

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA, CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DA VIDA SILVESTRE

**Daniela de Angeli Dutra**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE  
HEMOSPORÍDEOS EM MORCEGOS COLETADOS EM MONTES  
CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

Orientação: Dra. Érika Martins Braga

Belo Horizonte

2019

**Daniela de Angeli Dutra**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE  
HEMOSPORÍDEOS EM MORCEGOS COLETADOS EM MONTES  
CLAROS, MINAS GERAIS, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ecologia,  
Conservação e Manejo da Vida Silvestre  
para obtenção do título de Mestre em  
Ecologia.

Orientador: Profa. Dra. Érika Martins Braga

Belo Horizonte

2019

Daniela de Angeli Dutra

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE HEMOSPORÍDEOS  
EM MORCEGOS COLETADOS EM MONTES CLAROS, MINAS  
GERAIS, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia,  
Conservação e Manejo da Vida Silvestre da Universidade Federal de Minas Gerais para  
obtenção do título de Mestre em Ecologia

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

BANCA EXAMINADORA

---

Adriano Pereira Paglia (parecerista)

---

Hudson Alves Pinto (parecerista)

---

Érika Martins Braga – UFMG (orientador)

“Um intelectual é um homem que diz uma coisa simples de uma maneira difícil; um artista é um homem que diz uma coisa difícil de uma maneira simples”

Charles Bukowski

**Ao programa de pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da vida Silvestre da UFMG, e a todos com quem convivi ao longo destes seis anos. A produção compartilhada com amigos foi a melhor experiência da minha formação acadêmica.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que permitiu que toda minha trajetória acadêmica acontecesse ao longo de minha vida. Agradeço não somente pelos anos como universitária e mestranda, mas por todos os momentos da minha vida que me levaram aonde estou agora.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por ter me aberto as portas para o mundo acadêmico e me proporcionado crescimento pessoal e profissional imensurável. Também agradeço a todos os professores com quem tive contato nesta instituição de pesquisa ao longo destes anos.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, em especial ao Francisco Ferreira e a Luiza Mourão, meus mais antigos colegas de laboratório, pela amizade e crescimento acadêmico. Agradeço também a minha orientadora, a prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Érika Martins Braga, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. Também dedico meus agradecimentos a prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thallyta Maria Vieira da Universidade Estadual de Montes Claros pela colaboração, sem sua parceria a realização deste estudo seria impossível.

Gostaria de agradecer também aos meus pais, irmã, demais familiares e amigos que sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória. Em especial, gostaria de agradecer a Graziela Pascoli e Flávio Camarota que, além de amigos fieis, sempre foram um apoio acadêmico para minhas dúvidas e perguntas ecológicas. Também agradeço ao meu namorado, André Pessoa, pelo incentivo e por ouvir durante horas intermináveis todos os meus comentários sobre este estudo e os resultados obtidos nesta dissertação.

Agradeço também a profa. Dra. Nubia Matta e todo o Grupo de Estudio Relación Parasito Hospedeiro (GERPH) da Universidad Nacional de Colombia pela oportunidade do meu intercâmbio, pelo companheirismo e por toda aprendizagem durante minha estadia em seu laboratório. Também agradeço ao Santander pelo financiamento do intercâmbio, me permitindo esta experiência internacional.

Também sou grata a todos os coordenadores, professores e colegas do Curso Ecologia da Floresta Amazônica (EFA) edição 2017 pela oportunidade de participar de uma atividade tão ecologicamente enriquecedora, pela amizade e pelo crescimento pessoal e acadêmico. Também agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF) pelo financiamento do curso.

Finalmente, agradeço a todos os membros da coordenação, secretaria e professores do programa de pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre (PPG-ECMVS). Agradeço também a CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo suporte financeiro.

## RESUMO

A ordem Haemosporida é composta por mais de 500 espécies de parasitos que infectam uma ampla gama de hospedeiros vertebrados, tais como aves, reptéis, primatas e morcegos. Os hemosporídeos são parasitos amplamente distribuídos no globo e muito abundantes em infecções de animais silvestres. Estes parasitos podem ter efeitos severos mesmo em infecções crônicas, reduzindo expectativa de vida, sobrevivência e aptidão de seus hospedeiros. Os morcegos são organismos fundamentais para o funcionamento do ecossistema, uma vez que realizam uma série de serviços essenciais para sua manutenção, tais como polinização, dispersão de frutos e sementes e controle populacional de insetos. Entretanto, pouco se conhece a respeito da infecção de morcegos por hemosporídeos, especialmente no Novo Mundo. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de hemosporídeos em morcegos brasileiros bem como identificar os gêneros destes parasitos. Possíveis associações entre a presença de infecção por hemosporídeos e as características biológicas de seus hospedeiros também foram investigadas. Assim, avaliou-se se a época do ano e o sexo do hospedeiro influenciam a ocorrência por hemosporídeos e se diferentes espécies possuem variação na susceptibilidade a esta infecção. Também se avaliou se a condição corporal dos morcegos infectados é inferior a observada para morcegos não infectados. Para tal, capturou-se 247 morcegos no município de Montes Claros, Minas Gerais, sendo realizado medições, sexagem, coleta de sangue e pelo menos um esfregaço sanguíneo para cada animal. O sangue e os esfregaços sanguíneos foram utilizados para diagnóstico molecular (amplificação por meio de PCR de 196 pares de base do gene ribossomal SSU) e morfológico (observação microscópica) de hemosporídeos. Duzentos e oito indivíduos apresentaram esfregaços com qualidade suficiente para análise por microscopia. Para estimar a taxa de infecção, somente os indivíduos com lâminas viáveis foram considerados na análise, sendo considerado um mínimo de 50 campos em aumento de 400x e 200 campos em aumento de 1000x para cada morcego. Avaliou-se também a condição corporal dos animais pela relação peso/antebraço. Além disso, utilizou-se cinco diferentes ampliações moleculares para sequenciar os parasitos encontrados em morcegos, no entanto, nenhum parasito foi sequenciado com sucesso. A ocorrência de hemosporídeos nos morcegos, considerando-se o diagnóstico molecular e morfológico, foi de 6,44% (13/208). Entre os esfregaços positivos, foi observado pelo menos uma forma do parasito (trofozoíto, esquizonte ou gametócito). Entretanto, as parasitemias detectadas foram frequentemente

baixas (10 em 13) indicando um estado crônico de infecção entre os morcegos analisados. A ocorrência de hemosporídeos entre os sexos foi similar ( $p=0,16$ ,  $F=5$ ). Entretanto, a ocorrência de hemosporídeos diferiu entre a época do ano ( $p=0,004$ ,  $F=6$ ) sendo maior na estação chuvosa e entre as espécies de morcegos avaliadas ( $0<0,0001$ ,  $F=18$ ). A ocorrência de hemosporídeos foi significativamente maior entre os morcegos vespertilionídeos (21,5%) quando comparados aos filostomídeos (5,2%), sendo a espécie *Myotis nigricans* a mais parasitada (23%). A relação peso/antebraço também foi menor em animais infectados, indicando condição corporal inferior em morcegos infectados por hemosporídeos ( $F=170$ ,  $p=0,007$ ). Estes dados indicam que mesmo em infecções crônicas, morcegos podem ser negativamente afetados por hemosporídeos. Destaca-se aqui a necessidade de novos estudos para se caracterizar o papel destas infecções na estruturação das comunidades de morcegos neotropicais.



## ABSTRACT

The order Haemosporida is composed of more than 500 species of parasites that infect a wide range of vertebrate hosts, such as birds, reptiles, primates and bats. Haemosporidian parasites are widely distributed around the globe and very abundant in wildlife animal infections. These parasites might cause severe effects even in chronic infections, reducing life expectancy, survival and fitness of their hosts. Bats are fundamental organisms for the functioning of the ecosystem, since they perform a series of essential services for its maintenance, such as pollination, dispersion of fruits and seeds and population control of insects. However, little is known about the infection of bats by haemosporidians, especially in New World. The objective of this work was to evaluate the presence of haemosporidian parasites in Brazilian bats and to identify the genera of these hemoparasites. Possible associations between the presence of haemosporidian infections and biological characteristics of its hosts were also investigated. Thus, it was evaluated whether the season of year and host sex influence the occurrence of haemosporidian and if different species present variation in susceptibility to this infection. I also evaluated whether body condition of infected bats is lower than that observed for uninfected bats. For this purpose, 247 bats were captured in the municipality of Montes Claros, Minas Gerais. Measurements, sexing, blood collection and at least one blood smear were performed for each animal. Blood and blood smears were used for molecular diagnosis (amplification by PCR of 196 pairs of the ribosomal SSU gene) and morphological (microscopic observation) of haemosporidian. 208 individuals had smears of sufficient quality for analysis by microscopy. To estimate the infection rate, only individuals with viable slides were considered in the analysis, considering a minimum of 50 fields with a 400x increase and 200 fields with a 1000x increase for each bat. The body condition of the animals was also evaluated by weight / forearm ratio. In addition, I used five different molecular amplifications to sequence the parasites found in bats, however, no parasite was successfully sequenced. The occurrence of haemosporidian parasites in bats, considering the molecular and morphological diagnosis, was 6.44% (13/208). Among the positive smears, at least one parasite form (trophozoite, schizont or gametocyte) was observed. Nevertheless, detected parasitemias were often (10 out of 13) low (<1%) indicating a chronic infection status among the bats analyzed. The occurrence of haemosporidiana between the sexes was similar ( $p = 0.16$ ,  $F = 5$ ). However, haemosporidian occurrence differed between the season of year ( $p = 0.004$ ,  $F = 6$ ), being

higher during the rainy season. Moreover, the infection also varied among species of bats evaluated ( $0 < 0.0001$ ,  $F = 18$ ). The occurrence of hemosporids was significantly higher among vespertilionidae bats (21.5%) compared to filostomids (5.2%), with *Myotis nigricans* being the most parasitized species (23%). The weight / forearm ratio was also lower in infected animals, indicating lower body condition in bats infected with hemosporids ( $F = 170$ ,  $p = 0.007$ ). These data indicate that even in chronic infections, bats may be negatively affected by haemosporidian. We emphasize the need for new studies to characterize the role of these infections in the structuring of neotropical bat communities.

## LISTA DE FÍGURAS

Figura 1: Mapa da área de coleta.....	25
Figura 2: Chuva acumulada mensal (normal climatológica 61-90) na cidade de Montes Claros, MG, nos anos de 2014 e 2015.....	27
Figura 3: Temperatura média compensada entre abril de 2015 e março de 2015 para o município de Montes Claros, MG. ....	27
Figura 4: Formas de parasitos da ordem Haemosporida encontrados em morcegos brasileiros. Nas imagens 1-5 estão representados trofozoítos, nas imagens 6-12 estão representados merontes e nas imagens 13-16 estão representados gametócitos. Barra mede 10µm. ....	37
Figura 5: Formas de parasitos filarídeos encontrados em morcegos do brasileiros. Em todas as imagens estão representados formas jovens imaturas dos parasitos. Barra mede 10µm.....	38
Figura 6: Formas Haemosporidianas de morcegos encontradas no Brasil. Nas imagens A-B estão representados os trofozoítos e na imagem C um esquizonte. Barra mede 10µm. ....	39
Figura 7: Formas de parasitos da ordem Haemosporida encontrados em <i>Carollia perspilata</i> . Nas imagens 1-2 estão representados merontes e na imagem C está representado um gametócito. Barra mede 10µm.....	39
Figura 8: Formas haemosporidianas de <i>Desmodus rotundus</i> e <i>Glossophaga soricina</i> coletadas no Brasil. Nas imagens, gametócitos (A) e esquizontes (B, C) são representados. Barra mede 10µm. ....	40
Figura 9: Formas de parasitos da ordem Haemosporida encontrados em um espécime de <i>Artibeus lituratus</i> . Nas imagens estão representados apenas gametócitos. Barra mede 10µm.....	41
Figura 10: Formas de microfilarídeos encontrados em um espécime de <i>Anoura geoffroyi</i> . Barra mede 10µm. ....	42
Figura 11: Formas de microfilarídeos encontrados em um espécime de <i>Carollia perspilata</i> . Barra mede 10µm. ....	42

Figura 12: Formas de microfilarídeos encontrados em um espécime de <i>Artibeus planirostris</i> . Barra mede 10 $\mu$ m. ....	43
Figura 13: Ocorrência de hemosporídeos para cada época do ano. Foi observada diferença na ocorrência de hemosporídeos entre a época de coleta dos animais ( $p=0,004$ , $F=18$ ).44	44
Figura 14: Ocorrência de hemosporídeos para as seis espécies de morcegos. Foi observada diferença na ocorrência de hemosporídeos ( $p<0,0001$ , $F=18$ ). ....	45
Figura 15: Relação peso/antebraço entre morcegos infectados e não infectados ( $F=170$ , $p=0,007$ ).....	46
Figura 16: Ocorrência de hemosporídeos para quatro guildas tróficas. Observou-se diferença significativa na ocorrência de hemosporídeos ( $p=0,03$ , $F=6$ ). ....	47

## **LISTA DE SIGLAS**

ANCOVA - Análise de Covariância

ATP- Adenosina Trifosfato

Cyt b- Citocromooxidade Subunidade b

DNA -Ácido Desoxirribonucléico

GLM – Modelos Lineares Generalizados

MG – Minas Gerais

Pb – Pares de Base

PEG- Polietilenoglicol

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

TBE- Tris-Ácido Bórico-EDTA

## Sumário

<b>1. Revisão da Literatura</b>	<b>16</b>
<b>1.1 A ordem Haemosporida</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1 Plasmodium</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2 Hepatocystis</b>	<b>19</b>
<b>1.1.3 Polychromophilus</b>	<b>20</b>
<b>1.1.4 Nycteria</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Quirópteros no Brasil</b>	<b>21</b>
<b>2- Introdução</b>	<b>23</b>
<b>3- Objetivos</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>24</b>
<b>4- Métodos</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Coleta dos morcegos</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Diagnóstico por microscopia e registro fotográfico dos parasitos</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Diagnóstico molecular da infecção por hemosporídeos</b>	<b>28</b>
<b>4.3.1 Extração de DNA</b>	<b>28</b>
<b>4.3.2 Diagnóstico molecular de hemosporídeos (PCR-Polymerase chain reaction)</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Análise da diversidade de hemosporídeos</b>	<b>30</b>
<b>4.4.1 PCRs para sequenciamento</b>	<b>30</b>
<b>4.5.1.1 PCR com os primers DW2/DW4 e DW1/DW3</b>	<b>30</b>
<b>4.5.1.2 PCR com os primers 3932F/DW4, DW2/3932R e HepF3/HepR3</b>	<b>31</b>
<b>4.5.1.3 PCR com os primers clpcoutF/outR e clpcinF/ inR</b>	<b>31</b>
<b>4.5.2 Purificação do produto da Nested-PCR</b>	<b>33</b>
<b>4.5.3 Reação de sequenciamento e precipitação</b>	<b>33</b>
<b>4.5.4 Edição das sequências e análises filogenéticas</b>	<b>34</b>

<b>4.5 Análises estatísticas</b>	<b>34</b>
<b>5- Resultados</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Ocorrência e diagnóstico microscópico de hemosporídeos e outros hemoparasitos</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Descrição Morfológica dos Hemosporídeos</b>	<b>38</b>
<b>5.3 Descrição Morfológica dos Microfilarídeos</b>	<b>41</b>
<b>5.4 Avaliação da influência da época do ano de coleta e a ocorrência de hemosporídeos</b>	<b>43</b>
<b>5.5 Espécies de morcegos encontradas infectadas por hemosporídeos</b>	<b>44</b>
<b>5.6 Avaliação do efeito da condição corporal e ocorrência de hemosporídeos</b>	<b>45</b>
<b>5.7 Insucesso no sequenciamento para caracterização da diversidade de hemosporídeos</b>	<b>47</b>
<b>6- Discussão</b>	<b>48</b>
<b>7- Conclusões</b>	<b>53</b>
<b>8- Referências</b>	<b>54</b>
<b>9- Anexos</b>	<b>58</b>

## 1. Revisão da Literatura

A ecologia (oikos=casa, logia=estudo) é o estudo científico das interações entre os organismos e o ambiente em que se encontram (Begon et al., 2007). Os organismos de um determinado ecossistema podem apresentar uma série de diferentes interações intra e interespecíficas das quais podemos destacar a relação entre os parasitos e seus diferentes hospedeiros. O parasitismo pode ser definido como o consumo por um organismo de um ou mais indivíduos hospedeiros, normalmente provocando danos, mas, sem levar a morte imediata (Begon et al., 2007). Os parasitos representam um grupo muito relevante de organismos ocasionando milhões infecções e óbitos na população humana todos os anos. Estes organismos são numericamente importantes, sendo raro um organismo em ambiente natural que não abrigue várias espécies de parasitos. Outrossim, costumam ser muito específicos ou apresentarem uma gama limitada de hospedeiros. Ademais, avanços no estudo da ecologia de parasitos demonstram que os parasitos além de serem ecologicamente importantes, podem exercer influências iguais ou maiores que os demais organismos na elaboração da estrutura de uma comunidade (Daniel L. Preston, 2010). Por certo, o parasitismo é mais comum do que a predação e, sem dúvida, representa a estratégia de história de vida mais difundida na natureza (Begon et al., 2007; Daniel L. Preston, 2010).

Os parasitos podem influenciar o comportamento e a aptidão de seus hospedeiros, regulando o tamanho da população dos mesmos. Além disso, podem exercer efeitos profundos sobre interações tróficas, redes alimentares, competição, biodiversidade e espécies-chave (Preston 2010). Tendo isso em vista, muitos estudos ecológicos têm buscado compreender as propriedades de inúmeros sistemas parasito-hospedeiro e como esta interação pode influenciar as dinâmicas ecossistêmica e populacional das espécies afetadas (Kuris et al., 2008; Lafferty and Morris, 1996; Poulin et al., 2005; Schall, 1992). Atualmente, um dos modelos de infecções parasitárias mais estudado por ecólogos e parasitologistas são os parasitos da ordem Haemosporida (Protista: Apicomplexa) (Marzal, 2012). Este grupo de parasitos é um excelente modelo para estudos ecológicos por apresentarem distribuição vasta no globo, elevada abundância e diversidade de parasitos e hospedeiros, além de serem facilmente amostrados sem acometer as populações hospedeiras (Marzal, 2012).



## 1.1 A ordem Haemosporida

Os hemosporídeos (Ordem Haemosporida) são um dos mais bem estudados grupos de protozoários parasitos. Nesta ordem estão incluídos parasitos heteróxeos obrigatórios, os quais utilizam um hospedeiro vertebrado como hospedeiro intermediário e dípteros hematófagos como hospedeiros definitivos (Valkiūnas, 2005). Dentro deste taxa encontram-se os agentes da malária humana, uma doença que apresenta grande número de casos clínicos e mortes. Não obstante, a diversidade ecológica e sistemática destes parasitos é muito maior, já sendo descritas mais de 550 espécies de parasitos pertencentes a 17 diferentes gêneros (Marzal, 2012). Estes parasitos podem infectar répteis, tartarugas, aves e mamíferos, apresentando ao menos sete famílias de dípteros vetores e podendo ser encontrados em todos os continentes, exceto a Antártida (Marzal, 2012). Dentro da classe Mamífera podemos destacar os parasitos de quirópteros. Dos 17 diferentes gêneros de parasitos já descritos da ordem Haemosporida, quatro infectam morcegos e raposas voadoras. Entretanto, apenas seis espécies de parasitos de morcegos foram descritas (Garnham 1966). Em 2013, Schaer et al. descreveu várias linhagens novas de hemosporídeos em morcegos africanos pertencentes aos gêneros *Plasmodium*, *Hepatocystis*, *Polychromophilus* e *Nycteria*.

Os mais comuns hemosporídeos que infectam quirópteros pertencem aos gêneros *Plasmodium*, *Hepatocystis*, *Polychromophilus* e *Nycteria*. Estes parasitos apresentam uma série de diferenças no ciclo e formas exoeritrocíticas as quais permitem sua distinção em nível de gênero e espécie. Contudo, as formas eritrocíticas são muito semelhantes, não permitindo a identificação precisa do parasito em exames simples de microscopia óptica (Garnham 1966). Em morcegos, a reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado ocorre apenas em células teciduais do parênquima hepático nos parasitos dos gêneros *Hepatocystis* e *Nycteria*. Para *Plasmodium*, a merogonia ocorre tanto no fígado como em eritrócitos, enquanto que os parasitos do gênero *Polychromophilus* podem infectar células mesodermiais de vários órgãos de seu hospedeiro, finalizando a fase exoeritrocítica nas células de kupffer no parênquima hepático (Garnham 1966). Acredita-se que os morcegos apresentem a maior variedade de hemosporídeos (Garnham 1966). Além disso, diversos estudos sobre hemosporídeos realizados em outros hospedeiros demonstram que os parasitos da ordem Haemosporida provocam efeitos negativos sobre a condição

fisiológica do hospedeiro (Asghar et al., 2015; Palinauskas et al., 2008). Estes parasitos podem reduzir a expectativa de vida, o sucesso reprodutivo e a sobrevivência de seus hospedeiros, além aumentar o estresse fisiológico e produção de hemácias (Asghar et al., 2015; De Angeli Dutra et al., 2017).

### **1.1.1 *Plasmodium***

Os parasitos do gênero *Plasmodium* estão entre os protozoários mais bem estudados atualmente. Neste gênero estão incluídos os parasitos responsáveis pela malária. A família Plasmodiidae é composta por aproximadamente 100 espécies capazes de infectar diferentes espécies de vertebrados, seus vetores são dípteros hematófagos (Diptera: Culicidae) dos quais destacam-se os gêneros, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* e *Culiseta* (Valkiūnas, 2005). Em mamíferos, ciclo do *Plasmodium* apresenta uma única passagem pelo fígado e seus principais vetores são culicídeos do gênero *Anopheles*.

O ciclo no vetor inicia-se com a formação do oocineto, esta forma parasitária é o produto da fertilização do macrogametócito pelo microgametócito no lúmen do intestino médio do vetor (Garnham 1966; Aly, Vaughan, and Kappe 2009). O oocineto é o único estágio invasivo que não é precedido por um passo de replicação e, portanto, os números de parasitos formados são um produto direto do número de eventos de fertilização (Aly et al., 2009). O parasito atravessa a camada de células epiteliais do intestino médio alcançando a lâmina basal. Este passo de invasão é acompanhado de uma elevada mortalidade do parasito como consequência da intervenção de mecanismos de proteção do hospedeiro (Garnham 1966; Aly, Vaughan, and Kappe 2009). Os oocinetos sobreviventes se tornam sesséis e se transformam em oocistos, uma forma arredondada e extracelular do parasito. Dentro do oocisto são formados centros germinativos, os quais culminarão na formação de esporozoítos pelo processo de esporogonia (Garnham 1966; Aly, Vaughan, and Kappe 2009). A esporogonia é um processo de replicação presente em muitos protozoários que culmina com a multiplicação parasitária e redução da carga genética diploide resultante da formação do oocisto para haploide (Garnham 1966; Valkiūnas 2005; Aly, Vaughan, and Kappe 2009). Após o término da esporogonia, o oocisto se rompe liberando os esporozoítos. Os esporozoítos caem na hemolinfa e migram

em direção a glândula salivar até alcançarem a membrana apical, onde se estabelecem por algumas semanas até serem expostos a hospedeiros susceptíveis (Garnham 1966; Aly, Vaughan, and Kappe 2009).

Durante o repasto sanguíneo, os esporozoítos deixam a glândula salivar do mosquito e alcançam infectam o hospedeiro vertebrado. Eventualmente, os parasitos conseguem chegar ao fígado, invadindo os hepatócitos (Garnham 1966; Aly, Vaughan, and Kappe 2009). A infecção hepática não resulta em patologia em mamíferos, entretanto leva a uma ampliação de 10 mil vezes o número de parasitos, ocasionando a liberação de inúmeros merozoítos exoeritrocíticos na corrente sanguínea, os quais infectam eritrócitos iniciando a fase eritrocítica da malária (Aly et al., 2009). Nesta fase, o parasito infecta hemácias e utiliza como recurso a hemoglobina. Os parasitos multiplicam-se dentro dos eritrócitos pelo processo de esquizogonia. Durante este processo, ocorre a expansão citoplasmática com posterior divisão dos núcleos e repartição do citoplasma, formando os merozoítos. Os merozoítos rompem a célula hospedeira, sendo liberados na corrente sanguínea e infectando novos eritrócitos. Alguns merozoítos podem se desenvolver em gametócitos, as formas reprodutivas do parasito (Garnham 1966).

### **1.1.2 *Hepatocystis***

O gênero *Hepatocystis* foi descrito em primatas, esquilos, morcegos e raposas voadoras apenas no velho mundo (África e Europa) com raros estudos conduzidos na América e Oceania (Garnham 1966). Estes parasitos distinguem-se do gênero *Plasmodium* e dos demais hemosporídeos de quirópteros em diversos aspectos do seu ciclo de vida. Em parasitos do gênero *Hepatocystis* a reprodução assexuada ocorre apenas no parênquima hepático do hospedeiro vertebrado, sendo encontradas na corrente sanguínea apenas as formas reprodutivas do parasito, os macro e microgametócitos (Garnham 1966). Os esquizontes exoeritrocíticos destes parasitos são semelhantes aos observados para parasitos do gênero *Plasmodium*. No entanto, os mesmos não alcançam a maturidade em poucas semanas. Em vez disso, os parasitos expandem-se em tamanho, produzem grandes vacúolos e eventualmente, unem-se em uma única estrutura, produzindo um grande cisto preenchido com fluido coloidal e envolto por uma margem

de merozoítos (Garnham 1966). Esta estrutura de aproximadamente dois mm de diâmetro é conhecida como merocisto. Quando maduros, os merozoítos são liberados nos capilares sinusoides do fígado, invadem os eritrócitos e desenvolvem-se em gametócitos. Alguns poucos merozoítos reinvadem as células parenquimáticas do fígado mantendo ciclos secundários de esquizogonia exoeritrocítica (Garnham 1966). Em *Hepatocystis*, a esporogonia ocorre em moscas do gênero *Culicoides* e difere-se dos demais parasitos da ordem Haemosporida pelo fato do oocineto penetrar na parede do intestino médio do vetor e encistar na cabeça e tórax do mesmo.

### **1.1.3 *Polychromophilus***

Os parasitos do gênero *Polychromophilus* foram os primeiros hemosporídeos descritos em morcegos, sendo encontrados em inúmeros estudos na Europa e Oriente Médio desde 1899 (Garnham 1966). A esquizogonia ocorre, inicialmente, nas células mesodermiais de vários órgãos do hospedeiro vertebrado até alcançar as células de Kupffer do fígado na forma de múltiplos e pequenos esquizontes. Estes esquizontes são transitórios, reaparecendo durante relapsos periódicos da infecção (Garnham 1966). Após o ciclo exoeritrocítico, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea, invadindo os eritrócitos e desenvolvendo-se em gametócitos. Em *Polychromophilus*, a esporogonia é semelhante àquela presente em outros parasitos da ordem Haemosporida. Os oocistos desenvolvem-se no intestino médio do vetor, formam os esporozítos que invadem a glândula salivar. Estes parasitos realizam seu ciclo sexuado em moscas nycteribiíidas, ectoparasitos ápteros de morcegos (Garnham 1966). Estes são os únicos parasitos já descritos em morcegos do Brasil (Garnham et al., 1971).

### **1.1.4 *Nycteria***

O gênero *Nycteria* foi descrito apenas em morcegos insetívoros da África. Entretanto, acredita-se que esteja presente também em outras partes do globo, cobrindo,

pelo menos, a Malásia e outras partes do Oriente (Garnham 1966). Este parasito pode ser facilmente identificado pela ocorrência de peculiares esquizontes lobulados no fígado com menos de 100um em tamanho e nenhuma tendência à formação de merocistos (Garnham 1966). A esquizogonia ocorre apenas no parênquima hepático, sendo muito semelhante à observada para *Plasmodium*. Na corrente sanguínea são observadas apenas as formas reprodutivas do parasito, os gametócitos. Muito pouco se sabe sobre os parasitos deste gênero (Garnham 1966).

## 1.2 Quirópteros no Brasil

A ordem Chiroptera é a segunda mais diversa ordem de mamíferos, representando cerca de 22% das espécies já descritas para esta taxa (Reis et al., 2007). Com mais de 1100 espécies, a ordem Chiroptera é dividida em dois grandes grupos, os Megachirópteros, representados pelas raposas voadoras e os Microchirópteros, representados pelos morcegos (Reis et al., 2007). A maior diversidade de morcegos encontra-se no Neotrópico, com 288 espécies distribuídas em 83 diferentes gêneros (Mickleburgh et al., 2002). No Brasil, já foram descritas 178 espécies de morcegos classificadas em 65 gêneros e nove famílias, os morcegos no Brasil representam aproximadamente 25% das espécies de mamíferos brasileiras (Nogueira et al., 2014). Ademais, o Brasil apresenta a segunda maior riqueza de morcegos do mundo, atrás apenas da Indonésia, a qual possui 175 espécies de morcegos descritas (Mickleburgh et al., 2002). A grande diversidade de morcegos brasileiros encontra-se dentro da família Phyllostomidae, típica do Neotrópico. Os morcegos da família Phyllostomidae são caracterizados pela presença da folha nasal na extremidade do focinho (Reis et al., 2007). O Cerrado apresenta registros de 101 espécies de morcegos, o que representa mais de 50% das espécies listadas para o Brasil (Paglia et al., 2012).

Os morcegos podem apresentar também numerosas populações de ectoparasitos, dos quais podemos citar carrapatos, ácaros, parasitos internos e moscas, algumas delas já descritas como vetores de hemosporídeos. Outrossim, os morcegos constituem um dos grupos de mamíferos com maior diversidade de hábitos alimentares, sendo possível encontrá-los em praticamente todos os níveis tróficos e em diversos ambientes (Reis et

al., 2007). Em relação a sua importância biológica, podem desempenhar diversos papéis dentro de um ecossistema, atuando como polinizadores e dispersores de sementes sendo que 25% das espécies de árvores neotropicais são dispersas por morcegos. Além disso, os morcegos controlam populações de insetos. Calcula-se que algumas espécies do gênero *Myotis* podem capturar mais de 500 insetos por hora, eliminando e reduzindo populações de importantes pragas agrícolas e insetos transmissores de patógenos (Kunz et al., 2011; Reis et al., 2007).

## 2- Introdução

Os hemosporídeos apresentam ampla distribuição geográfica e sua ampla variedade de espécies hospedeiras fazem deles excelentes modelos para explorar a dinâmica ecológica e evolutiva das associações parasito-hospedeiro (Marzal, 2012). Esta interação parasito-hospedeiro tem sido muito utilizada em estudos ecológicos após o desenvolvimento das técnicas moleculares (Marzal, 2012). Muitos estudos tentam correlacionar a presença destes hemosporídeos a características ambientais, efeitos da sazonalidade e de diferentes espécies de hospedeiros (Belo et al., 2011; Braga et al., 2011).

Para patógenos transmitidos por vetores, como os hemosporídeos, os efeitos da sazonalidade podem atuar em sua ocorrência devido às variações anuais de temperaturas e precipitação. O aumento da temperatura promove o aumento do metabolismo e o encurtamento de gerações em insetos, enquanto que a maior precipitação aumenta o número de locais disponíveis para desova. Assim, favorecendo o crescimento das populações de dípteros vetores. A maior abundância de vetores presente em épocas chuvosas promove maior contato entre hospedeiros e vetores, aumentando assim as chances de infecção (Okanga et al., 2013). Ademais, para aves já é conhecido que a infecção por hemosporídeos também pode variar sua ocorrência em espécies de diferentes grupos taxonômicos (Valkiūnas, 2005) e reduzir a sobrevivência, aptidão e condição corporal de seus hospedeiros (Marzal, 2012; Valkiūnas, 2005). Aves infectadas por hemosporídeos podem apresentar uma série de patologias ocasionadas pela presença do parasito, tais como: hepato e esplenomegalia, aumento do stress fisiológico e anemia (Valkiūnas, 2005). Apesar de existirem inúmeros estudos com hemosporídeos de aves silvestres, poucos estudos retratam a infecção por hemosporídeos em mamíferos silvestres.

Dentre os mamíferos, os parasitos da ordem Haemosporida infectam principalmente primatas, roedores e quirópteros. Os morcegos são um modelo muito interessante para estudos com parasitos e outros agentes patogênicos uma vez que mais de 200 vírus já foram isolados ou detectados em morcegos, como três tipos de Hepacivirus (Moratelli and Calisher, 2015). Além disso, comumente apresentam ectoparasitos como moscas, carrapatos e ácaros muitos espécie-específicos (Nava et al., 2010; Reis et al., 2007). Outro

ponto a ser ressaltado é a falta de estudos parasitológicos com morcegos (Reis et al., 2007). A ordem Chiroptera apresenta uma grande diversidade de hemosporídeos, sendo hospedeira de pelo menos nove dos 17 diferentes gêneros descritos (Garnham 1966). Não obstante, existe uma vasta lacuna de conhecimento a respeito destes parasitos, especialmente no novo mundo. No Brasil, existem apenas dois estudos com hemosporídeos de morcegos, sendo relatado parasitos do gênero *Bioccala* e *Polychromophilus* em *Myotis nigricans* coletados no (Garnham et al., 1971).

O estudo dos parasitos ou outros patógenos de morcegos são muito interessantes em virtude da importância epidemiológica destes animais na transmissão de diversas doenças para o homem, como a raiva (Moratelli and Calisher, 2015). Além disso, trabalhos ecológicos que tenham como alvo de estudo a relação entre morcegos e seus parasitos também podem fornecer conhecimento para planos de controle de doenças relacionadas ou transmitidas por morcegos. Neste contexto, minhas hipóteses são que a ocorrência de hemosporídeos distingue-se entre estações do ano e espécies dos animais. Além disso, morcegos infectados também devem apresentar menor condição corporal quando comparados a animais negativos. Assim, este estudo objetivou avaliar, caracterizar molecular e morfológicamente hemosporídeos em quirópteros, a fim de agregar conhecimento para a compreensão da dinâmica ecológico-evolutiva e de transmissão parasito-hospedeiro dentro deste sistema complexo e ainda pouco compreendido.

### **3- Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar a ocorrência e caracterizar morfológicamente os hemosporídeos que infectam morcegos brasileiros.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Verificar a ocorrência de infecção e caracterizar morfológicamente os hemosporídeos que infectam morcegos da região de Montes Claros;
2. Relacionar ocorrência de parasitos encontrados com aspectos taxonômicos e ecológicos dos animais coletados.



## 4- Métodos

### 4.1 Coleta dos morcegos

No período de abril de 2014 a abril de 2015, foram capturados 247 morcegos em campanhas mensais com rede de neblina, município de Montes Claros (MG), o qual está localizado na latitude 16° 43' 41", longitude 43° 51' 54" e altitude de 638 metros. Os animais foram coletados em dois bairros dentro da cidade de Montes Claros, um mais urbanizado (Vila Luiza) e outro menos urbanizado (Nossa Senhora das Graças) e em dois parques, um deles mais preservado (Parque Estadual da Lapa Grande) e outro menos preservado (Parque Municipal da Sapucaia) (Figura 1). Todos os morcegos capturados com uso de rede de neblina foram classificados de acordo com o sexo, a guilda alimentar, peso (g), tamanho do antebraço (mm) e presença ou ausência de ectoparasitos. Os morcegos foram identificados em nível de espécie. Além disso, foram confeccionados esfregaços sanguíneos e de fígado para diagnóstico de hemosporídeos em laboratório. O sangue foi coletado por punção cardíaca. Todos os animais foram eutanasiados com superdosagem do anestésico Cloridrato de Ketamina por via intramuscular no músculo peitoral.

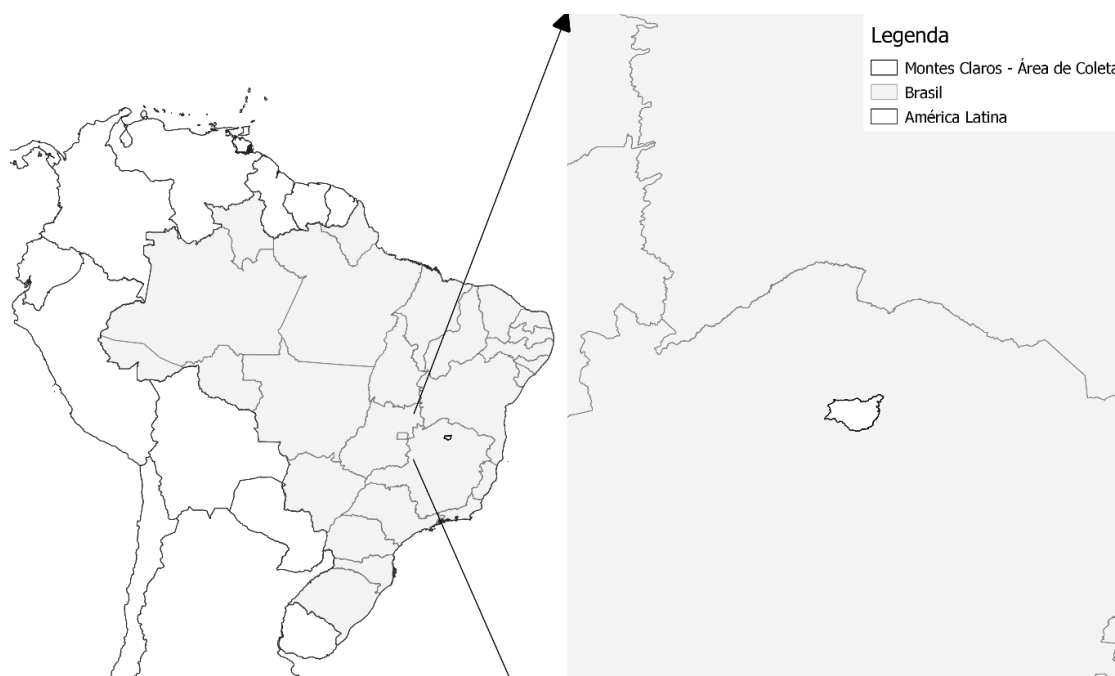
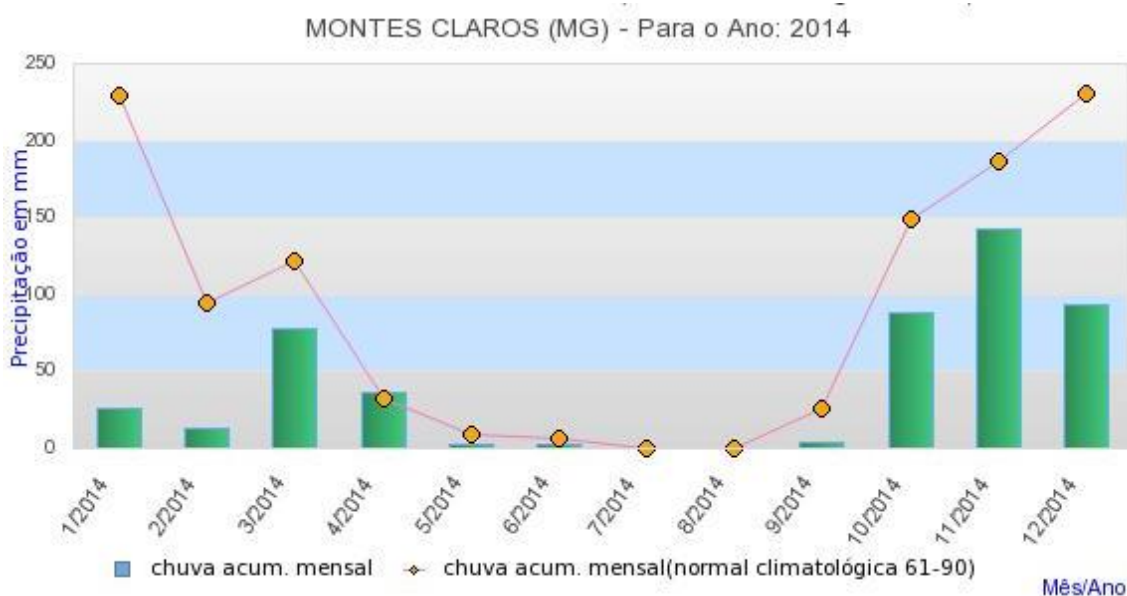


Figura 1: Mapa da área de coleta

Os procedimentos foram realizados conforme os princípios éticos da experimentação animal, sendo o projeto aprovado pelo CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG sob o protocolo 333 / 2013. A licença de coleta e sacrifício dos morcegos foi fornecida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob o registro 41709-1 em nome da titular Thallyta Maria Viera, assim como a licença de coleta e captura de morcegos em caverna com número de registro 41245-1. As autorizações para as coletas nos parques estadual e municipal foram fornecidas pelo Instituto Estadual de Florestas de MG (012/2014) e pela Secretaria Adjunta do Meio Ambiente de Montes Claros, respectivamente.

Durante o período de coleta foi registrada elevada variação na chuva acumulada mensal (Figura 1). Sendo a época chuvosa iniciada em outubro e finalizada em abril. Os meses de maior precipitação foram novembro de 2014 e março e fevereiro de 2015. As temperaturas médias apresentaram um pequeno declínio nos meses da estação seca ao longo deste período (Figura 2).



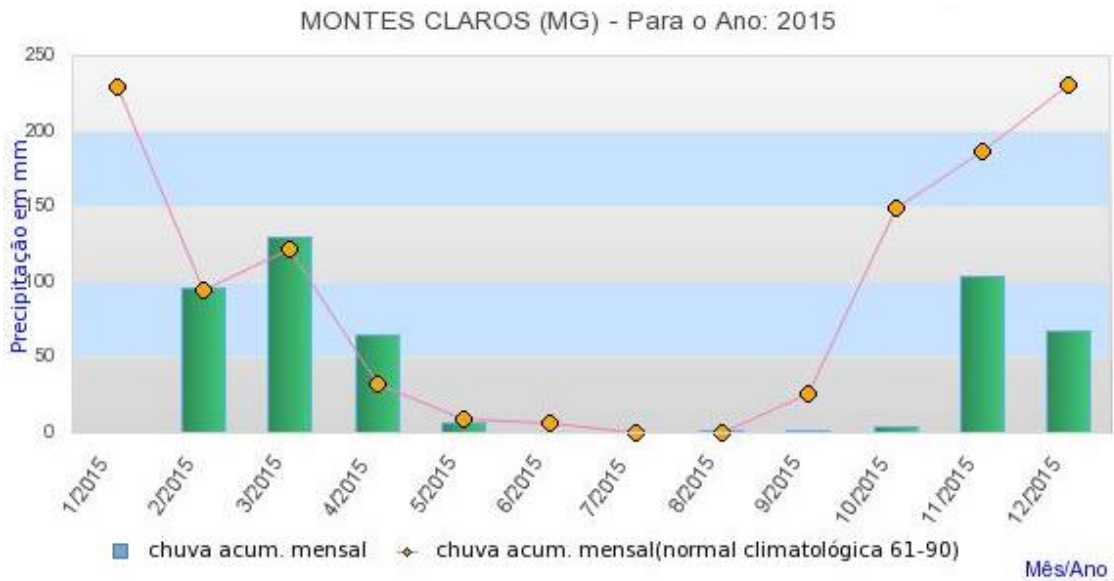


Figura 2: Chuva acumulada mensal (normal climatológica 61-90) na cidade de Montes Claros, MG, nos anos de 2014 e 2015.

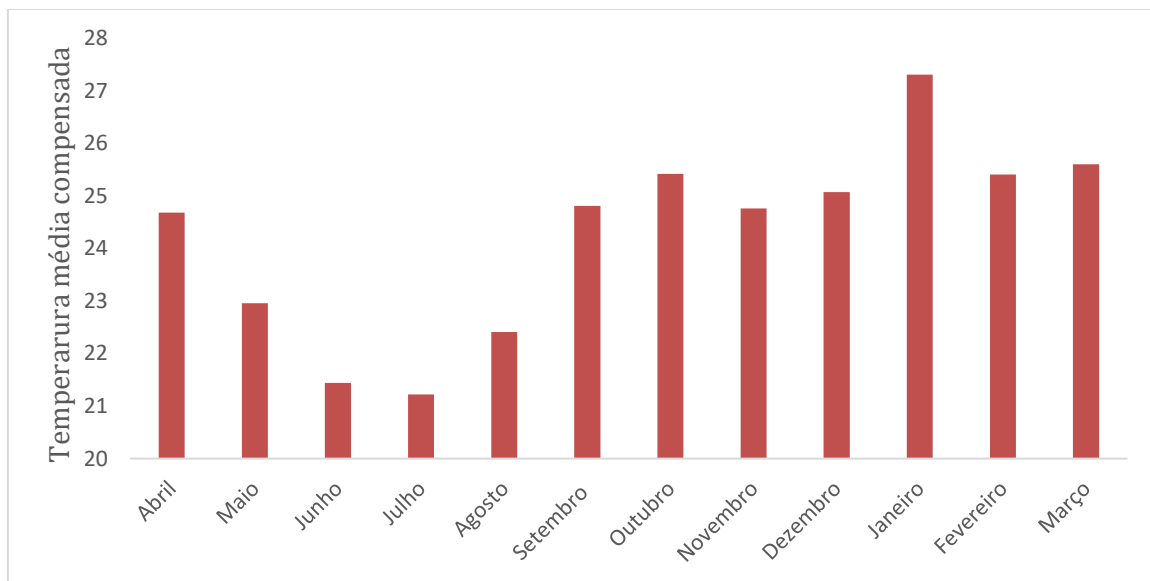


Figura 3: Temperatura média compensada entre abril de 2015 e março de 2015 para o município de Montes Claros, MG.

#### 4.2 Diagnóstico por microscopia e registro fotográfico dos parasitos

Dentre os 247 esfregaços sanguíneos disponíveis para análise, 208 foram considerados viáveis para análise por microscopia óptica. Com o objetivo de realizar o

diagnóstico morfológico dos hemoparasitos dos morcegos amostrados os esfregaços sanguíneos foram analisados utilizando-se microscópio de luz (microscópio: Olympus CX 31, Olympus®, Tokio, Japão). Para cada esfregaço foram observados 50 campos sob aumento de 400 vezes e 200 campos sob aumento de 1000 vezes para diagnóstico de hemosporídeos e demais hemoparasitos, seguindo método descrito por Valkiunas (2005). Todos os parasitos encontrados em microscopia óptica foram registrados em foto por meio do Q-Capture Pro7 imaging software (QImaging, Surrey, Canada). Após diagnóstico dos hemosporídeos, as lâminas de fígado dos animais positivos foram analisadas (Anexo 2).

### **4.3 Diagnóstico molecular da infecção por hemosporídeos**

A fim de contribuir para a identificação dos possíveis hemosporídeos que infectam morcegos no Brasil, objetivamos testar por diferentes protocolos de amplificação de DNA mitocondrial de hemosporídeos. Ademais, amplificação de DNA ribossomal dos parasitos também foi realizado a fim de aumentar a precisão do diagnóstico de infecção.

#### **4.3.1 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue utilizando-se método de extração com fenol-clorofórmio e apenas para amostras de 247 morcegos. Para tal, de 10-50uL de sangue de cada morcego foi submetido a incubação com 250uL de proteinase K por no mínimo 18 horas a 60°C. Os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados rapidamente. Após a homogeneização receberão 125µL de fenol (pH 8,0) associado a 125µL de clorofórmio para solubilização das proteínas. Novamente as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13200 rpm por 6 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Então, foi adicionado 300uL de clorofórmio-alcoolisoamílico 24:1. Os tubos foram centrifugados por 6 minutos, sendo então coletada e descartada a fase de baixo. Foi acrescentado então, 300uL de clorofórmio PA, os tubos novamente foram centrifugados a parte de baixo coletada. Neste próximo passo, foi adicionado 600 µL de isopropanol em cada amostra e estas logo em seguida foram centrifugadas por 20 minutos a 13200 rpm. Após a centrifugação, o isopropanol foi descartado e o excesso foi retirado e escorrido em papel

toalha. A fim de retirar possíveis resquícios de isopropanol, cada amostra receberá 500 µL de álcool 70%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 20 minutos a 13200 rpm. Após a centrifugação, os tubos foram colocados em estufa a 37°C para secar o álcool. Para a ressuspensão do DNA adicionar-se-á a cada amostra 40 µL de água ultrapura (miliq); as amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C por uma hora e então conservadas no freezer (-20°C). A extração de DNA foi realizada apenas para 248 morcegos, as demais amostras foram obtidas no banco de DNA do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e já se encontravam extraídas.

#### **4.3.2 Diagnóstico molecular de hemosporídeos (PCR-Polymerase chain reaction)**

As amostras de DNA foram analisadas molecularmente utilizando a reação de polimerase em cadeia (PCR), conforme descrito por Fallon et al. 2003. Essa reação amplifica um fragmento altamente conservado da região mitocondrial SSU dos parasitos da ordem Haemosporida. Foram utilizados como controles positivos para as reações: *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum*. A PCR foi realizada utilizando os seguintes iniciadores:

343 F: 5'GCTCACGCATCGCTTCT3'

496 R: 5'GACCGGTCATTTTCTTTG3'

Além de 0,4mM de cada iniciador adicionar-se-á em todos os tudo de microcentrífuga: 200uL 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl (PHONEUTRIA®), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTP's, 0,5 U Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA®), e água ultrapura estéril. A reação de amplificação constitui-se em 35 ciclos 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 ocorre a 94°C por 2 minutos. Seguir-se-á a extensão final a 72°C por três minutos e manutenção da temperatura de 4°C, definindo, assim, a finalização da reação. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante em tampão TBE-1X. Após a corrida das amostras, o gel foi fixado em álcool etílico 10% e ácido acético 0,5% por 10 minutos, corado por

nitrato de prata durante 15 minutos e revelado em formaldeído e hidróxido de sódio (Sanguinetti et al., 1994)

#### **4.4 Análise da diversidade de hemosporídeos**

##### **4.41 PCRs para sequenciamento**

As amostras positivas na PCR de diagnóstico foram selecionadas para sequenciamento e submetidas a cinco PCRs descritas por Perkins and Schall 2002 e Schaer et al. 2013. Essas reações amplificam uma região conservada do gene mitocondrial Citocromooxidase subunidade B (Cyt-B) e uma região conservada do gene mitocondrial CLPC, uma das subunidades de ligação de ATP da protease Clp ATP-dependente (tabela 1). Foram utilizados como controles positivos para as reações: *Plasmodium gallinaceum*, *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum*. O produto das PCRs foi corrido em eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante em tampão TBE-1X. Após a corrida das amostras, o gel foi fixado em álcool etílico 10% e ácido acético 0,5% por 10 minutos, corado por nitrato de prata durante 15 minutos e revelado em formaldeído e hidróxido de sódio (Sanguinetti et al., 1994).

##### **4.5.1.1 PCR com os primers DW2/DW4 e DW1/DW3**

Essa reação amplifica uma região conservada do gene mitocondrial citocromooxidase subunidade C (Cyt-B). Foram utilizados os seguintes primers:

DW2 (5-TAA TGC CTA GAC GTA TTC CTG ATT ATC CAG-3)

DW4 (5-TGT TTG CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG-3)

DW1 (5-TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG-3)

DW3 (5-TGC TGT ATC ATA CCC TAA AG-3)

A primeira PCR foi realizada em volumes de 25 uL, que incluem 50 ng de ADN genômico total, a 2,00 mM de cada trifosfato de desoxinucleótido, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 13

PCR (AppliedBiosystem, Foster City, Califórnia), 0,75 mM de cada primer (DW2 e DW4), e 0,5 unidades de ADN-polimerase Taq. Foram utilizados 2 uL da primeira reação de PCR como molde para a segunda PCR. A segunda reação utiliza todos os reagentes nas mesmas proporções da PCR inicial exceto pelos primers, utilizando-se na segunda reação DW1 e DW3.

#### **4.5.1.2 PCR com os primers 3932F/DW4, DW2/3932R e HepF3/HepR3**

As reações amplificam uma região conservada do gene mitocondrial Citocromooxidase subunidade C (Cyt-B). Foram utilizados os seguintes primers:

DW2 (5 - TAATGCCTAGACGTATTCCTGATTATCCAG – 3)

DW4 (5 – TGTTTGCTTGGGAGCTGTAATCATAATGTG – 3)

3932F (5 - GGGTTATGTATTACCTTGGGGTC – 3)

3932R (5 – GACCCCAAGGTAATACATAACC – 3)

HepF3 (5 – CTTACCTTGGGGACAAATGAGTTATT – 3)

HepR3 (5 – CTCTAGCACCAAATGTCATTTTAAATTG – 3)

A PCR foi realizada em volumes de 25 uL, que incluem 50 ng de ADN genômico total, a 2,00 mM de cada trifosfato de desoxinucleótido, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 13 PCR (AppliedBiosystem, Foster City, Califórnia), 0,75 mM de cada primer (DW4/3932F, DW2/3932R e HepF3/HepR3), e 0,5 unidades de ADN-polimerase Taq.

#### **4.5.1.3 PCR com os primers clpcoutF/outR e clpcinF/ inR**

A reação amplifica uma região conservada do gene CLPC, uma das subunidades de ligação de ATP da protease Clp ATP-dependente. Foram utilizados os seguintes primers:

clpcoutF (5 – GGTAAAACTGAATTAGCAAAAATATTA – 3)

clpcoutF (5 – GGACGAGCTCCATATAAAGGAT – 3)

clpcinF (5 – TTAGCTAAACAATATTTGGTTCTG – 3)

clpcinR (5 – GAGCTCCATATAAAGGATTATAA – 3)

A primeira PCR foi realizada em volumes de 25 uL, que incluem 50 ng de ADN genômico total, a 2,00 mM de cada trifosfato de desoxinucleótido, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 13 PCR (AppliedBiosystem, Foster City, Califórnia), 0,75 mM de cada primer (clcpouF/ouR), e 0,5 unidades de ADN-polimerase Taq. Foram utilizados 2 uL da primeira reação de PCR como molde para a segunda PCR. A segunda reação utiliza todos os reagentes nas mesmas proporções da PCR inicial exceto pelos primers, utilizando-se na segunda reação os primers clpcinF/ inR.

Tabela 1: Programa de amplificação para sequenciamento.

<b>Gene</b>	<b>Iniciadores</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Ciclo</b>	<b>Alongamento</b>
Cyt-B	DW2/DW4	4 min 94°C	35 x (94°C 1min + 55°C 15s + 68°C 1.15min)	10 min 68°C
Cyt-B	DW1/DW3	4 min 94°C	40 x (94°C 1min + 55°C 15s + 68°C 1.15min)	10 min 68°C
Cyt-B	3932F/DW4	4 min 90°C	35 x (90°C 1min + 48°C 15 s + 68°C 1 min)	10 min 68°C
Cyt-B	DW2/3932R	4 min 90°C	35 x (90°C 1min + 48°C 15 s + 68°C 1 min)	10 min 68°C
Cyt-B	HepF3/HepR3	4 min 90°C	35 x (90°C 1min + 48°C 15 s + 68°C 1 min)	10 min 68°C
CLPC	clpcoutF/outR	4 min 94°C	35 x (94°C 20s + 50°C 20 s + 68°C 1 min)	7 min 68°C
CLPC	clpcinF/ inR	1 min 94°C	40 x (94°C 30s + 56°C 30 s + 68°C 30s)	10 min 68°C



#### **4.5.2 Purificação do produto da Nested-PCR**

As amostras positivas para as PCR de identificação de parasitos foram submetidas ao processo de purificação que possui como finalidade remover impurezas da reação de PCR e bandas inespecíficas com peso molecular abaixo de 400pb. Ao produto da PCR foi adicionada a mesma quantidade em PEG (polietilenoglicol 20%), incubou-se os tubos por 15 minutos a 37° C. Após a incubação, os tubos foram submetidos à centrifugação para remoção do sobrenadante. Em seguida, foi adicionado etanol 80% às amostras. Ao final da purificação, o DNA purificado foi ressuspensionado em água ultrapura (milliq).

As amostras que apresentaram amplificação de fragmentos inespecíficos foram submetidas a outro protocolo de purificação. O produto amplificado foi marcado com fluorescência e corrido em gel de agarose 1,5% por cerca de 40 minutos a 100 v de potência, a fim de separar o fragmento alvo. Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e o fragmento alvo foi cortado e extraído com Kit PROMEGA segundo protocolo do fabricante.

#### **4.5.3 Reação de sequenciamento e precipitação**

O DNA já purificado passará por uma reação de sequenciamento pelo método de dideoxinucleotídeos em sequenciador automático capilar ABI 310. Foi utilizado na reação BygDyeTerminator Mix seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante (Applied Biosystems). Foi aplicado de 1,5 à 4uL de cada amostra purificada na reação juntamente com 1uL de cada primer, 1,5uL de tampão, 1uL de BygDyeTerminator Mix e água suficiente para completar o volume final de 10uL. A reação de sequenciamento seguirá os seguintes passos: 1 minuto a 94° C antes da reação cíclica, a qual se constituirá de 35 ciclos de 15 segundos a 96° C, 15 segundos a 50° C e 4 minutos a 60° C. Após a reação cíclica as amostras foram mantidas a 60° C por 4 minutos. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado utilizando-se mix de etanol e acetado de sódio 2,5M. O produto da reação foi ressuspensionado em 10uL de formamida. O processo de eletroforese capilar foi realizado na plataforma de sequenciamento do Instituto de Pesquisa Rene Rachou – Belo Horizonte, MG.

#### **4.5.4 Edição das sequências e análises filogenéticas**

A qualidade, o alinhamento e a edição dos eletroferogramas foram realizados no programa ChromasPro 2.1.5. As sequências obtidas seriam comparadas com aquelas presentes em bancos de dados de livre acesso, tal como o GenBank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>) e o MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>).

#### **4.5 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa R versão 3.4. Com o objetivo de avaliar se há diferença na ocorrência de hemosporídeos entre época de coleta e as espécies de morcegos coletas foi realizado um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição quasibinomial. A condição corporal dos morcegos foi analisada por meio de uma análise de covariância (ANCOVA) entre a relação peso/antebraço de animais infectados e não-infectados. Integrou-se à esta análise a espécie e o sexo dos animais para descartar o seu efeito na relação peso/antebraço. O valor foi considerado significativo se  $P < 0,05$  e o número mínimo de indivíduos por categoria foi 10.

## 5- Resultados

### 5.1 Ocorrência e diagnóstico microscópico de hemosporídeos e outros hemoparasitos

Para estimar a ocorrência de hemosporídeos em morcegos foram considerados 208 espécimes, sendo estes os 208 indivíduos com esfregaços viáveis (tabela 2). A ocorrência de hemosporídeos para os morcegos deste estudo foi de 6,44% (13/208), considerando o diagnóstico por microscopia e biologia molecular. Em microscopia foram observados parasitos em 12 lâminas, enquanto que em diagnóstico molecular apenas cinco amostras demonstraram-se positivas. Após padronização das PCRs de identificação dos parasitos, foi observado que nenhuma amostra positiva foi amplificada ou gerou sequências confiáveis para identificação dos parasitos presentes em morcegos em nenhum dos métodos descritos.

As espécies com maior amostragem neste estudo foram *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Platyrrhinus lineatus* e *Myotis nigricans* com 54, 41, 33 e 18 indivíduos coletados. Dentre as espécies de morcegos avaliadas, as que apresentaram maiores prevalência de hemosporídeos são *Sturnira lilium*, *Myotis nigricans* e *Glossophaga soricina* com 33,34; 23,07 e 14,28% respectivamente. Dentre as espécies com ausência de infecções por hemosporídeos, podemos destacar *Platyrrhinus lineatus* cujos 33 espécimes coletados encontraram-se negativos (tabela 2).

Tabela 2: Espécies de morcegos amostradas no estudo. Estão representados os dados de número de indivíduos coletados por época do ano, sexo, diagnóstico de hemosporídeos e a ocorrência.

Espécie	Época		Sexo		Hemosporídeos		Prev (%)
	Chuvosa	Seca	Fêmea	Macho	Positivo	Negativo	
<i>Anoura caudifer</i>	0	1	1	0	0	1	0
<i>Anoura geoffroyi</i>	4	1	2	3	0	5	0
<i>Artibeus lituratus</i>	35	19	17	37	3	51	5,55

<i>Artibeus planirostris</i>	27	14	12	29	1	40	2,44
<i>Carollia persipilata</i>	14	10	6	18	2	22	8,33
<i>Chiroderma villasum</i>	1	0	0	1	0	1	0
<i>Chrotopterus auritus</i>	0	1	1	0	0	1	0
<i>Dermanura cinerea</i>	1	0	1	0	0	1	0
<i>Desmodus rotundus</i>	6	4	1	9	1	9	10
<i>Glossophaga soricina</i>	4	10	8	6	2	12	14,28
<i>Glyphonycteris behni</i>	1	0	1	0	0	1	0
<i>Lasiurus blossevilli</i>	0	1	0	1	0	1	0
<i>Micronycteris megalotis</i>	1	0	1	0	0	1	0
<i>Molossus molossus</i>	2	0	1	1	0	2	0
<i>Myotis nigricans</i>	8	5	4	8	3	10	23,07
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	16	17	16	17	0	33	0
<i>Sturnira lilium</i>	3	0	1	2	1	2	33,34

O diagnóstico por microscopia dos hemoparasitos de morcegos permitiu a observação de todas as formas eritrocíticas presentes em parasitos da ordem Haemosporida (trofozoíto, meronte e gametócito, Figura 6). Entretanto, em nenhum espécime foram observadas todas as formas eritrocíticas destes hemoparasitos. Observou-se majoritariamente (10 em 13), infecções com baixas parasitemias (<1%). Das 12

lâminas positivas para hemosporídeos, em cinco observou-se apenas a forma de gametócito, sendo um único parasito observado para uma das lâminas.

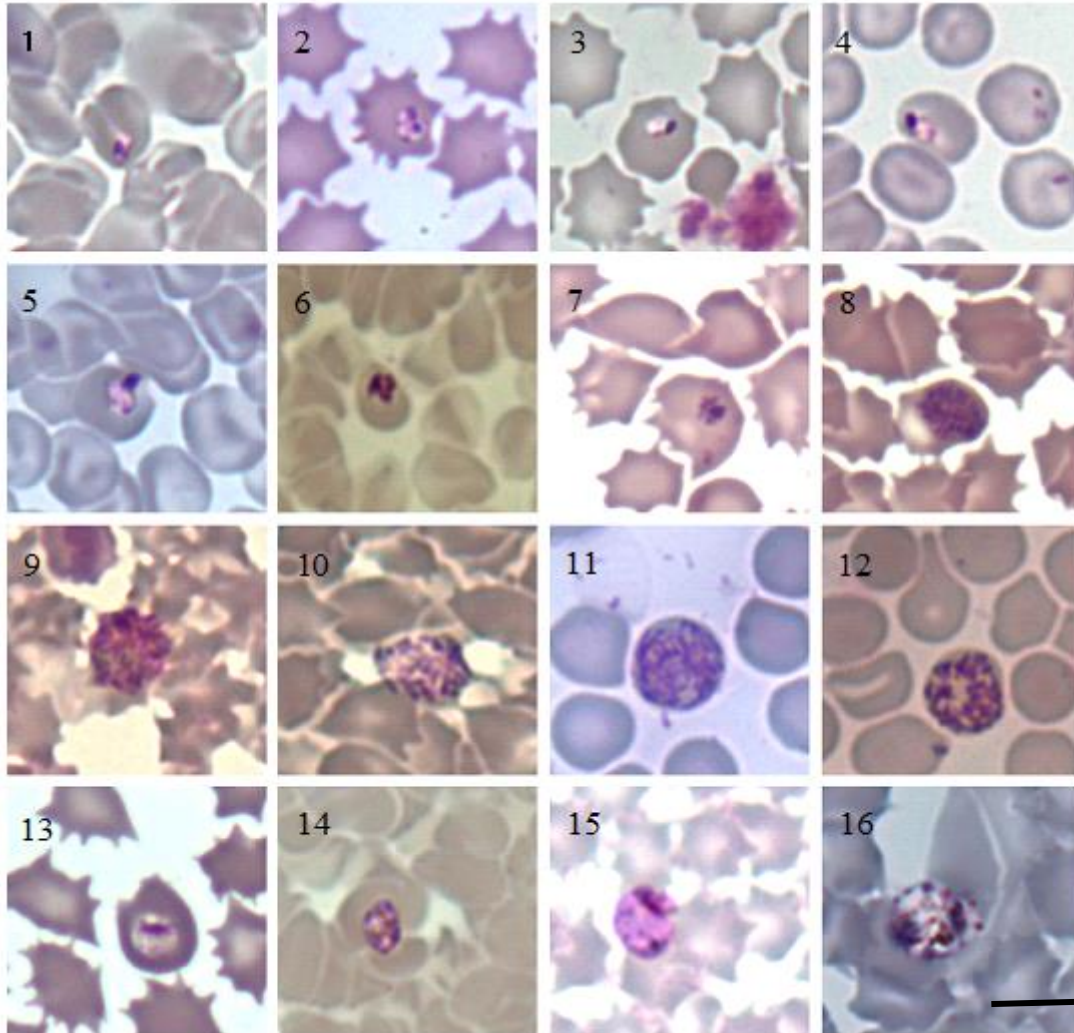


Figura 4: Formas de parasitos da ordem Haemosporida encontrados em morcegos brasileiros. Nas imagens 1-5 estão representados trofozoítos, nas imagens 6-12 estão representados merontes e nas imagens 13-16 estão representados gametócitos. Barra mede 10 $\mu$ m.

Além disso, também foram observados filarídeos em oito morcegos, representando uma ocorrência de 3,84% (8/208, Figura 7), sendo um animal positivo para hemosporídeos e filarídeos. Os microfilarídeos foram encontrados nas espécies *Artibeus planirostris*, *Anoura geoffroyi*, *Carollia persipilata*, *Desmodus rotundus* e *Glossophaga soricina*. Foram caracterizados três morfotipos coletados em três diferentes espécimes.

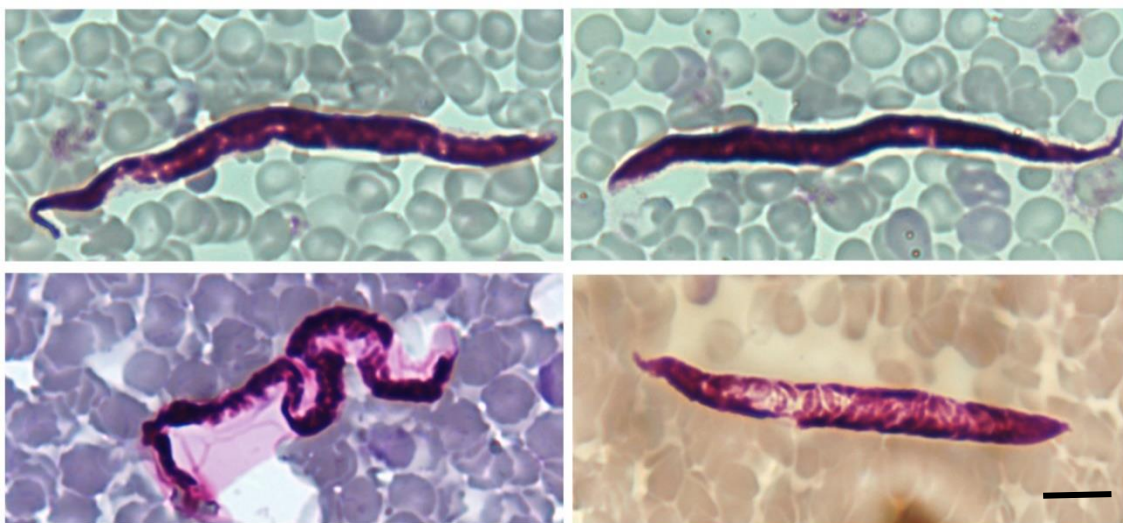


Figura 5: Formas de parasitos filarídeos encontrados em morcegos do brasileiros. Em todas as imagens estão representados formas jovens imaturas dos parasitos. Barra mede 10 $\mu$ m.

## 5.2 Descrição Morfológica dos Hemosporídeos

Dentre os parasitos observados, quatro morfotipos se destacam por apresentarem maior ocorrência entre os morcegos ou maior parasitemia, permitindo melhor caracterização morfológica.

**Morfotipo 1:** Os hemoparasitos classificados como morfotipo 1 apresentaram, em sua maioria, trofozoítos (Figura 7). Todos os trofozoítos observados apresentaram grandes vacúolos e núcleos proeminentes na periferia do parasito (Figura 7 A, B). Em um espécime, foi observado um esquizonte (Figura 7C). Os parasitos do morfotipo 1 foram observados em três animais diferentes e apresentam morfologia semelhante à apresentada por parasitos do gênero *Plasmodium*.

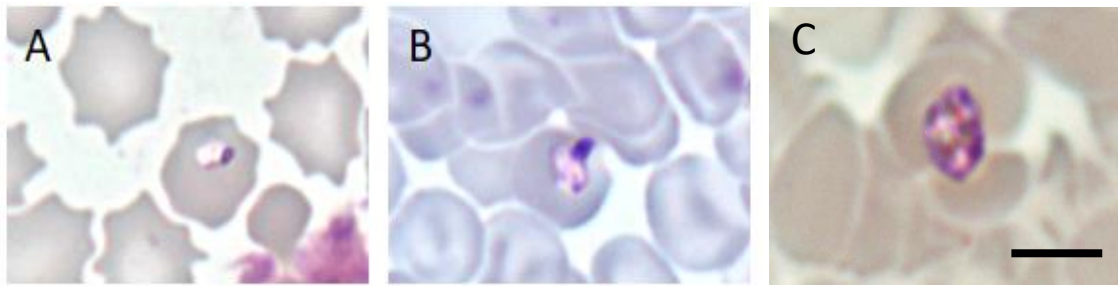


Figura 6: Formas Haemosporidianas de morcegos encontradas no Brasil. Nas imagens A-B estão representados os trofozoítos e na imagem C um esquizonte. Barra mede 10µm.

**Morfotipo 2:** Os parasitas classificados como morfotipo 2 foram encontrados em um único indivíduo de *Carollia persipilata* (Figura 2). As formas de esquizontes e gametócitos foram observadas para este parasita. Os esquizontes têm citoplasma escasso e podem ter muitos núcleos pequenos (mais de 30) quando maduros (Figura 2B). Quando jovens, os esquizontes têm uma conformação semelhante à dos esquizontes maduros, mas a quantidade de núcleos presentes é reduzida (Figura 2A). Os gametócitos são pequenos, arredondados e têm um citoplasma claro com um núcleo claro de cor rosa (Figura 2C). Esses parasitos possuem caracteres morfológicos incompatíveis com outros gêneros descritos para morcegos (Landau et al., 1984, Landau et al., 1995, Garnham 1973, Garnham 1966). Entre as características que distinguem esse morfotipo dos demais parasitos de Chiroptera estão a presença de esquizontes, característica encontrada apenas nos parasitos do gênero *Plasmodium* (Landau et al., 2005; Landau et al., 1984, Landau e Chavatte 2015, Garnham 1966). No entanto, ao contrário do *Plasmodium* spp. geralmente encontrados em mamíferos, esses parasitos apresentam esquizontes maduros com muitos (> 30) núcleos e ausência de pigmento.



Figura 7: Formas de parasitos da ordem Haemosporida encontrados em *Carollia persipilata*. Nas imagens 1-2 estão representados merontes e na imagem C está representado um gametócito. Barra mede 10µm.

**Morfotipo 3:** O morfotipo três apresenta esquizontes e gametócitos observados em três morcegos das espécies *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus* (Figura 3). O gametócito apresenta citoplasma granular com coloração rósea e ausência de pigmento, quando maduro, ocupa todo o citoplasma celular com expansão do citoplasma da célula hospedeira (Figura 3A). Os esquizontes maduros têm núcleos grandes e bem diferenciados (Figura B, C). Esses parasitas possuem caracteres morfológicos incompatíveis com outros gêneros descritos em Chiroptera (Garnham, 1966; Landau et al., 1984, Landau and Chavatte, 2015). No entanto, o gênero de parasitas cujas características morfológicas mais se assemelham àquelas observadas para este morfotipo é o gênero *Plasmodium*, que apresenta esquizogonia eritrocítica e cujos gametócitos também podem ter aparência granular, como observado em *Plasmodium vivax*. A principal característica que distingue este parasita do Plasmodio é a ausência de pigmento.

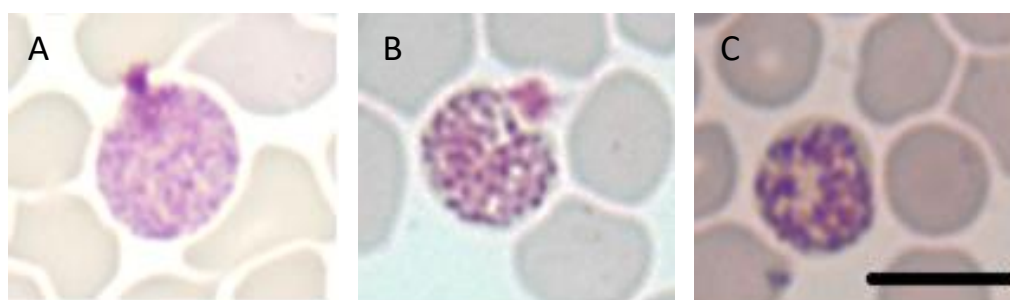


Figura 8: Formas haemosporidianas de *Desmodus rotundus* e *Glossophaga soricina* coletadas no Brasil. Nas imagens, gametócitos (A) e esquizontes (B, C) são representados. Barra mede 10 $\mu$ m.

**Morfotipo 4:** Os parasitos do morfotipo quatro apresentam apenas gametócitos em fase eritrocítica e foi observado em um espécime de *Artibeus lituratus* (Figura 10). Os parasitos apresentam coloração azul/arroxeadada com presença do pigmento malárico em alguns espécimes (Figura 10, imagens A-D). Os gametócitos apresentam citoplasma com coloração azul intensa e núcleo parasitário disperso (Imagem 10, A-D). O núcleo destes parasitos possui coloração rosa claro e também se encontra disperso pelo citoplasma. Ademais, alguns gametócitos podem provocar expansão do citoplasma da célula hospedeira (Figura 10). Os gametócitos do morfotipo são mais similares aos classificados como “malariae-like” devido a coloração azulada (Landau et al. 1984). Outros parasitos



cujos gametócitos são classificados em “malarie-like” são *Polychromophilus*, *Nycteria* e *Dionisia* (Landau et al. 2012). Entretanto, os gametócitos apresentam algumas características incompatíveis com as descritas para estes gêneros, como a presença de núcleo disperso e a presença de um único pigmento (Landau et al. 2012). Alguns dos parasitos observados para este morfotipo assemelham-se às formas mais maduras dos parasitos do gênero *Jonhspretia* e *Sprattiella* (Landau and Chavatte 2015; Landau et al. 2012a). Entretanto, não foi observado formas similares às formas jovens de *Jonhspretia* sp., que apresentam finas projeções citoplasmáticas, tampouco *Jonhspretia* sp. apresenta núcleo disperso no citoplasma (Landau and Chavatte 2015). *Sprattiella*, contrariamente, apresenta formas com núcleo central e bem definido (Landau et al. 2012). Devido a essas diferenças morfológicas, é possível que os parasitos do morfotipo 4 sejam distintos dos demais já descritos em morcegos.

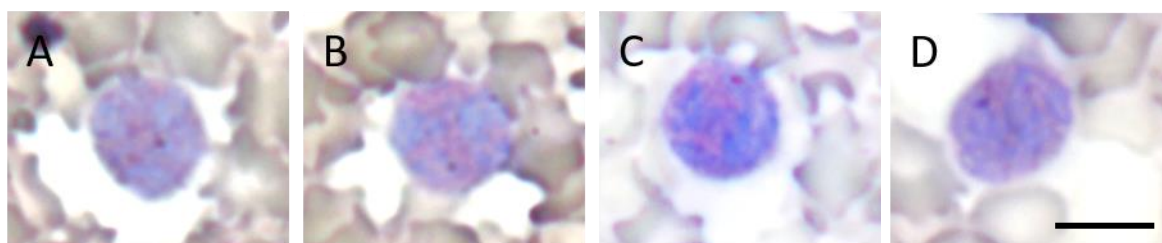


Figura 9: Formas de parasitos da ordem Haemosporida encontrados em um espécime de *Artibeus lituratus*. Nas imagens estão representados apenas gametócitos. Barra mede 10 $\mu$ m.

### 5.3 Descrição Morfológica dos Microfilarídeos

Dentre os microfilarídeos observados, três morfotipos puderam ser caracterizados por apresentarem maior parasitemia e alta qualidade dos esfregaços sanguíneos, permitindo caracterização morfológica.

**Morfotipo 1:** Os microfilarídeos classificados como morfotipo 1 foram observados em um espécime de *Anoura geoffroyi* e pertencem a família Onchocercidae (Figura 11). Estes parasitos não apresentam bainha e possuem comprimento total médio de 99 $\mu$ m, variando entre 86 e 105 $\mu$ m (Desvio Padrão 5,4). A cauda é afilada e curta, com cerca de 22,5 $\mu$ m de comprimento. As microfílarias também apresentam cabeça com ponta afilada e comprimento estimado em 11  $\mu$ m. Ademais, os parasitos são estreitos com largura média

de 6 $\mu$ m (5,05-7 $\mu$ m, Desvio Padrão 0,66). Na maioria das formas parasitárias, não foi possível identificar o corpo interno ou o anel nervoso com precisão devido ao pequeno tamanho dos parasitos.



Figura 10: Formas de microfilarídeos encontrados em um espécime de *Anoura geoffroyi*. Barra mede 10 $\mu$ m.

**Morfotipo 2:** Os microfilarídeos classificados como morfotipo 2 estavam presentes em um indivíduo de *Carollia perpsilata* e pertencem a família Onchocercidae (Figura 9). A maioria dos hemoparasitos apresentam bainha de tamanho médio a curto. Apresentam comprimento médio total de 106,5 $\mu$ m com variações entre 90 a 118 $\mu$ m (Desvio Padrão 9,5). A cauda é afilada com tamanho médio de 31 $\mu$ m. As microfílarias também apresentam cabeça curta com comprimento estimado em 8,5 $\mu$ m (Desvio Padrão 1,22). Estes parasitos podem apresentar grandes variação na largura corporal (Desvio Padrão 1,3), podendo ser observados filarídeos com 4,84 até 8,88 $\mu$ m. A largura corporal média destes parasitos é 6,3 $\mu$ m. Para a maioria das formas parasitárias, não foi possível identificar o corpo interno ou o anel nervoso com precisão devido ao pequeno tamanho dos parasitos.



Figura 11: Formas de microfilarídeos encontrados em um espécime de *Carollia perpsilata*. Barra mede 10 $\mu$ m.

**Morfotipo 3:** Aqueles microfilarídeos classificados como morfotipo 3 foram observados em um indivíduo de *Artibeus planirostris* e pertencem a família Onchocercidae (Figura 11). Estes hemoparasitos apresentam bainha extensa e facilmente observável em microscopia óptica. Os parasitos do morfotipo 3 têm comprimento médio total de 105,8 $\mu$ m, podendo ser observados indivíduos com comprimento total variando entre 98 a 108 $\mu$ m (Desvio Padrão 4,2). A cauda é levemente estreita com tamanho médio de 23,5 $\mu$ m. Além disso, estes parasitos apresentam cabeça curta com comprimento estimado em 8,3 $\mu$ m (Desvio Padrão 0,9 $\mu$ m). Pequena variação na largura corporal é observada para estes parasitos (Desvio Padrão 0,45), sendo seu tamanho médio 5 $\mu$ m. Para a maioria das formas parasitárias, não foi possível identificar o corpo interno ou o anel nervoso com precisão devido ao pequeno tamanho dos parasitos.

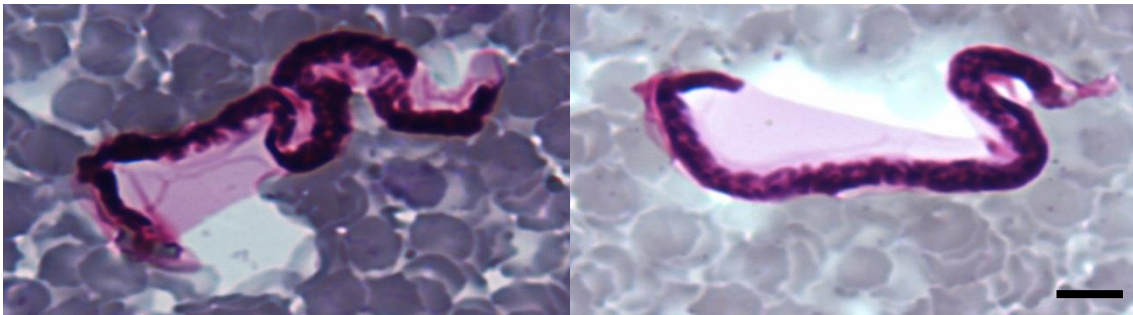


Figura 12: Formas de microfilarídeos encontrados em um espécime de *Artibeus planirostris*. Barra mede 10 $\mu$ m.

#### 5.4 Avaliação da influência da época do ano de coleta e a ocorrência de hemosporídeos

A ocorrência de hemosporídeos na época chuvosa foi de 8% enquanto que para a época seca foi de 2,41%. A ocorrência de hemosporídeos diferiu entre a época chuvosa e seca ( $p=0,004$ ,  $F=6$ , Figura 8).

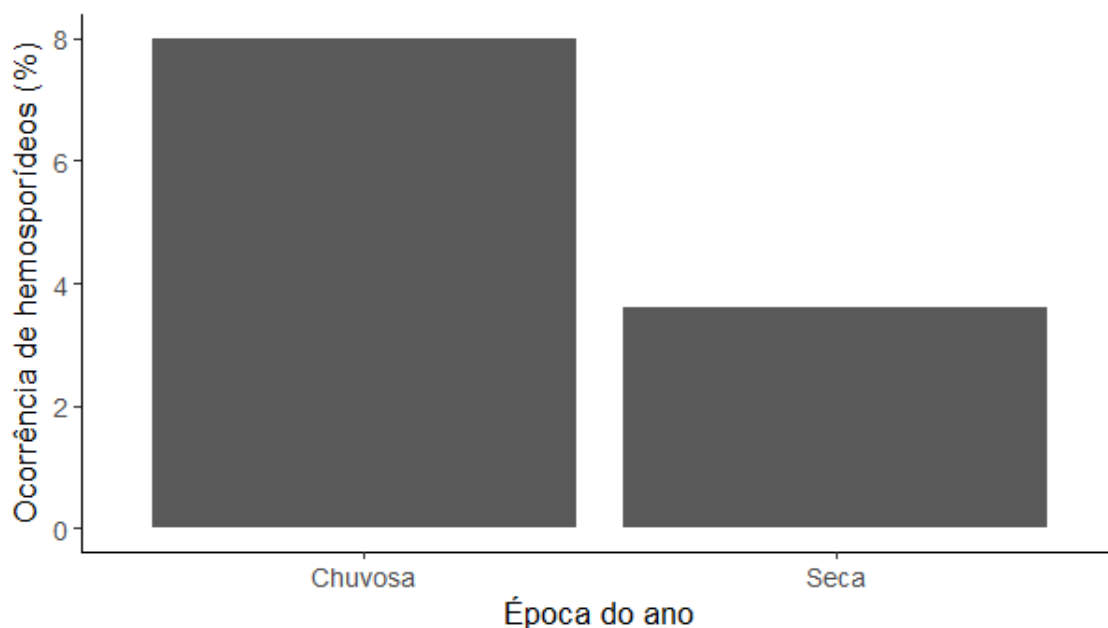


Figura 13: Ocorrência de hemsporídeos para cada época do ano. Foi observada diferença na ocorrência de hemsporídeos entre a época de coleta dos animais ( $p=0,004$ ,  $F=18$ ).

### 5.5 Espécies de morcegos encontradas infectadas por hemsporídeos

A ocorrência de hemsporídeos entre as sete espécies avaliadas ( $n \geq 10$ ) variou de 0% a 23,07% em *Platyrrhinus lineatus* e *Myotis nigricans*, respectivamente. Morcegos das espécies *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Glossophaga soricina* apresentaram 3,77, 2,44, 8,33, 10 e 14,28% de ocorrência de hemsporídeos, respectivamente. A ocorrência de hemsporídeos foi diferente entre as espécies avaliadas ( $p < 0,0001$ ,  $F=18$ , Figura 11). A ocorrência de hemsporídeos em todos os morcegos da família Phyllostomidae foi menor do que a ocorrência em *Myotis nigricans*, morcego da família Vespertilionidae.

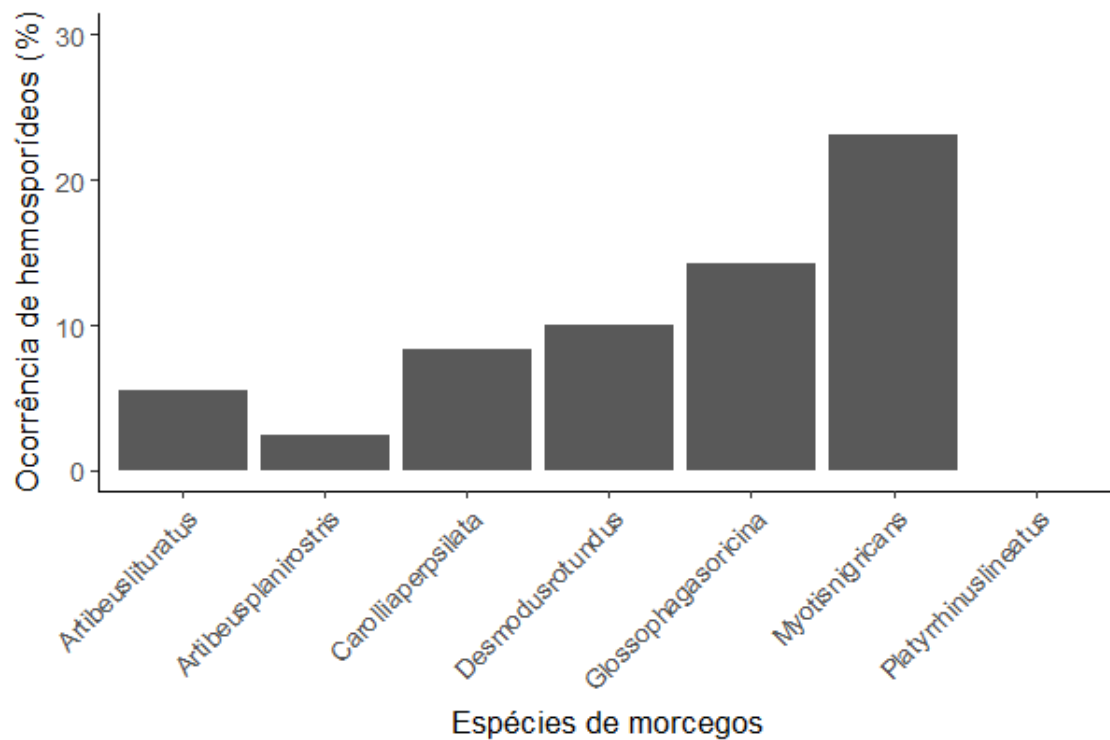


Figura 14: Ocorrência de hemsporídeos para as seis espécies de morcegos. Foi observada diferença na ocorrência de hemsporídeos ( $p < 0,0001$ ,  $F = 18$ ).

### 5.6 Avaliação do efeito da condição corporal e ocorrência de hemsporídeos

Morcegos não infectados por hemsporídeos apresentam maior relação peso/antebraço quando comparados a morcegos infectados ( $F = 170$ ,  $p = 0,007$ , Figura 12).

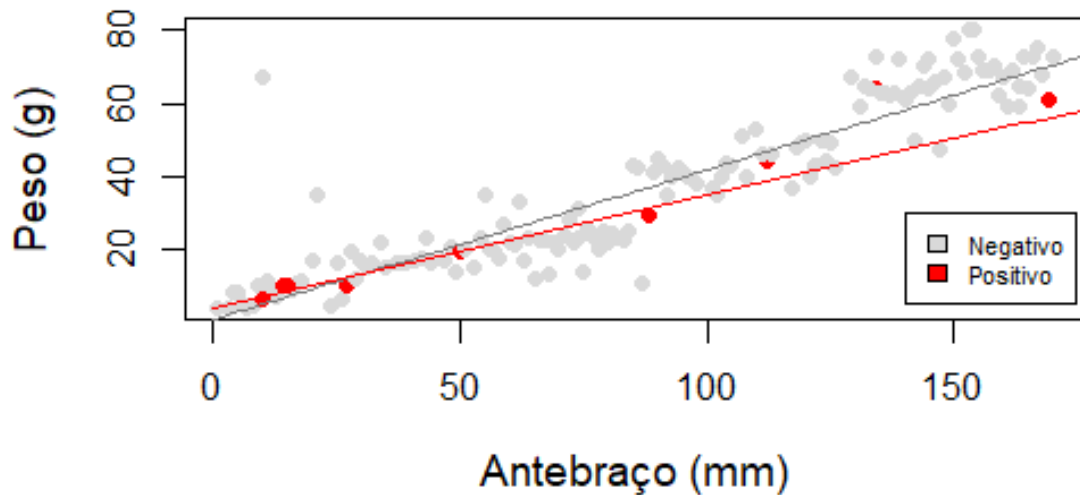


Figura 15: Relação peso/antebraço entre morcegos infectados e não infectados ( $F=170$ ,  $p=0,007$ ).

Com o objetivo de determinar quais os serviços ecossistêmicos realizados por quirópteros poderiam ser mais afetados pela infecção por hemossporídeos, classificou-se os morcegos de acordo com sua guilda trófica e realizou-se um novo teste GLM família quasibinomial, adicionando a guilda trófica dos morcegos como uma nova variável. A ocorrência de hemossporídeos entre as quatro guildas tróficas avaliadas ( $n \geq 10$ ) variou de 4,2% a 16,67% em morcegos frugívoros e insetívoros, respectivamente. Morcegos hematófagos e nectarívoros apresentaram ambos 10% de ocorrência de hemossporídeos.

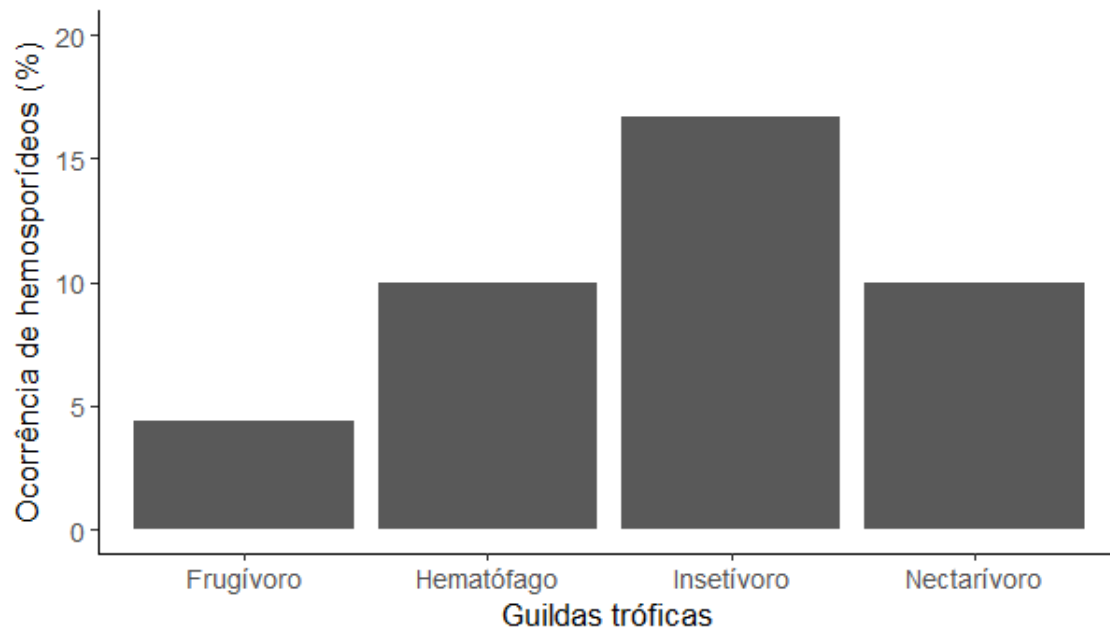


Figura 16: Ocorrência de hemosporídeos para quatro guildas tróficas. Observou-se diferença significativa na ocorrência de hemosporídeos ( $p=0,03$ ,  $F=6$ ).

### 5.7 Insucesso no sequenciamento para caracterização da diversidade de hemosporídeos

As 13 amostras positivas em análise por microscopia e biologia molecular foram submetidas à amplificação por PCR específicas para parasitos de morcegos e mamíferos. Um total de cinco combinações diferentes de primers foram utilizados para tentar amplificar os parasitos, entretanto, apenas três amostras de morcego foram amplificadas e em apenas um método (primers 3932F/DW4). Não obstante, o fragmento amplificado apresentava cerca de 200pb a menos que o fragmento controle e, após purificação e sequenciamento das amostras positivas, a sequência obtida não era compatível com nenhuma sequência já depositada no GenBank. Ao menos dois controles (*P. falciparum* e *P. berghei*) demonstraram-se positivos para cada reação.

## 6- Discussão

Este estudo evidenciou pela primeira vez que morcegos brasileiros podem se infectar por outros gêneros/espécies de hemosporídeos que não somente aquele descrito há mais de 30 anos por Garnham e colaboradores em 1971 (*Polychromophilus*). Os morcegos avaliados na região de Montes Claros, Minas Gerais, apresentaram 6,44% de ocorrência de hemosporídeos. O diagnóstico por microscopia dos hemoparasitos de morcegos permitiu a observação, em diferentes lâminas positivas, de todas as formas eritrocíticas presentes em parasitos da ordem Haemosporida (trofozoíto, meronte e gametócitos). Em 10 das 13 lâminas positivas para hemosporídeos, observou-se trofozoítos ou merontes, indicando a presença de merogonia eritrocítica para grande parte dos parasitos encontrados (77%).

No continente Americano, os únicos hemosporídeos descritos pertencem aos gêneros *Polychromophilus e Bioccala* (Garnham et al., 1971; Marinkelle, 1995; Perkins and Schaer, 2016), os quais apresentam apenas a forma de gametócito em seu ciclo eritrocítico (Garnham 1966). Logo, a observação das formas de esquizonte e trofozoíto indica que a diversidade de hemosporídeos no Brasil é maior do que se esperava (Perkins and Schaer, 2016). Entre os gêneros já descritos para morcegos, apenas o gênero *Plasmodium* apresenta em seu ciclo eritrocítico as formas de trofozoíto e esquizonte (Landau et al. 1980, 1984; Landau et al. 2012), indicando que pelo menos 10 dos animais positivos encontrados poderiam estar infectados por parasitos do gênero *Plasmodium*. Entretanto, apesar de *Plasmodium* ser o único gênero já descrito para morcegos que apresenta esquizogonia em seu ciclo eritrocítico, foram observadas formas parasitárias com morfologia distinta da observada usualmente para parasitos do gênero *Plasmodium* (Figura 5, imagem 8, 9 e 11). Ademais, Schaer et al. 2013 também observou *Plasmodium* morfologicamente distintos dos parasitos observados neste estudo. Tal fato, acrescido a dificuldade em obter fragmentos com uso de biologia molecular, pode indicar que alguns dos parasitos que encontrei neste estudo representam morfotipos únicos do Novo Mundo.

Neste estudo também foram descritos quatro morfotipos distintos de hemosporídeos, sendo o morfotipo 1 morfologicamente similar a parasitos do gênero *Plasmodium*. Entretanto, o diagnóstico a nível de gênero não pode ser realizado com precisão apenas pela observação de trofozoítos (Garnham 1966; Landau et al. 2012). Os



demais morfotipos apresentaram características morfológicas únicas e distintas dos demais parasitos já reportados para morcegos sugerindo a existência de parasitos específicos das Américas. Além disso, a observação de três formas novas de hemsporídeos em apenas 13 animais infectados pode indicar a presença de uma diversidade alta e inexplorada de hemsporídeos no continente. Logo, novos estudos com animais coletados na América são de fundamental importância para descrever e caracterizar a diversidade de hemsporídeos no Novo Mundo.

Além disso, oito em 208 animais (3,86%) encontravam-se infectados por microfilarídeos. Observou-se baixas parasitemia em sete dos oito animais infectados por microfilarídeos (<0,1%). O único animal que apresentou parasitemia mais alta de filarídeos (>0,1%) também se encontrava infectado por hemsporídeos. Clark et al. 2016 demonstraram que a infecção por hemsporídeos e microfilarídeos pode estar positivamente correlacionada em aves. Assim, é possível que esta co-infecção também favoreça o aumento da parasitemia e susceptibilidade a microfilarídeos em morcegos.

Constatou-se também que há diferença na ocorrência de hemsporídeos entre a época chuvosa e seca em morcegos brasileiros. Os resultados indicam que a ocorrência da infecção por hemsporídeos é influenciada por características sazonais do Cerrado, tais como variações na temperatura e precipitação.

Modificações sazonais de temperatura e precipitação favorecem a proliferação de possíveis vetores (culicídeos, *Culicoides* spp., moscas nycteribiidae) dos hemsporídeos encontrados em morcegos no Brasil (Forattini, 1995). A chegada da época das chuvas no Cerrado, aumenta a quantidade de criatórios de culicídeos, favorecendo a proliferação dos vetores. Ademais, o aumento da temperatura acelera o desenvolvimento destes artrópodes, promovendo o encurtamento de gerações e, conseqüentemente, aumento populacional. Não obstante, considera-se que uma vez infectados, os animais infectados por hemsporídeos mantêm a infecção crônica indefinidamente (Valkiūnas, 2005). Por esta razão, o mais provável é que novos contatos com vetores e parasitos aumentem a parasitemia das infecções latentes e aumentem a proporção de animais infectados na população, o que resulta no aumento da ocorrência (Rivero and Gandon, 2018). Este aumento na parasitemia de infecções latentes e novos casos de infecção podem ocasionar baixas populacionais e diminuição do sucesso reprodutivo dos hospedeiros infectados

(Ilgunas et al., 2016; Palinauskas et al., 2008), contribuindo no processo de seleção sexual em morcegos cuja época reprodutiva ocorre em período chuvoso.

Nos últimos 40 anos a temperatura média do planeta tem aumentado consideravelmente (Patz et al., 2016). Alguns estudos têm relatado aumento da ocorrência de hemossporídeos e outras infecções transmitidas por vetores como consequência do aumento da temperatura e outras mudanças ambientais (Garamszegi, 2011; Patz et al., 2016, 2000; Sehgal, 2010). Estudos que comparem a ocorrência de hemossporídeos em diferentes épocas de maior temperatura são importantes para a compreensão de como a variação na temperatura pode influenciar a transmissão de doenças transmitidas por vetores e para a elaboração de modelos preditores. Não obstante, os morcegos foram capturados durante apenas um ano, por isso, é possível que a diferença na ocorrência possa estar relacionada às mudanças específicas do ano de coleta e não sejam um fenômeno que ocorra todos os anos. No geral, observei que a ocorrência e, potencialmente, a parasitemia de hemossporídeos em morcegos está relacionado com mudanças climáticas sazonais. Assim, é possível que a infecção exerça diferentes pressões sobre as comunidades de morcegos ao longo do ano.

Outro dado obtido neste estudo indica que as diferentes espécies de morcegos apresentam diferença na ocorrência de hemossporídeos. Nossos resultados indicam que a ocorrência da infecção por hemossporídeos é influenciada por características individuais de cada espécie. Dentre as possíveis individualidades de cada espécie que poderiam influenciar na diferença da ocorrência de hemossporídeos podemos destacar a competência imunológica e o contato diferencial com vetores. As espécies que apresentaram as maiores ocorrências de hemossporídeos foram *Myotis nigricans*, *Sturnira lilium* e *Glossophaga soricina*. Estas espécies possuem podem ser encontradas ao longo de vários países da América Latina e possuem hábitos distintos (Reis et al., 2007). *Myotis nigricans* podem ser encontrados em grandes colônias com coabitação de espécies e são animais insetívoros (Reis et al., 2007). *Sturnira lilium* e *Glossophaga soricina* são espécies bem adaptadas a alterações ambientais podendo ser encontrados em grutas, cavernas, edificações humanas e ocos de árvores (Reis et al., 2007). É possível que os hábitos coloniais em *Myotis nigricans* propicie o aumento da ocorrência de parasitos, assim como a colonização e proximidade de ambientes urbanos, nos quais o aumento do estresse somado ao potencial aumento da abundância de vetores (Bradley and Altizer, 2007),

favoreça a ocorrência de hemosporídeos em *Sturnira lilium* e *Glossophaga soricina*. É importante ressaltar que novos estudos devem ser realizados em morcegos brasileiros a fim de confirmar este resultado e tais especulações.

A ocorrência de hemosporídeos encontrada neste estudo (6,44%) foi menor do que a observada em estudos com morcegos coletados na África, onde Schaer et al. 2013 e Duval et al. 2012 observaram 40 e 60% de indivíduos infectados por hemosporídeos. Morcegos da família Phyllostomidae representam cerca de 90% da amostra total de morcegos neste estudo (tabela 2) e, entre as espécies avaliadas, foram as que apresentaram as mais baixas ocorrências de parasitos. Logo, a abundância de espécies de morcegos pouco infectadas por hemosporídeos pode ser uma das razões pela qual foi observada baixa ocorrência destes parasitos em morcegos do Brasil. Além disso, nunca foi reportado para morcegos brasileiros parasitos do gênero *Hepaticystis*, o qual é considerado o parasito mais abundante no Velho Mundo (Schaer et al., 2013). Assim, uma outra possível razão para a menor ocorrência de hemosporídeos no Brasil é a ausência de parasitos do gênero *Hepaticystis*. É importante também considerar as limitações do material, o qual, por muitas vezes, não apresentou a qualidade ideal para análise por microscopia. Em suma, populações de morcegos são infectados diferencialmente e podem sofrer diferentes pressões seletivas em decorrência da infecção por hemosporídeos.

Os resultados deste estudo também indicam que morcegos infectados por hemosporídeos apresentam redução da condição corporal quando comparado com animais negativos. Portanto, os hemosporídeos podem promover efeitos negativos para a condição corporal do hospedeiro, levando a perda de peso e, possivelmente, reduzindo sucesso reprodutivo e sobrevivência destes animais.

Os morcegos realizam uma série de serviços ambientais fundamentais para o perfeito funcionamento da comunidade (Kunz et al., 2011; Reis et al., 2007). Assim, é possível que morcegos infectados, e, conseqüentemente, com menor condição corporal, realizem com menor eficiência seus serviços ecossistêmicos. Logo, as funções mais afetadas pela infecção por hemosporídeos seriam o controle de insetos (insetívoros) e a polinização (nectarívoros). Por outro lado, morcegos frugívoros apresentaram a mais baixa ocorrência de hemosporídeos, assim, é possível que a dispersão de frutos seja a função ecossistêmica menos afetada pela infecção por hemosporídeos.

Infecções com baixas parasitemias (<1%) foram majoritariamente observadas, indicando que as infecções, possivelmente, encontravam-se em fase crônica (Valkiūnas, 2005). A fase crônica de infecção, normalmente, é acompanhada por sintomas mais brandos quando comparada à fase aguda da infecção. Acredita-se que os hospedeiros infectados por hemospóridios mantêm a infecção indefinidamente, sem apresentar cura (Braga et al., 2011; Valkiūnas, 2005). Braga et al. 2011 sugerem que pode existir subamostragem de aves com infecções agudas por hemospóridios, uma vez que nesta fase da infecção os sintomas são mais aparentes, levando a letargia do hospedeiro. Logo, é possível que morcegos com infecção em fase aguda apresentem quedas maiores na condição corporal, explicando também o porquê não foi registrado nenhum morcego com alta parasitemia e em fase aguda de infecção. Ademais, é possível que a baixa ocorrência de morcegos e a observância apenas de hospedeiros em fase crônica de infecção seja resultado de elevada mortalidade e letargia de animais em fase aguda de infecção.

## 7- Conclusões

1- A diversidade de parasitos em espécies de morcegos brasileiras não se restringe a *Polychromophilus* e *Bioccala* spp conforme apontado em estudos prévios. Novos gêneros de hemosporídeos podem infectar morcegos no Brasil.

2- A estação chuvosa pode favorecer o aumento da ocorrência e/ou maiores parasitemias de hemosporídeos;

3- Diferentes espécies de morcegos apresentam taxas de infecção variada por hemosporídeos.

4- Animais infectados por hemosporídeos apresentam menor condição corporal.

## 8- Referências

- Aly, A.S.I., Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I., 2009. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 195–221.
- Asghar, M., Hasselquist, D., Zehtindjiev, P., Westerdahl, H., Bensch, S., 2015. Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science* 347, 436–438.
- Begon, M., Colin, R.T., Harper, J.L., 2007. *Ecology – From Individuals to Ecosystems*, 4th ed., Michael Begon, Colin R. Townsend, John L. Harper, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, 738 pages. *Biol Cons.*
- Belo, N.O., Pinheiro, R.T., Reis, E.S., Ricklefs, R.E., Braga, É.M., 2011. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct cerrado habitats in Brazil. *PLoS One* 6, 1–8.
- Bradley, C.A., Altizer, S., 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends Ecol. Evol.* 22, 95–102.
- Braga, É.M., Silveira, P., Belo, N.O., Valkiunas, 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.
- Clark, N.J., Wells, K., Dimitrov, D., Clegg, S.M., 2016. Co-infections and environmental conditions drive the distributions of blood parasites in wild birds. *J. Anim. Ecol.* 85, 1461–1470.
- De Angeli Dutra, D., Silveira, P., Ramos, J.A., Sousa, J.P., Braga, É.M., Norte, A.C., 2017. Haemosporidian infections affect antioxidant defences in great tits *Parus major* but are not related to exposure to aerial pollutants. *Parasitol. Open* 3, e4.
- Duval, L., Mejean, C., Maganga, G.D., Makanga, B.K., Mangama Koumba, L.B., Peirce, M.A., Ariey, F., Bourgarel, M., 2012. The chiropteran haemosporidian *Polychromophilus melanipherus*: A worldwide species complex restricted to the family *Miniopteridae*. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1558–1566.
- Fallon, A.S.M., Ricklefs, R.E., Swanson, B.L., Bermingham, E., 2003. Detecting Avian

- Malaria : an Improved Polymerase Chain Reaction Diagnostic 89, 1044–1047.
- Forattini, O.P., 1995. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil, Cadernos de Saúde Pública.
- Garamszegi, L.Z., 2011. Climate change increases the risk of malaria in birds. *Glob. Chang. Biol.* 17, 1751–1759.
- Garnham, P.C., Lainson, R., Shaw, J.J., 1971. A contribution to the study of the haematozoon parasites of bats. A new mammalian haemoproteid, *Polychromophilus deanei* n. sp. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*
- Garnham P.C, 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. Backwell, Oxford, England; Davis, Philadelphia, 1132pp.
- Ilgunas, M., Bukauskaite, D., Palinauskas, V., Iezhova, T.A., Dinhol, N., Nedorost, N., Weissenbacher-Lang, C., Weissenböck, H., Valkiunas, G., 2016. Mortality and pathology in birds due to *Plasmodium* (*Giovannolaia*) *homocircumflexum* infection, with emphasis on the exoerythrocytic development of avian malaria parasites. *Malar. J.* 15, 1–11.
- Kunz, T.H., de Torrez, E.B., Bauer, D., Lobova, T., Fleming, T.H., 2011. Ecosystem services provided by bats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1223, 1–38.
- Kuris, A.M., Hechinger, R.F., Shaw, J.C., Whitney, K.L., Aguirre-Macedo, L., Boch, C.A., Dobson, A.P., Dunham, E.J., Fredensborg, B.L., Huspeni, T.C., Lorda, J., Mababa, L., Mancini, F.T., Mora, A.B., Pickering, M., Talhouk, N.L., Torchin, M.E., Lafferty, K.D., 2008. Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries. *Nature* 454, 515–518.
- Lafferty, K.D., Morris, A.K., 1996. Altered behaviour of parasitized killifish increases susceptibility to predation by birds final hosts. *Ecology* 77, 1390–1397.
- Landau, I., Baccam, D., Ratanaworabhan, N., Yenbutra, S., Boulard, Y., Chabaud, G., 1984. Nouveaux haemoproteidae parasites de chiropteres en Thaïlande. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*
- Landau, I., Chabaud, A., Miltgen, F., Baccam, D., 1980. *Dionisia bunoi* n. gen. n. sp. Haemoproteidae parasite du Microchiroptère *Hipposideros cyclops* au Gabon. *Ann.*

- Parasitol. Hum. Comp. 55, 271–280.
- Landau, I., Chavatte, J.M., Karadjian, G., Chabaud, A., Beveridge, I., 2012. Haemosporidian Parasites of Bats. *Parasite* 19, 137–146.
- Landau I, Chavatte, J.M., 2015. *Johnspretia copemani* gen. nov., sp. nov. (Haemoproteidae), a parasite of the flying-fox, *Pteropus alecto* (Pteropidae) from Queensland 56, 6–8.
- Marinkelle, C.J., 1995. The haemoproteid parasite, *Bioccala deanei*, from a Colombian bat, *Eptesicus fuscus* (Vespertilionidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89, 89–91.
- Marzal, A., 2012. Recent Advances in Studies on Avian Malaria Parasites. *Malar. Parasites* 135–158.
- Mickleburgh, S.P., Hutson, A.M., Racey, P. a, 2002. A review of the global conservation status of bats Major threats. *Oryx* 36, 18–34.
- Moratelli, R., Calisher, C.H., 2015. Bats and zoonotic viruses: Can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 1–22.
- Nava, S., Venzal, J.M., Terassini, F.A., Mangold, A.J., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B., 2010. Description of a New Argasid Tick (Acari: Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon. *J. Parasitol.* 96, 1089–1101.
- Nogueira, M.R., de Lima, I.P., Moratelli, R., Tavares, V. da C., Gregorin, R., Peracchi, A.L., 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List* 10, 808–821.
- Okanga, S., Cumming, G., Hockey, P., 2013. Avian malaria prevalence and mosquito abundance in the Western Cape, South Africa. *Malar. J.* 12, 370.
- Paglia, A.P., Fonseca, G.A.B. da, Rylands, A.B., Herrmann, G., Aguiar, L.M.S., Chiarello, A.G., Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Siciliano, S., Kierulff, M.C.M., Mendes, S.L., Mittermeier, R.A., Patton, J.L., 2012. Annotated checklist of Brazilian mammals 2º Edição, Occasional Papers in Conservation Biology.
- Palinauskas, V., Valkiunas, G., Bolshakov, C. V., Bensch, S., 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Exp. Parasitol.*



120, 372–380.

Patz, J.A., Graczyk, T.K., Geller, N., Vittor, A.Y., 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* 30, 1395–1405.

Patz, J.A., Olson, S.H., 2016. Practices Linked references are available on JSTOR for this article : Malaria risk and temperature : Influences from global climate change and local land use practices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5635–5636.

Perkins, S.L., Schaer, J., 2016. A Modern Menagerie of Mammalian Malaria. *Trends Parasitol.* 32, 772–782.

Perkins, S.L., Schall, J.J., 2002. A Molecular Phylogeny of Malarial Parasites Recovered from Cytochrome B Gene Sequences a Molecular Phylogeny of Malarial Parasites Recovered from Cytochrome B Gene Sequences. *J. Parasitol.* 88, 972–978.

Poulin, R., Fredensborg, B.L., Hansen, E., Leung, T.L.F., 2005. The true cost of host manipulation by parasites. *Behav. Processes* 68, 241–244.

Preston, D.L., 2010. Community Ecology | Lead Editor : Sara Tenney Ecological Consequences of Parasitism structure through their effects on trophic interactions , food webs , 1–5.

Reis, N.R. Dos, Peracchi, A.L., Pedro, W. a, Lima, I.P. De, 2007. Morcegos do Brasil, *Ecologia*.

Rivero, A., Gandon, S., 2018. Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. *Trends Parasitol.* xx, 1–15.

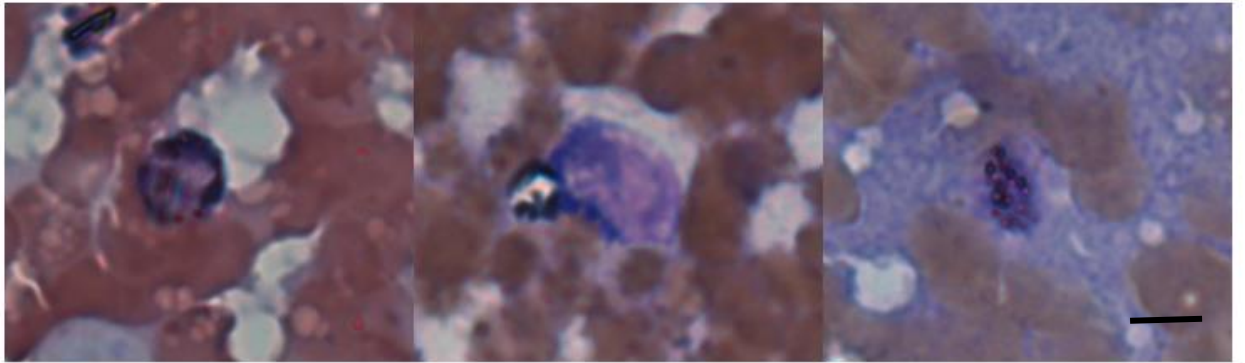
Schaer, J., Perkins, S.L., Decher, J., Leendertz, F.H., Fahr, J., Weber, N., Matuschewski, K., 2013. High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent Plasmodium taxa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 17415–17419.

Schall, J.J., 1992. International Association for Ecology Parasite-Mediated Competition in Anolis Lizards. *Oecologia* 92, 58–64.

Sehgal, R.N.M., 2010. Deforestation and avian infectious diseases. *J. Exp. Biol.* 213, 955–960.

Valkiūnas, G., 2005. Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia, CRC Press.

## 9- Anexos



Anexo 2: Formas de hemosporídeos encontradas no fígado de morcegos do Cerrado brasileiro. Em todas as imagens estão representados esquizontes exoeritrocíticos. Barra mede 10 $\mu$ m.