haemosporidian parasites in vertebrate host populations has contributed greatly to the knowledge of several aspects of host-parasite ecology and evolution[9]. Nevertheless, the impacts of blood parasites on host fitness and dynamics remain poorly understood, especially in wild populations, where contradictory results have been described. For example, some researchers suggested that haemosporidian infection is associated with reductions in host body mass[10–12], but other studies have failed to identify such influence[13,14]. Additionally, some findings indicated a reduction in survival of birds infected by haemosporidians[12,15–17], but other researchers observed no correlation between haemosporidian infection and host survival[11,18,19]. Unexpectedly, a long-term study reported higher survival in infected birds compared to uninfected birds[20]. The same contradicting results exist when examining the effect of haemosporidians on avian reproductive success. While some findings indicated a negative influence of haemosporidian infection on the proportion of eggs fledged[21] and brood size at fledging[6], other researchers observed a higher reproductive success in birds infected by haemosporidians[17,22,23].

Different haemosporidian species may impose distinct effects on host fitness[24], thus species-specific studies may reveal relationships that are masked when a host is infected by multiple haemosporidian species. More accurate evaluation of host–parasite interactions are achieved from detailed studies of specific parasites rather than treating parasites collectively[25]. Moreover, studies focused on a single host population might reveal valuable information and insights that may be applied to species conservation.

In population studies, the negative effects of parasites may vary among individual traits (e.g., sex and age). Hence, the probability of infection and parasite prevalence may vary with sex, age, and season (i.e., breeding season versus non-breading season). Differential exposure and vulnerability to the parasite are two interacting forces that may be responsible for differences in infection probability between hosts and among sexes[26]. For example, behaviors that differ among males and females, such as feeding habits, habitat use, or parental effort can either enhance or reduce the exposition of one sex to a specific parasite (e.g. ref. 27–29). Additionally, stress and hormonal differences between sexes might make some individuals more susceptible to a specific parasite infection. Elevated levels of testosterone during the breeding season, observed in some avian species, may correlate with the suppression of immune response to parasites[30]. Accordingly, birds may become more susceptible to infection during the breeding season, creating a trade-off between reproduction (i.e., parental investment) and immune defence[31].

A limiting issue in avian malaria studies that use molecular approaches is the uncertainty about the genera and lineage of the parasite detected in some host samples. That happens because both parasite genera have the same small subunit of 16S rRNA gene used in PCR diagnosis, so the primer sites are conservative across a broad range of

Plasmodium and *Haemoproteus* parasites[32]. The parasites' genera cannot be distinguished by PCR diagnosis, instead high-quality sequencing analysis is required to determine the target parasite. Unfortunately, high quality sequences are difficult to produce for all samples in avian malaria studies (e.g. ref. 33–36), thus we had a large number of positive PCR samples for which we could not clear determine the parasite (i.e., either *Plasmodium* or *Haemoproteus*).

We accounted for these issues by using a multi-state model that accommodates state uncertainty[37] to yield unbiased estimate state-specific survival and transition probabilities (infection rates) for White-lined Tanagers (*Tachyphonus rufus*, Thraupidae) exposed to *Haemoproteus* parasites. This haemosporidian genus is a good choice for investigating specific host-parasite interactions, since avian malaria studies have shown that *Haemoproteus* lineages have a general pattern of being more specific to hosts than *Plasmodium* lineages[9,38–40]. We also explored variables that may influence the prevalence of *Haemoproteus* in the bird population and account for potential variation in capture probability among individuals to yield unbiased estimates of parameters of interest (survival and transition probabilities).

Results

We captured 94 White-lined Tanagers (35 females, 44 males, 15 uncertain sex), a total of 164 times (Table S2, Supporting information). Of the 164 blood samples collected, 112 screened positive for *Plasmodium* or *Haemoproteus* and were subjected to the cytochrome *b* PCR, 71 of which successfully amplified infections and the remaining 41 positive samples were designated as uncertain (*u*). Sequence analysis and BLAST search of the samples revealed the presence of five lineages infecting White-lined Tanagers in the study site, including three *Plasmodium* lineages detected in six

samples and two *Haemoproteus (Parahaemoproteus)* lineages, detected in 65 blood samples (Table S3, Supporting information). Among the positive samples for *Haemoproteus*, 64 belonged to a single lineage, TARUF02, detected here for the first time. Because the TARUF02 lineage represented almost all the *Haemoproteus* infections detected in our study (i.e., 64 out of 65 in total) and represented 90% of the amplified cytochrome *b* sequences (n = 71), dominating the haemosporidian infections in White-lined Tanagers at CLBI, we defined this lineage as our target parasite in our capture-mark-recapture analysis.

We found some evidence that monthly survival probability was influenced by the parasite infection and breeding season (Table S1: Step 4, Supporting information). Monthly survival probabilities were always higher for non-infected birds, but lower during the breeding season relative to the non-breeding season (Table 1).

Tanagers had a higher probability of becoming infected by the target parasite between occasions during the non-breeding season ($\widehat{\Psi}_{NBr}^{NI} = 0.09$; 95% CI = 0.04-0.20) when compared with the breeding season ($\widehat{\Psi}_{Br}^{NI} = 0.02$; 95% CI = 0.00-0.49), but these probabilities were similar for male and female birds (Table S1: Step 3, Supporting information).

The probability of correctly classifying an infected bird as infected by the target parasite (δ^{I}) was 63% (or 0.63 with 95% CI= 0.53-0.72). The *Haemoproteus* TARUF02 prevalence (ω) in our population was slightly higher during the breeding season (0.36 with 95% CI = 0.13-0.66) when compared with the non-breeding season (0.32 with 95% CI = 0.13-0.58), but host sex had little influence the prevalence (Table S1: Step 2, Supporting information).

Infected birds had a higher capture probability (0.18 with 95% CI = 0.11-0.28) than uninfected birds (0.04 with 95% CI = 0.02-0.10). However, capture probability varied little among season and sex (Table S1: Step 1, Supporting information).

Discussion

Haemoproteus infection reduced survival of infected birds, which may indicate that even a chronic infection by the parasite could entail substantial impacts to the host population. It is worth mentioning that such negative effect on bird survival was detected even in a short period, as these are monthly survival probabilities. This means that the probability that a bird infected in February survives the 4-month breeding season is only (0.86)^4 = 0.55, while the probability that a non-infected bird survives the breeding season is (0.90)^4 = 0.66. For birds outside the breeding season, the probability that a bird infected in June survives the 8-month non-breeding season is only (0.91)^8 = 0.47, while the probability of survival for a non-infected bird outside the breeding season is (0.94)^8 = 0.60. Generally, parasites drain important resources from their host and, to fight infection, part of the host's energy is dedicated to maintaining its immune system, reducing the physiological performance (e.g. reduction in oxygen-carrying capacity or reduced metabolic rate[41–43]). Previous studies suggest that haemosporidian parasites reduced survival of other wild host species, such as Blue Tits *Cyanistes caeruleus*[16,24], House Martins *Delichon urbica*[17] and American Kestrels *Falco sparverius*[12]. However, in wild populations haemosporidian infections are not considered major regulators of avian populations[44], except for infections in naïve populations, as noted in Hawaii[45,46]. Our results show that *Haemoproteus* infections might be an important factor regulating populations even in chronic infections. Chronic avian *Plasmodium* infections have also been shown to cause negative fitness

consequences in a wild population where malaria is endemic[47], strengthening the evidence that haemosporidians have important role in the regulation of avian populations not only in acute infections, but also in chronically infected birds. If an infected bird survives to the acute phase of the infection it may still be negatively influenced by the parasite during a chronic phase[41].

We also found that survival probability was lower during the breeding season in our White-lined Tanagers population, indicating that changes in behavior and physiology related to breeding may influence survival probability of individuals in this bird population. Indeed, Macario *et al*.[48] reported that the survival probability during the non-breeding season was 1.5 times higher than during the breeding season for the same population of White-lined Tanagers at CLBI. Other studies have also shown lower survival probability during the breeding season in other avian species[48–50]. We demonstrated that both *Haemoproteus* infection and the breeding season reduced monthly survival probability by ~ 10%. In other words, an individual that is breeding and also infected can have a survival probability ~ 10% lower than an uninfected bird outside the breeding season.

We found no differences in survival probability between males and females in the studied population. Sex-biased survival has been shown for species with considerable difference in body size between males and females, with the largest sex showing lower survival due to higher nutritional requirements or more difficulty avoiding predators[51,52]. However, male and female White-lined Tanagers have similar body sizes, which may contribute to our results. Additionally, sex-specific differences in mortality are often attributed to different behavior, ecology, and life history characteristics, which may produce different rates of exposure to predators and other

agents of mortality[53,54]. We believe in our population, both sexes may be equally exposed to factors that threaten their survival, such as predation or infection by parasites. In fact, similar survival between sex has been reported in other species of the family Thraupidae (e. g. Pileated Finch *Coryphospingus pileatus*[55]), and in other passerines (see ref. 56–59).

We found no sex-specific difference in the probability of a bird becoming infected by the target parasite. We believe that the behavior of living in pairs, as observed in White-lined Tanagers[60], encourages an equal exposure of both males and females to vectors, limiting the influence of sex on the probability of a bird becoming infected in our study site. The transition probability from a non-infected status to an infected status was 7% higher during the non-breeding season. The breeding season of White-lined Tanagers at the CLBI extends from the end of the dry season to the beginning of the rainy season (February to May). During this period of the year, there must be a lower availability of water bodies suitable for the development of the biting midges that transmit *H.* (*Parahaemoproteus*) due to the low rainfall in the months preceding the breeding season of the birds (Figure S1, Supporting information). In fact, the abundance of biting midges may be positively correlated with previous month's rainfall[61]. Therefore, we believe that a lower availability of water bodies should reduce the abundance of vectors, leading to a reduced probability of birds becoming infected during the breeding season. Unfortunately, we don't have data about the diversity and abundance of *Haemoproteus* vectors in CLBI, which limits our ability to suggest other possible explanations for our findings. To better understand the transmission dynamics of TARUF02 in White-lined Tanagers, we need to identify the biting midges acting as vectors of this parasite in CLBI. The lack of information about avian haemosporidian

vectors has been a great challenge and a limiting factor in the study of avian malaria infection dynamics in wild birds, and it is a matter that requires more attention.

The prevalence of *Haemoproteus* TARUF02 in the White-lined Tanager population (32-36%) was higher than the prevalence observed in studies of haemosporidian infections in other wild bird populations (e.g. ref. 11,38,62,63). TARUF02 lineage dominates the haemosporidian infections in White-lined Tanagers at CLBI, a relationship that deserves attention as TARUF02 is likely to have certain specificity for White-lined Tanager host species and probably an advantage in infecting it when competing with other lineages. As predicted, the prevalence of the target parasite was ~ 4% higher during the breeding season when compared to non-breeding season. Both reproduction and parasite defence can be costly for the bird, and during the breeding season the individual may face a trade-off between investing in offspring or in parasite defence[29]. That association between parental investment levels and haemosporidian prevalence have been shown in various bird species and demonstrate that reproductive effort increases susceptibility to haematozoan infection[29,31,64,65]. In our study population, as the probability of becoming infected is lower during the breeding season, it is more likely that birds with chronic but latent infection at the beginning of the reproductive cycle, suffer a reduction in the immune response, which may lead to a relapse of *Haemoproteus* infections.

We observed that birds infected by TARUF02 lineage had higher capture probability than uninfected birds, suggesting differences in behavior between birds in these different states. Other studies have also reported higher capture probabilities for infected individuals, which if unaccounted for would bias prevalence estimates[18,50,66,67]. The higher capture probability for infected birds suggests that they may have a reduced

capacity to detect or avoid mist-nets, increasing their chance of being captured. Although there is no evidence of haemosporidian infections causing ocular damage in birds, individuals infected by *Mycoplasma gallisepticum*, causative agent of severe conjunctivitis in House Finches (*Haemorhous mexicanus*), presented more severe clinical disease when coinfected by *Plasmodium*[68]. Similarly, chronic infection by *Haemoproteus* can favor the development of other pathogens, weakening the host and reducing their ability to see and escape obstacles. The costs of infection can also affect flight ability, leading infected birds to fly lower and increasing their chance of being captured. We believe that these behavioral changes may entail some fitness costs to the infected individuals. If the mist-nets were a predator, for example, then infected birds would be more susceptible to predation, which is consistent with our finding that infection reduces the survival of birds.

In conclusion, our study demonstrates that chronic infection by *Haemoproteus* can entail substantial effects on host survival and behavior. White-lined Tanagers infected by TARUF02 have lower survival and may be more susceptible to predation. Our study allowed us to observe a very specific parasite-host interaction in natural environment, still poorly explored in literature. In addition, the modeling approach used in our analysis could be adopted by studies involving other host-parasite interactions. If an endangered bird suffers a substantial effect on survival when infected by a parasite, as observed in our study, it could threaten the efficiency of conservation projects and accelerate the population's extinction in nature. Studies focusing on host-parasite interactions using an entire community of organisms may fail to reveal host-specific differences in parasite effects.

Material and Methods

Study site and Host species

White-lined Tanagers (*Tachyphonus rufus*) are passerine birds endemic to the Neotropics and very common in northeastern coast of Brazil. This species feeds on fruits and insects and forages in the lower and middle strata of vegetation[60,69]. This species is ideal for exploring the impact of parasites on individual and population dynamics/vital rates. Similar-sized male and female adults (average 34.4g) are typically found in pairs, but are sexually dimorphic allowing for easy discrimination in the field. In our study site, the breeding season extends from February to May[48] and we used this information to test for seasonal differences in vital rates (i.e., survival and transition probabilities).

The study was carried out in Barreira do Inferno Rocket Launch Center of the Brazilian Air Force (Centro de Lançamento Barreira do Inferno – CLBI), in Parnamirim, State of Rio Grande do Norte (Figure 1). This restricted access area has no signs of wood removal, hunting, or burning. The 1,800 ha study area is located in a tropical coastal vegetation region, named *Restinga*, which is a type of vegetation of the Atlantic Forest biome. The soil is sandy and covered by xerophytic vegetation, with a predominance of herbaceous plants and shrubs, and is classified as Lowland Semideciduous Forest. The climate is classified as tropical, with dry summers and rainy winters[70], and an annual mean temperature and mean rainfall of 25.6°C and 1,261mm, respectively. The rainy season is from March to July and the dry season is from August to February.

Bird sampling

Our use of mist-nets and banding at the fieldwork was approved by the Brazilian biodiversity monitoring agency (Institute Chico Mendes for Biodiversity Conservation—ICMBio, Brazilian National Center for Bird Conservation—CEMAVE, permission 3239). We followed standard ethical protocols for wildlife animals. Time in captivity was kept to the minimum, and all specimens were released at the same place where they were captured. This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA), Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil (Protocol #254/2011).

We studied host-disease dynamics in a White-lined Tanager population within a 30 ha plot (550 m x 550m) from April 2013 to December 2014. We used a grid of 11 x 11 lines spaced at 50 m intervals to establish 121 mist-net locations at the intersection of the grid lines. We sampled at 36-49 of these points each month in a cyclical way so that all points were sampled once every three month. Captures were made using mist-nets (Ecotone 18 x 3 m, five shelves and mesh 19 mm), opened at 4:50 a.m. and closed 9:30 a.m. Nets were checked every 60 minutes and captured birds were identified to species, sexed (according to plumage), and tagged with individual aluminum bands provided by the Brazilian National Center for Bird Conservation (CEMAVE/ICMBio). We collected blood samples of all White-lined Tanagers on filter paper via brachial venipuncture with a sterile needle (13 x 4.5 mm); samples were stored at 4°C until DNA extraction. Blood samples were collected for all birds (both initial and recaptured individuals) to screen for parasites during each capture occasion.

Parasite detection

DNA was extracted from avian blood samples using the phenol-chloroform method followed by isopropanol precipitation[71]. The genomic DNA pellet was resuspended in 35 µL of TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA, pH 8.0) and quantified using a NanoDrop. DNA samples were initially screened for the presence of *Plasmodium*/*Haemoproteus* infections by PCR using the primers 343F (5'GCTCACGCATCGCTTCT3') and 496R (5'GACCGGTCATTTTCTTTG3') described by Fallon *et al.*[32]. PCR products were viewed on a 6% acrylamide gel. Subsequent to parasite screening, a 524 bp fragment of the mtDNA cytochrome *b* gene from the infected individuals was amplified by a nested-PCR. For the first amplification we used the primers HaemNFI (5'CATATATTAAGAGAAITATGGAG3') and HaemNR3 (5'ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC3'); and for the second amplification the primers were HaemF (5'ATGGTGCTTTCGATATATGCATG3') and HaemR2 (5'GCATTATCTGGATGTGATAATGGT3'), following protocols described by Hellgren *et al.*[72]. Positive and negative controls were used in each PCR batch. The positive controls consisted of DNA extracted from blood samples of chickens experimentally infected with *Plasmodium gallinaceum*, and the negative controls were ultrapure water.

PCR products were purified using a solution of 20% polyethylene-glycol 8,000 according to the methods of Sambrook and Russell[71] with modifications. After purification, PCR products were sequenced in both directions using the BigDye Terminator Kit v3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using an ABI3100H automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA sequences were aligned and edited using ChromasPro version 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd) and

compared with data available in the open access databases Genbank and MalAvi[73]. Samples containing differences in one or more nucleotides were considered as distinct cytochrome *b* lineages. Lineages without previous records in the database were considered new lineages and deposited in GenBank under accession number MH260577. New occurrences of sequences previously described were also deposited in GenBank under accession numbers MH341735, MH341736, MH341737, and MH341738.

Infection state

In our analysis, each bird in the population is in one of two mutually exclusive states during each capture occasion: infected (*I*) or not infected (*N*) by *Haemoproteus* lineages. We used the combination of above lab procedures to classify each captured bird as: (1) infected (*I*) when the blood sample was PCR positive for *Plasmodium*/*Haemoproteus* and the *Haemoproteus* parasite was identified via sequencing, (2) not infected (*N*) by *Haemoproteus* lineages when the blood sample was negative for parasites in screening PCR or infected with *Plasmodium* lineages, or (3) uncertain state (*u*) when the blood was positive for *Plasmodium*/*Haemoproteus* in the screening PCR, but the parasite could not be identified by sequencing. Individual birds could transition between infected and non-infected states over time as described in the next section.

Modeling model parameters as function of predictor covariates

We used a multi-state mark-capture model with state uncertainty (Kendall et al. 2004), which allows three observed states: two certain states (i.e., certain categories: *I*, *N*) and a single uncertain state (i.e., uncertain category, *u*) in the capture histories of

individual birds. In our case, the two certain states included when an individual bird was captured and the tests were negative (*N*) or positive for the target parasite (*I*), and the uncertain state included when an individual bird was captured but the tests were ambiguous (i.e., the target parasite may or may not be present in the individual at that time – or occasion). Finally, when an individual bird was not captured in a specific occasion, the detection history contains a zero (0) for that occasion.

This model accounts for imperfect state classification or state uncertainty to obtain reliable estimates of whether or not this target parasite influenced individual survival and infection rates. Our models include two parameters (i.e., δ^{I} and δ^{N}) to estimate the probability of correctly classifying/observing the state given the individual was infected (*I*) or non-infected (*N*), respectively. Specifically, δ^{I} represented the probability of the tests detecting the target parasite in birds infected by *Haemoproteus* lineages. Similarly, the parameter δ^{N} represented the probability of correctly classifying a bird not infected by *Haemoproteus* as non-infected via the tests. Because we had no false positive detections, we fixed δ^{N} to 1 (or 100% correct classification of non-infected individuals). Additionally, our state-uncertainty model includes *pi*, defined as the proportion of individuals first released in state *u* that were infected (*I*). Because we had only one bird first released in state *u*, we ignored estimates for this parameter.

The focal parameters, host survival and transition probabilities, were modeled as a function of covariates (i.e., our hypotheses). Specifically, we explored the influence of the target parasite, season (breeding/non-breeding), and sex on the probability of bird survival (*S*) between monthly sampling occasions (i.e., monthly survival). We expected a negative relationship between *Haemoproteus* infection and survival. Birds may become more susceptible to infections by other pathogens and predation due to adverse

effects derived from infection, such as a high investment in immune defence and the use of important resources of the host by the parasite (e.g. parasites drain energy from their hosts by extracting nutrients[3,16,74]. We also investigated whether breeding season or sex were important factors influencing survival of the birds, since traits and factors inherent to the individuals may be important regulators of survival[53,50]. We also hypothesized that transient birds that are not available for capture in subsequent occasions, could exist in our study site. Not accounting for possible transient animals in capture-recapture studies may underestimate survival of residents[75].

We also explored the influence of breeding season and sex on the probability of a bird transitioning from a non-infected state to an infected state (Ψ^{NI}) between occasions. We suspected that birds may be more likely to become infected during the breeding season because behavioral changes may lead to higher exposure or vulnerability to *Haemoproteus* during this time[27,31]. Additionally, we expected that infection probability may vary among sexes, as the exposure to the vector can occur differently in birds of different sexes[26,28].

We explored the influence of the target parasite, breeding season, and sex on the probability of capturing an individual (p), given it was alive and in the study area during a specific sampling occasion. We expected capture probability would be influenced by sex because males and females have different movement behaviors which could lead to a differential capture probability[76,77]. We expected capture probabilities would be different during breeding season because birds may change their movement behavior due to parental care, increasing their probability of being captured by mist-nets[78]. We also expected infected birds to have different capture probability than uninfected birds

because, in many situations, parasites can induce changes in behavior, activity levels, or physiological processes, which could bias the sampling of animals in a given state[18,67].

Finally, we explored the influence of season and sex on the proportion of the population infected by the target parasite (ω) during each occasion, which is analogous to the prevalence of the target parasite in the bird population. We expected higher parasite prevalence during the breeding season as physiological changes may increase the susceptibility of these birds to *Haemoproteus* infection[29]. We also expect that birds of different sexes could have different prevalence, as males and females may have different susceptibilities to the parasite[79,80].

We fit all models/hypotheses to individual capture histories with 21 monthly capture occasions using the robust-design multi-state with state uncertainty model in program MARK[81]. Because our data were not collected under a robust-design we added a "dummy" occasion (a column of zeros) for each one of the monthly (primary) occasions (n = 21) and set the capture probability for these occasions to zero.

We used the Akaike Information Criterion, adjusted for small sample sizes (AICc), to determine which of our competing models/hypotheses, and associated covariate(s), were most parsimonious[82]. We adopted a "step-down"[83] strategy to evaluate our candidate models. Using the most parameterized model structure containing all the covariates of interest for S, Ψ^{NI} and ω, we first explored different capture probability structures/hypotheses (Table S1: Step 1, Supporting information). Retaining the best supported covariates for capture probability (p structures with Δ AICc ≤ 2), we fit four model structures representing possible influences of season and sex on target parasite prevalence (ω), using the most parameterized structures for the other parameters (i.e., Ψ^{NI} and S; Table S1: Step 2, Supporting information). The same

strategy was adopted to identify the most supported covariates for survival probability (*S*) and the probability of an individual becoming infected (transition probability, Ψ^{NI}, Table S1: Steps 3-4, Supporting information). Because of model selection uncertainty, we report model-averaged estimates of model parameters[82].

Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the Supplementary Information files, further data are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Eberhard, W. G. Spider manipulation by a wasp larva. *Nature* **406,** 255–256 (2000).

2. Møller, A. P. Flight distance and blood parasites in birds. *Behav. Ecol.* **19,** 1305–1313 (2008).

3. Hudson, P. J., Dobson, A. P. & Newborn, D. Do parasites make prey vulnerable to predation? Red Grouse and parasites. *J. Anim. Ecol.* **61,** 681–692 (1992).

4. Lafferty, K. D. & Morris, A. K. Altered behaviour of parasitized killifish increases susceptibility to predation by birds final hosts. *Ecology* **77,** 1390–1397 (1996).

5. Dufva, R. Blood parasites, health, reproductive success, and egg volume in female Great Tits *Parus major*. *J. Avian Biol.* **27,** 83 (1996).

6. Marzal, A., De Lope, F., Navarro, C. & Møller, A. P. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* **142,** 541–545 (2005).

7. Asghar, M. *et al.* Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science.* **347,** 436–438 (2015).

8. Valkiunas, G. Avian malaria parasites and other Haemosporidia. (CRC Press, 2005).

9. Bensch, S. *et al.* Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. B* **267,** 1583–1589 (2000).

10. Garvin, M. C., Szell, C. C. & Moore, F. R. Blood parasites of Nearctic–Neotropical migrant passerine birds during spring trans-Gulf migration: Impact on host body condition. *J. Parasitol.* **92,** 990–996 (2006).

11. Schrader, M. S., Walters, E. L., James, F. C. & Greiner, E. C. Seasonal prevalence of a haematozoan parasite of Red-Bellied Woodpeckers (*Melanerpes carolinus*) and its association with host condition and overwinter survival. *Auk* **120,** 130–137 (2003).

12. Dawson, R. D. & Bortolotti, G. R. Effects of hematozoan parasites on condition and return rates of American Kestrels. *Auk* **117,** 373–380 (2000).

13. Bennett, G. F., Caines, J. R. & Bishop, M. A. Influence of blood parasites on the body mass of passeriform birds. *J. Wildl. Dis.* **24,** 339–343 (1988).

14. Shurulinkov, P., Chakarov, N. & Daskalova, G. Blood parasites, body condition,

and wing length in two subspecies of Yellow Wagtail (*Motacilla flava*) during migration. *Parasitol. Res.* **110,** 2043–2051 (2012).

15. Kulma, K., Low, M., Bensch, S. & Qvarnström, A. Malaria infections reinforce competitive asymmetry between two *Ficedula* flycatchers in a recent contact zone. *Mol. Ecol.* **22,** 4591–4601 (2013).

16. Puente, J. M. del la *et al.* The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: a medication experiment. *Biol. Lett.* **6,** 663–665 (2010).

17. Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J. & De Lope, F. Effects of malaria double infection in birds: One plus one is not two. *J. Evol. Biol.* **21,** 979–987 (2008).

18. Podmokła, E. *et al.* Effect of haemosporidian infections on host survival and recapture rate in the Blue Tit. *J. Avian Biol.* **48,** 796–803 (2017).

19. Tella, J. L., Forero, M. G., Gajón, A., Hiraldo, F. & Donázar, J. A. Absence of blood-parasitization effects on Lesser Kestrel fitness. *Auk* **113,** 253–256 (1996).

20. Zylberberg, M. *et al. Haemoproteus* infected birds have increased lifetime reproductive success. *Parasitology* **142,** 1033–1043 (2015).

21. Merino, S., Moreno, J., Jose Sanz, J. & Arriero, E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in Blue Tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **267,** 2507–2510 (2000).

22. Sanz, J. J., Arriero, E., Moreno, J. & Merino, S. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* **126,** 339–344 (2001).

23. Podmokła, E. *et al.* Avian malaria is associated with increased reproductive investment in the Blue Tit. *J. Avian Biol.* **45,** 219–224 (2014).

24. Lachish, S., Knowles, S. C. L., Alves, R., Wood, M. J. & Sheldon, B. C. Fitness effects of endemic malaria infections in a wild bird population : the importance of ecological structure. *J. Anim. Ecol.* **80,** 1196–1206 (2011).

25. Bensch, S. *et al.* Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J. Anim. Ecol.* **76,** 112–122 (2007).

26. Zuk, M. & McKean, K. A. Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *Int. J. Parasitol.* **26,** 1009–1024 (1996).

27. Drobney, R. D., Train, C. T. & Fredrickson, L. H. Dynamics of the platyhelminth fauna of wood ducks in relation to food habits and reproductive state. *J. Parasitol.* **69,** 375–380 (1983).

28. Tinsley, R. C. The effects of host sex on transmission sucess. *Parasitol. Today* **5,** 190–195 (1989).

29. Richner, H., Christe, P. & Oppliger, A. Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92,** 1192–4 (1995).

30. Hegner, R. E. & Wingfield, J. C. Effects of experimental manipulation of testosterone levels onparental investment and breeding success in male House Sparrows. *Auk* **104,** 462–469 (1987).

31. Ardia, D. R. Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune function in tree swallows. *J. Anim. Ecol.* **74,** 517–524 (2005).

32. Fallon, A. S. M., Ricklefs, R. E., Swanson, B. L. & Bermingham, E. Detecting

avian malaria: an improved Polymerase Chain Reaction diagnostic. *J. Parasitol.* **89,** 1044–1047 (2003).

33. Ricklefs, R. E. *et al.* Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecol. Monogr.* **75,** 543–559 (2005).

34. Fallon, S. M., Fleischer, R. C. & Graves, G. R. Malarial parasites as geographical markers in migratory birds? *Biol. Lett.* **2,** 213–216 (2006).

35. Fallon, S. M. & Ricklefs, R. E. Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. *J. Avian Biol.* **39,** 514–522 (2008).

36. Svensson-Coelho, M. *et al.* Diversity, prevalence, and host specificity of avian *Plasmodium* and *Haemoproteus* in a western Amazon assemblage. *Ornithological Monographs* **76,** (2013).

37. Kendall, W. L., Langtimm, C. A. & Runge, M. C. Capture-recapture analysis for estimating Manatee reproductive rates. *Mar. Mammal Sci.* **20,** 424–437 (2004).

38. Ayadi, T. *et al.* Diversity, prevalence and host specificity of avian parasites in southern Tunisian oases. *Parasitology* 1–8 (2017). doi:10.1017/ S0031182017002141

39. Bennett, G. F., Bishop, M. A. & Peirce, M. A. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. *Syst. Parasitol.* **26,** 171–179 (1993).

40. Atkinson, C. T. & Van Riper III, C. in *Bird-Parasite Interactions: Ecology, evolution, and behaviour* (eds. Loye, J. E. & Zuk, M.) 19–48 (Oxford University Press, 1991).

41. Hayworth, A. M., Van Riper, III, C. & Weathers, W. W. Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in Canaries (*Serinus canarius*). *J. Parasitol.* **73,** 850–853 (1987).

42. Rigdon, R. H. & Rostorfer, H. H. Effect of oxygen on *P. lophurae* infected ducks. *Procedings Soc. Exp. Biol. Med.* **63,** 165–167 (1946).

43. Schall, J. Lizards infected with malaria: physiological and behavioral consequences. *Science.* **217,** 1057–1059 (1982).

44. Bennett, G. F., Greiner, E. C. & Threlfall, W. in *Wildlife Diseases* (ed. Page, L. A.) 25–33 (Plenum Press, 1976).

45. van Riper III, C., van Riper, S. G., Goff, M. L. & Laird, M. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecol. Monogr.* **56,** 327–344 (1986).

46. Atkinson, C. T., Dusek, R. J., Woods, K. L. & Iko, W. M. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.* **36,** 197–204 (2000).

47. Knowles, S. C. L., Palinauskas, V. & Sheldon, B. C. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: Experimental evidence from a wild bird population. *J. Evol. Biol.* **23,** 557–569 (2010).

48. Macario, P. *et al.* Apparent survival and cost of reproduction for White-lined Tanager (*Tachyphonus rufus*, Thraupidae) in the northern Atlantic Rainforest, Brazil. *PLoS One* **12,** 1–13 (2017).

49. Sankamethawee, W., Pierce, A. J., Hardesty, B. D. & Gale, G. A. Seasonal

variability in survivorship of a cooperatively breeding tropical passerine. *Ecol. Res.* **26,** 429–436 (2011).

50. Sorci, G. *et al.* Cost of reproduction and cost of parasitism in the common lizard, *Lacerta vivipara*. *Oikos* **76,** 121–130 (1996).

51. Milonoff, M. & Lindén, H. Sexual size dimorphism of body components in Capercaillie chicks. *Ornis Scand.* **20,** 29–35 (1989).

52. Martín, C. A. *et al.* Sex-biased juvenile survival in a bird with extreme size dimorphism, the great bustard *Otis tarda*. *J. Avian Biol.* **38,** 335–346 (2007).

53. Szekely, T., Liker, A., Freckleton, R. P., Fichtel, C. & Kappeler, P. M. Sex-biased survival predicts adult sex ratio variation in wild birds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281,** 20140342–20140342 (2014).

54. Pettersson, L. B., Ramnarine, I. W., Becher, S. A., Mahabir, R. & Magurran, A. E. Sex ratio dynamics and fluctuating selection pressures in natural populations of the Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **55,** 461–468 (2004).

55. Tavares-Damasceno, J. P. *et al.* Effect of drought on demography of Pileated Finch (*Coryphospingus pileatus*: Thraupidae) in northeastern Brazil. *J. Arid Environ.* **147,** 1–8 (2017).

56. Pearce-Higgins, J. W., Brace, R. C. & Hornbuckle, J. Survival of Band-tailed Manakins. *Condor* **109,** 167–172 (2007).

57. Ruiz-Gutiérrez, V., Gavin, T. A. & Dhondt, A. A. Habitat fragmentation lowers survival of a tropical forest bird. *Ecol. Appl.* **18,** 838–846 (2008).

58. França, L. F. & Marini, M. T. Negative population trend for Chapada Flycatchers (*Suiriri islerorum*) despite high apparent annual survival. *J. F. Ornithol.* **81,** 227–236 (2010).

59. Blake, J. G. & Loiselle, B. A. Apparent survival rates of forest birds in eastern Ecuador revisited: Improvement in precision but no change in estimates. *PLoS One* **8,** 1–6 (2013).

60. Sigrist, T. *Guia de campo Avis Brasilis - Avifauna brasileira*. (2014).

61. Garvin, M. C. & Greiner, E. C. Ecology of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in southcentral Florida and experimental Culicoides vectors of the avian hematozoan *Haemoproteus* danilewskyi Kruse. *J. Wildl. Dis.* **39,** 170–178 (2003).

62. Cosgrove, C. L., Wood, M. J., Day, K. P. & Sheldon, B. C. Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *J. Anim. Ecol.* **77,** 540–548 (2008).

63. Fecchio, A. *et al.* Host associations and turnover of haemosporidian parasites in manakins (Aves: Pipridae). *Parasitology* **144,** 984–993 (2017).

64. Norris, K., Anwar, M. & Read, A. F. Reproductive effort influences the prevalence of Haematozoan parasites in Great Tits. *J. Anim. Ecol.* **63,** 601–610 (1994).

65. Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M. S., Sheldon, B. C. & Qvarnström, A. Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **346,** 323–331 (1994).

66. Senar, J. C. & Conroy, M. J. Multi-state analysis of the impacts of avian pox on a population of Serins (*Serinus serinus*): The importance of estimating recapture rates. *Anim. Biodivers. Conserv.* **27,** 133–146 (2004).

67. Jennelle, C. S., Cooch, E. G., Conroy, M. J. & Senar, J. C. State-specific detection probabilities and disease prevalence. *Ecol. Appl.* **17,** 154–167 (2007).

68. Dhondt, A. A., Dhondt, K. V. & Nazeri, S. Apparent effect of chronic *Plasmodium* infections on disease severity caused by experimental infections with *Mycoplasma gallisepticum* in house finches. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **6,** 49–53 (2017).

69. del Hoyo, J., Elliott, A. & Christie, D. A. *Handbook of the birds of the world alive. Volume 16 -Tanagers to new world blackbirds* (Lynx Edicions, 2011).

70. Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. de M. & Sparovek, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift* **22,** 711–728 (2014).

71. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

72. Hellgren, O., Waldenström, J. & Bensch, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon* , *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* **90,** 797–802 (2004).

73. Bensch, S., Hellgren, O. & Pérez-Tris, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Mol. Ecol. Resour.* **9,** 1353–1358 (2009).

74. Price, P. W. *Evolutionary biology of parasites*. (Princeton University Press, 1980).

75. Pradel, R., Hines, J. E., Lebreton, J.-D. D. & Nichols, J. D. Capture-recapture survival models taking account of transients. *Biometrics* **53,** 60–72 (1997).

76. Domènech, J. & Senar, J. C. Trap type can bias estimates of sex ratio. *J. F. Ornithol.* **69,** 380–385 (1998).

77. Borrás, A. & Senar, J. Sex, age and condition bias of decoy-trapped Citril Finches (*Serinus citrinella*). *Miscelània Zoològica* **10,** 403–406 (1986).

78. Nichols, J. D., Hines, J. E., Pollock, K. H., Hinz, R. L. & Link, A. Estimating breeding proportions and testing hypotheses about costs of reproduction with capture-recapture data. *Ecology* **75,** 2052–2065 (1994).

79. Poulin, R. Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? *Am. Nat.* **147,** 287–295 (1996).

80. Zuk, M. Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. *Parasitol. Today* **6,** 231–233 (1990).

81. White, G. C. & Burnham, K. P. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* **46 (Supple,** S120-139 (1999).

82. Burnham, K. P. & Anderson, D. R. *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretical approach*. **172,** (Springer, 2002).

83. Lebreton, J.-D., Burnham, K. P., Clobert, J. & David, R. A. Modeling survival and testing biological hypotheses using marked animals: a unified approach with case studies. *Ecol. Monogr.* **62,** 67–118 (1992).

Acknowledgements

We thank the Centro de Lançamento Barreira do Inferno (CLBI, Brazilian Air Force) for permission to access the study area, and to the Brazilian National Center for Bird Conservation (CEMAVE/ICMBio) for supplying the aluminum leg bands. We thank also all LabOrnito - UFRN ornithologists and students for their valuable help in the field and laboratory work, especially Lidiane M. Andrade and Priscilla S. A. Araújo. We are grateful to Eric Pereira for designing the map of our sampling area. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (grants 474945/2010-3 and 248588/2013-3), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Author Contributions

RAR, PAM, EMB conceived the study. MP and PAM conducted fieldwork. RAR generated sequencing data and molecular analyses. RLM, LLB, MP performed statistical analyses. RAR, PAM, EMB contributed to data interpretation. RAR wrote the first draft of the manuscript, and all authors contributed to subsequent revisions.

Additional Information

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Table 1. Model averaged estimates for monthly survival probabilities of White-lined Tanager individuals according to *Haemoproteus* TARUF02 infection and breeding season, Barreira do Inferno Rocket Launch Center of the Brazilian Air Force, Parnamirim, State of Rio Grande do Norte, Brazil.

Season	Status	Survival estimates	SE	LCI	UCI
Non-breeding	Non-infected	0.94	0.05	0.73	0.99
	Infected	0.91	0.05	0.73	0.98
Breeding	Non-infected	0.90	0.07	0.66	0.98
	Infected	0.86	0.08	0.62	0.96

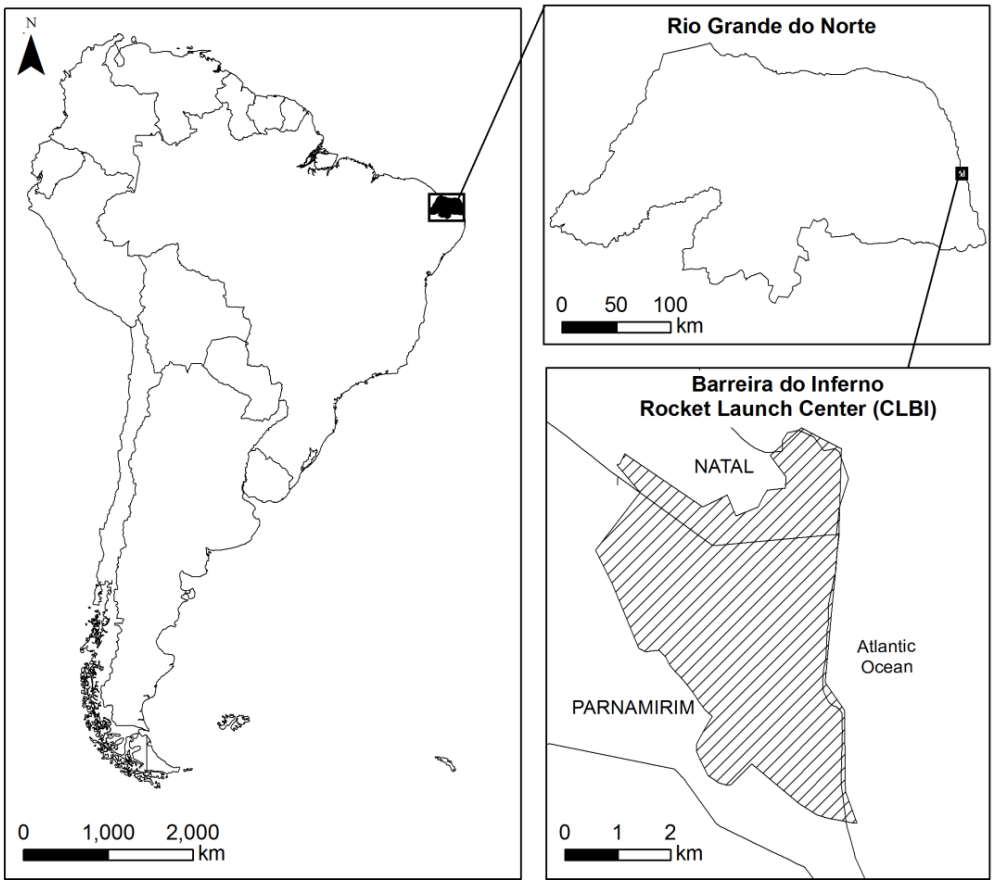

Figure 1. Location of the study site sampled for a White-lined Tanager population infected by *Haemoproteus* TARUF02, Barreira do Inferno Rocket Launch Center of the Brazilian Air Force, Parnamirim, State of Rio Grande do Norte, Brazil.