

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

**PREVALÊNCIA, RIQUEZA E SAZONALIDADE DE  
HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE  
SUCESSÃO ECOLÓGICA NO PARQUE ESTADUAL DA MATA  
SECA, MINAS GERAIS, BRASIL**

FRANCISCO CARLOS FERREIRA JUNIOR

BELO HORIZONTE – MG  
AGOSTO 2016

FRANCISCO CARLOS FERREIRA JUNIOR

**PREVALÊNCIA, RIQUEZA E SAZONALIDADE DE  
HEMOSPORÍDEOS AVIÁRIOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE  
SUCESSÃO ECOLÓGICA NO PARQUE ESTADUAL DA MATA  
SECA, MINAS GERAIS, BRASIL**

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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Martins Braga

BELO HORIZONTE – MG

AGOSTO 2016

*“Era o manuelzinho-da-crôa, sempre em casal, indo por cima da areia lisa, eles altas perninhas vermelhas, esteiadas muito atrás traseiras, desempinadinhos, peitudos, escrupulosos catando suas coisinhas para comer alimentação. Machozinho e fêmea – às vezes davam beijos de biquinim – a galinholagem deles. ‘É preciso olhar para esses com um todo carinho...’ – o Reinaldo disse.”*

*(João Guimarães Rosa, Grande Sertão: Veredas)*

## **Agradecimentos**

À CAPES, pela bolsa de doutorado e pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior que viabilizou a minha estadia no Japão por 10 meses.

À minha orientadora, professora Érika Martins Braga, cuja inspiradora competência e retidão científica muito contribuíram para a minha formação como cientista. Agradeço também pela confiança em todos estes anos de doutorado, pelo apoio na minha jornada do doutorado sanduíche e por ter ido me apoiar em terras japonesas. Trabalhar com uma grande professora é muito prazeroso!

Ao meu orientador de doutorado sanduíche no exterior, Dr. Yukita Sato da Nihon University, que forneceu todo o suporte financeiro, intelectual e logístico para a realização da minha pesquisa no Japão. Agradeço também pela possibilidade de realização de inúmeras atividades sobre entomologia médica e veterinária, incluindo um workshop no extremo sul do Japão e treinamento na Obihiro University, extremo norte do país.

Aos alunos do Jitsudou, que me receberam com muita alegria, sushi e nihonshu, fazendo com que os meus experimentos fluíssem com agilidade e qualidade japonesas.

Ao meu eterno orientador, professor Nelson Rodrigo da Silva Martins, que muito ajudou no meu projeto inicial que não deu certo, e que continua me recebendo no Setor de Doenças das Aves mesmo em horas avançadas da noite.

Ao Gabriel Félix, que me ajudou na análise e interpretação dos meus dados, além de ter contribuído para a minha formação como cientista.

À Raquel A. Rodrigues, e aos professores Lemuel O. Leite e Magno A. Z. Borges da Universidade Estadual de Montes Claros, pela coleta e concessão das amostras utilizadas no presente trabalho.

Aos inúmeros alunos que passaram pelo Laboratório de Malária nestes quatro anos, e que contribuíram para que longas jornadas de trabalho fossem prazerosas. Agradeço em especial à Luiza Mourão pela carinhosa convivência e ajudas diversas.

Às várias pessoas que me ajudaram a desmembrar e decapitar os mais de 20.000 mosquitos analisados. Dani, Lídia, Giulio, Natália, Nina, Eduardo... arigatou!

Ao Newton P. U. Barbosa, pela ajuda nas primeiras análises deste trabalho.

Ao Vincenzo A. Ellis, pela ajuda nas análises dos dados aqui obtidos e pela leitura e ajuda no paper submetido com os resultados dos mosquitos.

Ao Ralph Vanstreels e ao professor José L. Catão-Dias, pela oportunidade de participar de trabalhos fantásticos e que muito contribuíram com a conservação dos pinguins que visitam o Brasil e a Austrália.

Ao professores Hudson Pinto, Vítor Tenório e Alan Lane, pelo interesse e dedicação que demonstraram em identificar, entender e controlar parasitos que colocaram vidas de simpáticos macacos-barrigudos do AbaluZoo em risco.

À minha mãe, pai, irmãos e padrasto, por todo amor e apoio infinitos!

À Bruna, que atravessou o mundo para tornar a minha estadia no Japão mais prazerosa por 20 dias, me fazendo relaxar quando as coisas pareciam não ir tão bem. Agradeço também pelo apoio e compreensão durante a reta final do doutorado.

À secretaria de Pós-graduação em Parasitologia, nas figuras da Sumara e Sibebe, pelo suporte durante o meu tempo como doutorando do departamento. Também agradeço ao programa de Pós-graduação pelo auxílio financeiro concedido para a minha participação no Congresso Internacional de Malária em Vilnius, Lituânia.

À NSF Research Coordination Network for Haemosporida of Terrestrial Vertebrates por ter custeado a minha participação no International Workshop on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife, que me permitiu passar cinco maravilhosos dias em contato com as maiores sumidades da minha área de pesquisa.

Ao Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG, pelo suporte na eletroforese capilar dos produtos do sequenciamento genético dos parasitos obtidos do sangue das aves.

Ao Seu Neri, pelo fornecimento de cafeína e caseína assada que foram essenciais para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao grande companheiro João Guimarães Rosa, por ter produzido a maior obra de arte que a humanidade viu e verá. Que a vossa palavra seja espalhada!

Ao povo brasileiro, que financia a educação pública de qualidade e a pesquisa no nosso país. Meu muito obrigado!

## Resumo

Alterações ambientais, como a conversão de habitat para a pecuária, constituem umas das principais causas da perda de biodiversidade. Estes dois fatores em conjunto podem aumentar a exposição de populações animais e humanas a agentes infecto-parasitários. A hemossporidiose aviária, infecção causada por protozoários dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*, possui distribuição cosmopolita e provoca diferentes efeitos deletérios em aves de vida livre. Tem sido revelada grande diversidade destes parasitos no Brasil, apontando este sistema parasito-vetor-hospedeiro como um importante modelo para estudos sobre ecologia e evolução de parasitos de relevância conservacionista. A prevalência e diversidade destes parasitos apresentam variações entre ambientes com diferentes níveis de integridade florestal, no entanto, estes parâmetros parasitológicos ainda não haviam sido avaliados em um gradiente de sucessão ecológica no Brasil. O efeito da sazonalidade na prevalência e na distribuição de hemossporídeos não é amplamente explorado em ambientes tropicais. Além disso, pouco se sabe sobre vetores de hemossporídeos no mundo, e menos ainda é conhecido no Brasil. Com isso, o presente trabalho avaliou o efeito da sucessão ecológica e da sazonalidade sobre a comunidade de aves e sobre a prevalência e diversidade de hemossporídeos em aves e em mosquitos no Parque Estadual da Mata Seca, Minas Gerais. Aves foram capturadas com redes de neblina em quatro diferentes estágios sucessionais: pastagem, e estágios inicial, intermediário e tardio. Os três primeiros constituíam áreas de pastagem abandonadas há 8, 13 e 30 anos, respectivamente, e o estágio tardio não apresentava histórico de intervenção humana há mais de 50 anos. O efeito da sazonalidade da Mata Seca na distribuição das aves, mosquitos e de seus parasitos foi avaliado a partir de coletas realizadas em quatro épocas: final do período de chuvas, início e final da estação seca, e pico da estação chuvosa subsequente. Um total de 461 aves foram capturadas, cujas comunidades apresentaram diferenças entre áreas de pastagem e os demais estágios sucessionais. A prevalência de hemossporídeos foi maior entre aves de pastagem em relação às aves dos demais estágios sucessionais considerando toda a comunidade de aves avaliadas. A prevalência também foi maior em aves de espécies exclusivas de áreas de pastagem quando comparadas com espécies que não foram capturadas nesse estágio. Isso revela que espécies exclusivas de áreas de pastagem podem aumentar o risco de infecção por hemossporídeos para espécies que frequentam diversos estágios sucessionais. A prevalência de infecção por hemossporídeos aumentou entre a metade e o final da época seca, podendo indicar um fenômeno conhecido como recaída de primavera, frequente em climas temperados, mas nunca reportado em locais de clima tropical. Também observamos uma distribuição sazonal dos parasitos do subgênero *H.* (*Parahaemoproteus*), que só foram detectados durante as épocas de chuva. Identificamos mosquitos das espécies *Mansonia titillans* e *Ma. pseudotitillans* como potenciais vetores de *Plasmodium* spp. após análise por PCR de *pools* de abdomens. O presente estudo evidencia o papel da sucessão ecológica na estrutura das comunidades das aves. Espécies habitantes de estágios avançados de sucessão são beneficiadas por apresentarem menores taxas de infecção por parasitos patogênicos. Estudos futuros envolvendo coletas periódicas de aves ao longo de vários anos em outros ambientes tropicais sazonais podem revelar se os resultados aqui demonstrados são decorrentes de variações aleatórias ou se realmente refletem alterações sazonais das interações entre hemossporídeos e aves tropicais.

## Abstract

Environmental changes, such as land conversion for livestock farming, constitute the main causes of loss of biodiversity. These effects together can increase parasitic diseases risk in human and wildlife populations. Avian haemosporidian is a worldwide protozoan disease caused by parasites in the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* that has varying deleterious effects on free-living birds. Recent studies have revealed a considerable diversity of haemosporidians in Brazil, depicting this parasite-vector-host system as an important model for ecological and evolutionary studies of parasites of conservational value. Patterns in haemosporidian prevalence and diversity change between habitats with different levels of forest integrity. However, such parameters had not been accessed in forest fragments under different stages of ecological succession in Brazil. Little is known about haemosporidian vectors in the world, and even less is understood in Brazil. With that, we accessed the effects of the ecological succession in bird communities and in the prevalence and diversity of haemosporidians in birds and in mosquitos captured in Mata Seca State Park, Minas Gerais, which ecosystem is dominated by Seasonally Dry Tropical Forest. We mist-netted birds in four different successional stages: pasture areas, and early, intermediate, and late stages. The first three stages consisted in pasture areas abandoned 8, 12 and 30 years ago, respectively, and the late stage does not have reports of human intervention for more than 50 years. Seasonal effects on birds, mosquitos and parasite distribution were evaluated by conducting bird and mosquito captures at four periods: end of the rainy season, beginning and end of the dry season, and peak of the following rainy season. We captured 461 birds, which communities changed between pasture areas and the remaining successional stages. Haemosporidian prevalence, as detected by PCR, was higher within birds in pasture compared with birds captured in non-pasture areas when we considered whole communities. Prevalence also was higher within bird species captured exclusively in pasture areas then within species exclusive from non-pasture areas. Our results reveal that species exclusive from pasture areas increase haemosporidian infection risks for species that inhabit different successional stages when they include pasture areas in their range. Haemosporidian prevalence increased between the beginning and the end of the dry season, suggesting a phenomenon known as spring relapse, which has been reported in temperate latitudes, but that has never been detected in tropical areas. We also found seasonal changes in the distribution of *Parahaemoproteus* parasites. This subgenus was detected only during the rainy seasons. We used PCR and detected *Plasmodium* parasites in abdomen *pools* from the mosquito species *Mansonia titillans* and *Ma. pseudotitillans*, pointing them as putative vectors of avian malaria. The present study shows effects of ecological succession on the structure of bird communities. Species and individuals that inhabit advanced stages are benefited by presenting lower rates of infection by pathogenic parasites. Future studies targeting periodic and long-term samplings in other seasonal tropical environments will reveal if our results are due to random variation or if they reflect seasonal changes in haemosporidian infection in tropical birds.

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Ciclo do <i>Plasmodium relictum</i> , como exemplo para o gênero .....	4
<b>Figura 2:</b> Ciclo do <i>Haemoproteus mansonii</i> , como exemplo para o gênero .....	5
<b>Figura 3:</b> Estágio de sucessão tardio de Mata Seca nas estações úmida e seca .....	14
<b>Figura 4:</b> Pontos de coletas das aves do presente estudo .....	16
<b>Figura 5:</b> Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS: <i>nonmetric multidimensional scaling</i> ) evidenciando a dissimilaridade entre as comunidades de aves entre os diferentes estágios sucessionais .....	26
<b>Figura 6:</b> NMDS das comunidades de aves capturadas ao longo das diferentes épocas no PEMS.....	27
<b>Figura 7:</b> Prevalência de hemosporídeos de acordo o estágio sucessional no Parque Estadual da Mata Seca .....	29
<b>Figura 8:</b> Prevalência de hemosporídeos nas espécies de aves generalistas de acordo com o local de captura.....	30
<b>Figura 9:</b> Prevalência de hemosporídeos nas espécies de aves exclusivas de áreas de pastagem e em espécies encontradas apenas nos estágios inicial, intermediário e tardio..	31
<b>Figura 10:</b> NMDS mostrando a dissimilaridade entre as comunidades de hemosporídeos obtidos em diferentes estágios sucessionais.....	32
<b>Figura 11:</b> Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de hemosporídeos de acordo com a captura de seus hospedeiros em áreas de pastagem ou não-pastagem.....	33
<b>Figura 12:</b> Prevalência geral de hemosporídeos ( <i>Plasmodium</i> e <i>Haemoproteus</i> ) ao longo das épocas de coleta no PEMS.....	34
<b>Figura 13:</b> Prevalência relativa da linhagem de <i>Plasmodium</i> BAFLA03 ao longo das estações de coleta.....	35
<b>Figura 14:</b> Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de hemosporídeos de acordo com a sazonalidade .....	36
<b>Figura 15:</b> NMDS das comunidades de parasitos amostrados em aves capturadas ao longo das diferentes épocas no PEMS.....	37



<b>Figura 16:</b> NMDS mostrando a dissimilaridade entre os estágios sucessionais de acordo com as espécies de mosquitos mais abundantes juntamente com mosquitos do gênero <i>Culex</i> .....	40
<b>Figura 17:</b> NMDS mostrando a dissimilaridade entre as épocas de coleta de acordo com as 12 espécies de mosquitos mais abundantes juntamente com mosquitos do gênero <i>Culex</i> .....	41
<b>Figura 18:</b> Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de <i>Plasmodium</i> detectados em mosquitos coletados no PEMS em relação a linhagens cujas morfoespécies foram previamente descritas.....	45

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Número de aves amostradas e prevalência de hemosporídeos de acordo com a sazonalidade e com os estágios sucessionais no PEMS .....	28
<b>Tabela 2.</b> Abundância das 12 espécies de mosquitos e indivíduos do gênero <i>Culex</i> spp. amostrados no presente estudo separados por estação de coleta e estágio sucessional.....	39
<b>Tabela 3.</b> Linhagens de parasitos detectadas em mosquitos capturados no Parque Estadual da Mata Seca.....	44

## Apêndices

<b>Apêndice 1:</b> Número de aves capturadas e prevalência de hemosporídeos de acordo com o estágio sucessional.....	76
<b>Apêndice 2:</b> Número de aves capturadas e prevalência de hemosporídeos de acordo com as épocas de coleta.....	78
<b>Apêndice 3:</b> Descrição das linhagens de hemosporídeos detectadas de acordo com o estágio sucessional e a época de coleta.....	80

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Alterações ambientais e distribuição de patógenos</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Hemosporidiose aviária</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3. Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp. em aves</b> .....	<b>2</b>
<b>1.4. Ciclo biológico de <i>Haemoproteus</i> spp. em aves</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5. Distribuição de hemosporídeos em diferentes habitats</b> .....	<b>5</b>
<b>1.6. Sazonalidade dos hemosporídeos aviários</b> .....	<b>7</b>
<b>1.7. Avaliação de hemosporídeos em mosquitos</b> .....	<b>8</b>
<b>1.8. Matas Secas e a sucessão ecológica secundária</b> .....	<b>9</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
<b>4.1. Área de estudo</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2. Coleta de dados</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2.1. Descrição da área de estudo</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2.2. Captura das aves e coleta de sangue</b> .....	<b>16</b>
<b>4.2.3. Coleta de culicídeos</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3. Processamento do sangue coletado das aves</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3.1. Extração e quantificação de DNA a partir do sangue das aves</b> .....	<b>17</b>
<b>4.4. Processamento dos culicídeos</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4.1. Identificação e separação dos culicídeos</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4.2. Extração de DNA de <i>pools</i> de mosquitos e de fêmeas ingurgitadas</b> ...	<b>19</b>
<b>4.5. Detecção de hemosporídeos no sangue das aves</b> .....	<b>19</b>
<b>4.5.1. Diagnóstico molecular de <i>Plasmodium</i>/<i>Haemoproteus</i></b> .....	<b>19</b>
<b>4.5.2. <i>Nested</i>-PCR para sequenciamento genético de <i>Plasmodium</i> e <i>Haemoproteus</i></b> .....	<b>20</b>
<b>4.5.3. Purificação dos produtos da <i>Nested</i>-PCR</b> .....	<b>21</b>
<b>4.5.4. Sequenciamento genético e precipitação dos produtos da reação</b> .....	<b>21</b>
<b>4.5.5. Edição das sequências genéticas e análises filogenéticas</b> .....	<b>22</b>
<b>4.6. Análises moleculares dos culicídeos</b> .....	<b>22</b>
<b>4.6.1. Detecção molecular e sequenciamento genético de <i>Plasmodium</i>/<i>Haemoproteus</i> em <i>pools</i> de culicídeos</b> .....	<b>23</b>

4.6.2.	Análise de repasto sanguíneo.....	23
4.7.	Análises estatísticas.....	24
5.	RESULTADOS.....	26
5.1.	Prevalência e diversidade de hemosporídeos em aves hospedeiras.....	26
5.1.1.	Distribuição das aves.....	26
5.1.2.	Prevalência geral e diversidade de parasitos.....	27
5.1.3.	Prevalência de hemosporídeos ao longo dos estágios sucessionais.....	28
5.1.4.	Diversidade de hemosporídeos nas aves ao longo dos estágios sucessionais.....	31
5.1.5.	Variação sazonal da prevalência de hemosporídeos nas aves.....	33
5.1.6.	Distribuição dos parasitos ao longo das épocas do ano.....	34
5.2.	Distribuição de mosquitos e identificação de possíveis vetores.....	37
5.2.1.	Distribuição dos mosquitos capturados.....	37
5.2.2.	Infecção por hemosporídeos em mosquitos capturados no PEMS....	41
5.2.3.	Identificação do repasto sanguíneo de fêmeas ingurgitadas.....	45
6.	DISCUSSÃO.....	47
6.1.	Efeito da sucessão ecológica na distribuição das aves e seus hemosporídeos.....	47
6.2.	Recaída de primavera em ambientes tropicais?.....	50
6.3.	Sazonalidade de parasitos do gênero <i>Haemoproteus</i> .....	52
6.4.	Procurando por potenciais vetores de malária aviária.....	53
7.	CONCLUSÕES.....	58
8.	REFERÊNCIAS.....	59
9.	APÊNDICES.....	76
10.	Manuscrito em preparação.....	82
11.	Manuscrito em revisão na revista <i>Parasites &amp; Vectors</i> .....	114

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Alterações ambientais e distribuição de patógenos

Alterações ambientais, naturais ou antrópicas, afetam o equilíbrio ecológico no qual vetores e seus parasitos se reproduzem, desenvolvem e interagem com hospedeiros vertebrados. O desmatamento e a conversão de áreas naturais para a pecuária e a agricultura são umas das alterações que mais exercem efeito sobre as populações naturais de vetores (Brearley et al. 2013, Confalonieri et al. 2014), por estes conseguirem acesso a novos nichos ecológicos com condições para proliferação e estabelecimento de uma nova área de distribuição (Patz et al. 2000). Como resultado, doenças podem reemergir, ou serem introduzidas em locais previamente isentos, o que, em associação às alterações ambientais, pode provocar perda de biodiversidade (Wilcove et al. 1998, Smith et al. 2006). Por sua vez, ambientes com baixa diversidade de animais vertebrados podem favorecer a transmissão de inúmeras doenças, incluindo as veiculadas por vetores (Ostfeld & Keesing 2000). Locais com maior diversidade de fauna apresentam maiores chances de possuírem mais espécies e indivíduos com baixa capacidade para albergar e/ou transmitir patógenos aos vetores, ocasionando a diminuição da carga do patógeno na comunidade em questão (Keesing et al. 2006). De forma mais ampla, variações na estrutura das comunidades de vertebrados podem ser suficientes para alterações dos riscos de infecção, sem necessariamente estarem relacionadas ao aumento ou à diminuição da riqueza das comunidades (Randolph & Dobson 2012).

Com o aumento da população humana, alterações ambientais antrópicas vão continuar em expansão, modificando relações entre parasitos e hospedeiros ao redor do globo (Sehgal 2015). Com isso, é de extrema importância entender como diferentes níveis de integridade ambiental modulam a epidemiologia de doenças infecto-parasitárias.

## 1.2. Hemosporidiose aviária

Hemosporídeos são parasitos heteroxenos obrigatórios cujos hospedeiros vertebrados pertencem às classes dos anfíbios, répteis, aves e mamíferos e possuem como vetores os insetos dípteros hematófagos (Insecta: Diptera) (Garnham 1966). Os hemosporídeos apresentam distribuição cosmopolita e os quatro gêneros que parasitam

as aves são: *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia* (Valkiūnas 2005), sendo os dois primeiros os mais estudados no Brasil (Braga et al. 2011). As infecções por *Plasmodium* spp., malária aviária, e por *Haemoproteus* spp., hemoproteose, podem ser patogênicas, provocando óbito em indivíduos naturalmente infectados (Warner 1968, Bennett et al. 1993, Cannell et al. 2013, Vanstreels et al. 2014, Dinhol et al. 2015) ou podem reduzir a aptidão reprodutiva das aves (Ortego et al. 2008, Knowles et al. 2010). Estudos recentes têm demonstrado a grande diversidade destes parasitos em ambientes naturais no Brasil (Belo et al. 2011, Fecchio et al. 2013, Lacorte et al. 2013, Villar et al. 2013, Roos et al. 2015), justificando a utilização dos hemosporídeos como modelos para estudos ecológicos, epidemiológicos e relacionados à evolução e interação entre parasito-vetor-vertebrado. No presente trabalho serão utilizados os termos malária referindo-se à infecção por *Plasmodium* spp. e os termos hemosporídeos ou hemosporidiose será empregado em referência às infecções por parasitos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*.

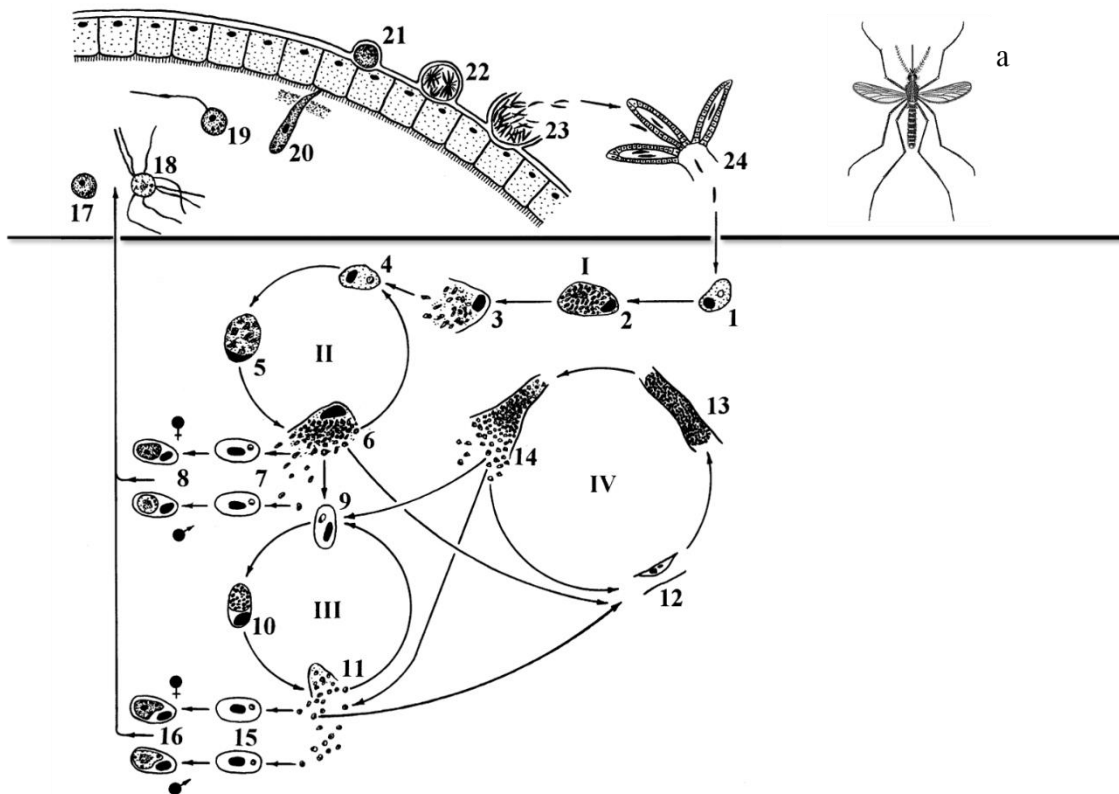
### 1.3. Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. em aves

A reprodução assexuada dos parasitos do gênero *Plasmodium* ocorre em aves hospedeiras e a reprodução sexuada ocorre em mosquitos (família Culicidae). De modo geral, no hospedeiro vertebrado, ocorrem a merogonia exoeritrocítica, merogonia eritrocítica e formação de gametócitos, sendo a primeira dividida em primária (pré-eritrocítica) e secundária (pós-eritrocítica). A merogonia primária consiste em duas gerações de merontes, denominados criptozoítos e metacriptozoítos, respectivamente. A merogonia exoeritrocítica secundária apresenta várias gerações de merontes, denominados fanerozoítos (Valkiūnas 2005; Figura 1).

O ciclo na ave se inicia quando o mosquito infectado inocula esporozoítos do parasito durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado competente. Os esporozoítos penetram nas células do sistema reticular de vários órgãos, incluindo a pele, e produzem a primeira geração de merontes exoeritrocíticos primários (criptozoítos). Os merozoítos gerados pelos criptozoítos formam a segunda geração de merontes primários (metacriptozoítos), que se desenvolvem nos macrófagos de diversos órgãos. Os metacriptozoítos se assemelham aos criptozoítos, no entanto os primeiros produzem maior número de merozoítos quando comparados aos segundos. Os merozoítos formados na segunda geração exoeritrocítica primária (metacriptozoítos) podem reinfestar

macrófagos tissulares e se desenvolverem em novos metacriptozoítos ou em fanerozoítos (merogonia exoeritrocítica secundária); ou podem invadir células da série eritrocítica, 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 parte penetra nas células endoteliais de diversos órgãos, incluindo o cérebro, iniciando a merogonia exoeritrocítica secundária (fanerozoítos). Fanerozoítos e merontes eritrocíticos produzem os merozoítos que mantém a parasitemia da fase crônica da infecção, sendo os primeiros responsáveis pela recaída da infecção.

Ao realizar o repasto sanguíneo em aves infectadas, mosquitos vetores podem ingerir macro e microgametócitos, que se diferenciam em macro e microgametas, respectivamente, ao atingirem o intestino médio do inseto. Estes 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. Os esporozoítos se multiplicam no interior dos oocistos até ocorrer o seu rompimento, quando se deslocam por todo o corpo do inseto até atingirem as glândulas salivares. Os esporozoítos devem atravessar o parênquima da glândula para acessar os ductos salivares e lá permanecem até que a fêmea hospedeira realize novo repasto, infectando, assim, o hospedeiro vertebrado (Valkiūnas 2005).

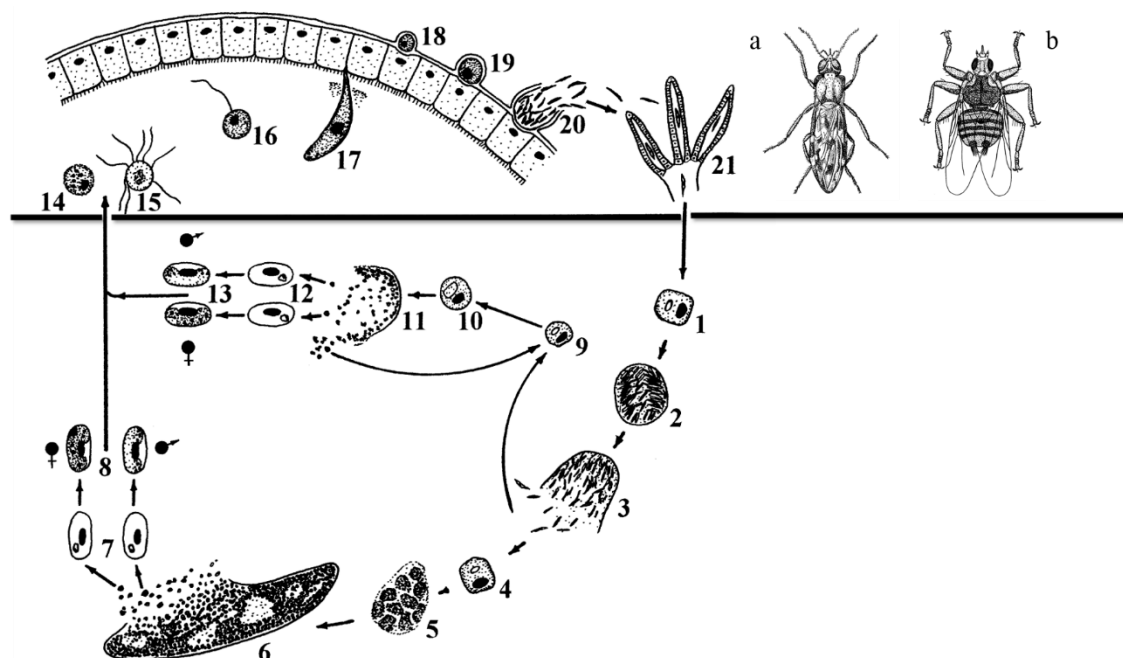


**Figura 1. Ciclo do *Plasmodium relictum*, como exemplo para o gênero:** 1-16, diagrama do ciclo na ave; 17-24, diagrama do ciclo no vetor. I, II – merogonia exoeritrocítica; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária; 1 – esporozoíto em célula reticuloendotelial; 2, 3 – criptozoítos; 4 – merozoíto em macrófago; 5, 6 – metacriptozoítos; 7 – merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos; 9 – merozoíto em eritrócito; 10, 11 – merontes em eritrócitos; 12 – merozoítos em célula reticuloendotelial de capilares; 13, 14 – fanerozoítos; 15 – merozoítos em eritrócitos; 16 – gametócitos; 17 – macrogameta; 18 – exflagelação de microgametas; 19 – fecundação de macrogameta; 20 – oocineto penetrando na membrana peritrocica; 21 – oocisto jovem; 22, 23 – esporogonia; 24 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Díptero da família Culicidae (a) está representado na figura (VALKIŪNAS, 2005).

#### 1.4. Ciclo biológico de *Haemoproteus* spp. em aves

O gênero *Haemoproteus* é dividido em dois subgêneros, *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*, e são diferenciados, principalmente, com base em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Infecção natural do primeiro subgênero já foi descrita apenas em aves da ordem Columbiformes, representada pelas pombas domésticas (*Columba livia*) e espécies silvestres, e em aves marinhas das ordens Pelecaniformes (Levin & Parker 2012) e Charadriiformes (Levin et al. 2012). Parasitos desse subgênero são transmitidos por moscas da família Hippoboscidae. Já o grupo *Parahaemoproteus* engloba parasitos que infectam grande diversidade de aves pertencentes a várias ordens, e são transmitidos por dípteros da família Ceratopogonidae (Valkiūnas 2005, Martinsen et al. 2008).

Esporozoítos injetados pelos vetores se desenvolvem em merontes exoeritrocíticos em células endoteliais de diversos órgãos, como pulmões, fígado, baço, rins, coração, musculatura esquelética, dentre outros. Pelo menos duas gerações de merogonia exoeritrocítica são realizadas, podendo ocorrer em células musculares esqueléticas e cardíacas em algumas espécies de *Haemoproteus* antes do aparecimento dos parasitos na circulação sanguínea. Apenas os gametócitos se desenvolvem no interior dos eritrócitos após a invasão dos merozoítos, assim não são visualizados trofozoítos e merontes em circulação no sangue das aves. A esporogonia nos vetores deste parasito tem os mesmos princípios do ciclo de *Plasmodium* spp. em culicídeos (figura 2; Valkiūnas 2005).



**Figura 2. Ciclo do *Haemoproteus mansonii*, como exemplo para o gênero:** 1-13, diagrama do ciclo na ave; 14-21, diagrama do ciclo no vetor : 1 – esporozoítos em célula endotelial; 2, 3 – merontes exoeritrocíticos de primeira geração, com merozoítos alongados; 4 – merozoítos em célula endotelial; 5, 6 – megalomerontes em crescimento e maduros em musculatura esquelética, respectivamente; 7 – merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos maduros; 9 – merozoítos em célula reticuloendotelial no baço; 10, 11 – merontes em crescimento e maduros no baço, respectivamente; 12 – merozoítos em eritrócitos; 13 – gametócitos maduros; 14 – macrogameta; 15 – exflagelação de microgametas; 16 – fecundação de macrogameta; 17 – oocineto penetrando na membrana peritrófica; 18 – oocisto jovem; 19, 20 – esporogonia; 21 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. Dípteros das famílias Ceratopogonidae (a) e Hippoboscidae (b) estão representados na figura (VALKIŪNAS, 2005).

### 1.5. Distribuição de hemosporídeos em diferentes habitats

Hemosporídeos aviários apresentam distribuição global e podem ser generalistas, com algumas linhagens infectando ampla abrangência de hospedeiros vertebrados (Clark



et al. 2014, Moens & Pérez-Tris 2016). Essa variação da capacidade de infectar diferentes espécies pode favorecer novas associações parasito-hospedeiro (Ellis et al. 2015), apresentando riscos para comunidades de aves que habitam ambientes em constante mudança (Santiago-Alarcon et al. 2012b). De fato, alterações em florestas tropicais estão associadas às mudanças na prevalência e na diversidade de hemosporídeos em várias partes do planeta, fato já demonstrado em Camarões (Bonneaud et al. 2009, Chasar et al. 2009), Gana (Loiseau et al. 2010), Austrália (Laurance et al. 2013) e Costa Rica (Mendenhall et al. 2013). No Brasil, maior prevalência de hemosporídeos foi observada em comunidades de aves em áreas urbanizadas, mas com riqueza de parasitos semelhante quando comparada a uma área natural e a uma área semi-impactada no estado de Tocantins (Belo et al. 2011).

A América do Sul abriga uma grande diversidade de linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus* com grande proporção de linhagens generalistas, ou seja, aquelas que parasitam várias espécies de aves que podem pertencer a famílias ou até a ordens diferentes (Moens & Pérez-Tris 2016, Pinheiro et al. 2016). Com isso, mudanças nas interações entre parasitos, vetores e hospedeiros são possíveis de ocorrer em pequenas escalas geográficas e temporais em ambientes naturais heterogêneos característicos do Neotrópico.

A criação de animais domésticos pode diminuir a transmissão de hemosporídeos por fornecer vertebrados não hospedeiros como fonte de repasto para vetores, desviando-os dos reais hospedeiros dos parasitos por ele transmitidos (Lorosa et al. 2010, Liu et al. 2011). Por outro lado, a criação de animais domésticos em propriedades rurais pode fornecer reservatórios artificiais de água, que seriam utilizados como criatórios por mosquitos, aumentando a população dos mesmos e conseqüentemente aumentando os índices de picadas infectantes em hospedeiros aviários (Gonzalez-Quevedo et al. 2014). Adicionalmente, estes locais favorecem aglomerações de aves em seu entorno, devido à disponibilidade de alimentos destinados aos animais domésticos, aumentando a chance de transmissão de doenças vetoriais (Carrete et al. 2009). Assim, a avaliação do papel do ambiente na transmissão de patógenos é essencial para o entendimento da dinâmica de doenças, fato ainda mais relevante quando se trata de infecções cuja prevalência é modulada por pequenas variações espaciais, como no caso da hemosporidiose aviária (Gonzalez-Quevedo et al. 2014).

## 1.6. Sazonalidade dos hemosporídeos aviários

Variações sazonais na temperatura, distribuição das chuvas e de recursos ambientais exercem influência na dinâmica de doenças, com efeitos sobre parasitos, vetores e hospedeiros vertebrados (Altizer et al. 2006). Temperatura e pluviosidade são os determinantes abióticos mais importantes na dinâmica da transmissão de hemosporídeos, sendo o regime de chuvas o fator mais relevante em ambientes tropicais (Valkiūnas 2005, Lalubin et al. 2013).

Aspectos biológicos sazonais dos hospedeiros vertebrados também podem provocar oscilações na transmissão dos parasitos em uma localidade. O aumento da frequência de aves infectadas na época reprodutiva tem sido relatado como “recaída de primavera”. Isso acontece quando aves adultas entram em período de reprodução e de criação dos filhotes, o que se inicia na primavera em países temperados (Schrader et al. 2003, Cosgrove et al. 2008, Castro et al. 2011). O aumento do custo fisiológico para os pais nesse período é apontado como fator desencadeante da recaída de primavera (Christe et al. 2002), que pode fazer com que parasitos mantidos no ciclo exoeritrocítico retomem níveis significativos de invasão em eritrócitos circulantes, possibilitando sua detecção no sangue periférico (Valkiūnas 2005). Além disso, a concentração de nascimentos em determinada época do ano pode gerar um número significativo de indivíduos jovens, imunologicamente incompetentes, aumentando a susceptibilidade da população aos parasitos locais. Em climas temperados, por exemplo, entedia-se que a maioria dos hemosporídeos apresentava transmissão sazonal durante o período de reprodução das aves (Hellgren et al. 2007). No entanto, essa sazonalidade não parece ser semelhante para todas as linhagens genéticas de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, com parasitos podendo apresentar prevalências estáveis ao longo do ano (Cosgrove et al. 2008, Pérez-Rodríguez et al. 2015).

Recentemente, Cornet et al. (2014b) demonstraram que a recaída provocada por algumas linhagens de plasmódios aviários seria induzida pelo aumento das taxas de picadas por vetores infectados ou não. Este cenário seria desencadeado com o reaparecimento dos mosquitos no final do inverno e início da época das chuvas em ambientes de clima temperado. Assim, com o avançar da primavera, as aves são mais frequentemente picadas por insetos, o que provoca o aumento da parasitemia, da capacidade de infecção do mosquito e assegura a futura transmissão do parasito. Os autores levantaram a hipótese de que essa plasticidade fenotípica tenderia a ocorrer em

parasitos que evoluíram em ambientes de altas latitudes, onde os vetores não estão disponíveis em determinada época do ano. Além disso, modelos matemáticos desenvolvidos nesse mesmo trabalho apontaram que tal plasticidade, e consequente capacidade de provocarem recaídas, não seriam características de parasitos de climas tropicais, uma vez que a presença de vetores e a transmissão da malária aviária é considerada estável ao longo do ano. Essa predição merece comprovação, no entanto poucos trabalhos foram realizados acerca da sazonalidade de hemosporídeos aviários em ambientes tropicais (Fallon et al. 2004, Valkiūnas et al. 2004). De todo modo, existem ambientes tropicais com sazonalidade marcante, como as Matas Secas, em que a densidade populacional de vetores não é constante (Santos 2011), o que poderia provocar alterações sazonais na prevalência e distribuição de hemosporídeos.

Oscilação na abundância de vetores ao longo do ano influencia os riscos de transmissão da malária aviária, com populações de mosquitos estáveis ao longo do ano podendo ter maior importância no ciclo da doença quando comparados com espécies que oscilam sazonalmente (Loaiza & Miller 2013). Com isso, é essencial se avaliar simultaneamente a riqueza e a distribuição de *Plasmodium/Haemoproteus* em populações de aves e de dípteros hematófagos ao longo de diferentes estágios temporais, abordagem pouco aplicada no mundo e jamais conduzida em ambientes naturais no Brasil.

### **1.7. Avaliação de hemosporídeos em mosquitos**

Apesar do amplo conhecimento acumulado acerca dos hemosporídeos aviários, pouco ainda se sabe sobre a fase do ciclo nos vetores, incluindo os aspectos ecológicos e evolutivos do sistema vetor-parasito (Santiago-Alarcon et al. 2012<sup>b</sup>). A família Culicidae apresenta mais de 40 gêneros distribuídos em todas as regiões do planeta, com maior diversidade e nível de endemidade no Neotrópico (Rueda 2008). Com a utilização de métodos moleculares (Reação em cadeia da polimerase - PCR), novas espécies de dípteros, representando diversos gêneros, têm sido identificadas como transmissoras da hemosporidiose aviária, com o maior número de trabalhos envolvendo culicídeos (SANTIAGO-ALARCON et al., 2012<sup>a</sup>). No entanto, pouco se sabe sobre vetores de *Plasmodium/Haemoproteus* no Brasil. Estudos experimentais da década de 1940 apontaram as espécies *Anopheles norestensis*, *Aedes lepidus* e *Culex quinquefasciatus* como possíveis vetores de *Plasmodium cathemerium*, *Plasmodium gallinaceum* e

*Plasmodium juxtannucleare*, respectivamente (revisado por Santiago-Alarcon et al., 2012<sup>b</sup>).

Um estudo realizado no zoológico de São Paulo descreveu dois casos de infecção por *P. relictum* em pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Neste mesmo trabalho, foram capturadas 188 fêmeas de mosquito no local e estas foram testadas quanto à presença de *Plasmodium* por PCR. Apenas um espécime de *Culex* (*Cux.*) sp. foi positivo para *P. relictum*, apontando este gênero como possível vetor no local de estudo (Bueno et al. 2010). Percebe-se, portanto, que existe uma grande lacuna no conhecimento acerca de vetores da hemossporidiose no Brasil, tanto na descrição de espécies envolvidas na transmissão quanto na caracterização da interação vetor-parasito-vertebrado em ambientes naturais.

Comparativamente a outras regiões biogeográficas, o Neotrópico possui uma grande riqueza de linhagem de hemossporídeos, e apresenta maior prevalência de *Plasmodium* quando comparado ao *Haemoproteus* (Clark et al. 2014). A grande riqueza de hospedeiros vertebrados dessa região pode explicar a riqueza de ambos os gêneros de parasitos (Lacorte et al. 2013, Svensson-Coelho et al. 2014), mas fatores que determinam maiores taxas de infecção por *Plasmodium* em detrimento de *Haemoproteus* permanecem obscuros. Nessa região, interações entre parasitos e vetores podem ter exercido diferentes pressões evolutivas nos gêneros acima citados, uma vez que eles são transmitidos por diferentes famílias de dípteros. Com isso, é essencial o entendimento acerca da riqueza de vetores em várias regiões do Neotrópico para abordar essa questão.

Vetores com maior espectro alimentar podem favorecer a transmissão de patógenos entre diferentes espécies de vertebrados, dinamizando as interações parasito-hospedeiro com novas associações (Farajollahi et al. 2011). A avaliação de hemossporídeos em paralelo à fonte alimentar de dípteros tem sido realizada em ambientes naturais (Kim et al. 2009, Santiago-Alarcon et al. 2012<sup>a</sup>) e artificiais (Kim & Tsuda 2010, Ejiri et al. 2011), o que favorece o entendimento das relações ecológicas e evolutivas desse sistema de transmissão.

## **1.8. Matas Secas e a sucessão ecológica secundária**

As florestas tropicais estacionais decíduais (FTED), também conhecidas como Matas Secas, compõem uma fitofisionomia caracterizada por, pelo menos, 50% de

deciduidade durante a estação seca do ano. Além disso, estão inseridas em regiões com um período seco severo que compreende cerca de 5-6 meses do ano. Este é um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo, cujas principais áreas remanescentes se encontram na América do Sul e Central, sobretudo no Brasil (Miles et al. 2006, Quesada et al. 2009, Nassar et al. 2013).

No Brasil, as Matas Secas se estendem por 27.367.815 ha, representando 3,2% do território nacional, com apenas 3,9% (ou 1.072.946 ha) dessa área protegida em unidades de conservação (Sevilha et al. 2004). Minas Gerais possui umas das maiores áreas de Mata Seca do Brasil, no entanto, mais de 50% dessas áreas naturais originais já foram perdidas. Análises de imagens de satélite demonstraram que o norte do estado perdeu cerca de 2.200 Km<sup>2</sup> de Matas Secas entre os anos de 1986 e 2006, que ao início possuía uma área de 19.200 Km<sup>2</sup>, perfazendo um desmatamento de 11,5% (Sanchez-Azofeifa et al. 2013). A substituição destes ambientes naturais deve-se a ocupações humanas, extrativismo vegetal e ao emprego de atividades agrícolas, fato que se agrava por essas formações possuírem solos mais ricos quando comparados aos biomas do entorno (Sevilha et al. 2004, Espírito-Santo et al. 2009).

Entre os anos de 1986 e 2006, no norte do estado de Minas Gerais, 550 Km<sup>2</sup> de áreas previamente destinadas para a pecuária e outras atividades foram abandonadas e atualmente estão em algum estágio de sucessão ecológica (Sanchez-Azofeifa et al. 2013). Este mosaico de matas em diferentes estágios de sucessão é uma característica predominante das Matas Secas no Brasil atualmente (Nassar et al. 2013).

A regeneração de florestas por meio da sucessão ecológica secundária pode mitigar os impactos da conversão de áreas naturais, melhorando a qualidade dos habitats. Este processo natural é baseado em mudanças contínuas de dominância florestal entre espécies pioneiras de vida curta e espécies de vida longa que apresentam habilidades competitivas e que sejam tolerantes às condições ambientais locais (Finegan 1996, Guariguata & Ostertag 2001). Décadas após o abandono de áreas degradadas, estágios avançados de sucessão ecológica apresentam a complexidade (e.g.: número e tipos de espécies) e estrutura (e.g.: altura das árvores, densidade) de florestas secundárias maduras (Miles et al. 2006, Alvarez-Anorve et al. 2012, Arroyo-Rodríguez et al. 2015). No entanto, existe alguma controvérsia referente à eficiência de florestas secundárias em sustentar grande biodiversidade local em longo prazo (Brook et al. 2006). De qualquer modo, a recuperação de florestas indubitavelmente altera a comunidade da fauna e flora

(Dunn 2004), aumentando a diversidade local de animais dependentes de florestas (Pardini et al. 2010, Moura et al. 2013).

A proteção das Matas Secas brasileiras tem sido promovida através do abandono de áreas previamente utilizadas como áreas de pastagem, com consequente recuperação e reestabelecimento de florestas secundárias (Espírito-Santo et al. 2009, Portillo-Quintero & Sánchez-Azofeifa 2010). Este processo tem aumentado a diversidade e estrutura vegetal local (Madeira et al. 2009, Pezzini et al. 2014), levando a mudanças nas interações inseto-plantas (Neves et al. 2014) e na distribuição de vertebrados como morcegos (Nassar et al. 2013, Falcão et al. 2014) e aves (Nassar et al. 2013).

A sazonalidade das Matas Secas altera bruscamente a disponibilidade e a abundância de recursos-chave para a fauna, tais como alimento e abrigo, o que pode influenciar a composição temporal da comunidade de aves (Dornelas et al. 2012, Almazán-Núñez et al. 2015). Alterações sazonais também influenciam a comunidade de culicídeos, com riqueza e abundância menores na época seca quando comparada às estações chuvosas (Santos 2011). O mesmo trabalho constatou mudanças na composição da comunidade de mosquitos em área de pastagem alguns meses após a remoção dos bovinos até então presentes. Mosquitos das espécies *Anopheles albitarsis* e *Mansonia titillans* foram observados como indicadores da fase com e sem gado, respectivamente.

## 2. JUSTIFICATIVA

São notórios os efeitos antrópicos sobre a perda de habitat e a consequente diminuição da biodiversidade. Com isso, a preservação de áreas naturais e o favorecimento da recuperação de localidades degradadas despontam como importantes estratégias conservacionistas. A legislação brasileira determina que áreas desmatadas ilegalmente sejam recuperadas (Vieira & Scariot 2006). Desta forma, o entendimento dos efeitos da sucessão ecológica sobre o ecossistema local faz-se necessário. Na Mata Seca, aumento da diversidade da fauna e flora foram reportados em estágios de sucessão mais avançados. No entanto, a população de parasitos nunca foi avaliada nessas condições, apesar de se reconhecer que esses organismos compõem parte considerável da riqueza e da biomassa de espécies de qualquer sistema natural (Lafferty et al. 2006). Além disso, pouco se sabe como a sucessão ecológica pode alterar comunidades de animais vertebrados e patógenos relacionados a estes hospedeiros. Espera-se que as interações

entre parasito, seus vetores e seus hospedeiros vertebrados sejam diferentes quando comparados locais em diferentes estágios de sucessão ecológica secundária.

A interação entre diversos fatores, tais como o estado imunológico, disponibilidade de alimento e de abrigo e estresse ambiental podem ter efeitos inesperados na propagação de doenças entre animais silvestres (Valkiūnas 2005). Assim, os diferentes perfis sazonais nos quais as aves da Mata Seca estão inseridas podem provocar alterações temporais e espaciais no perfil de hemosporídeos nessas populações. Por exemplo, a marcante sazonalidade das Matas Secas limita a disponibilidade de alimento e de recursos hídricos, o que pode aumentar o estresse fisiológico das aves na estação reprodutiva. Com isso, é esperada uma variação sazonal na prevalência e distribuição de hemosporídeos nas comunidades de aves inseridas nas Matas Secas.

As aves são importantes indicadores de qualidade ambiental e portanto, a avaliação de seus parasitos tem relevância não apenas do ponto de vista ecológico e evolutivo das espécies, mas também por apresentarem implicações na conservação das mesmas (Braga et al. 2011). Alterações ambientais podem provocar o aumento de efeitos deletérios dos hemosporídeos em aves, e mudanças na dinâmica destes parasitos pode afetar comunidades de hospedeiros vertebrados, colocando em risco programas de conservação.

Além disso, a identificação de vetores destes parasitos poderá contribuir para o entendimento global acerca da hemosporidiose aviária, tendo em vista que o aumento da prevalência em aves provavelmente decorre de alterações na dinâmica das populações de vetores e/ou de suas associações com as comunidades de aves hospedeiras. Com isso, uma abordagem completa com a análise de mosquitos coabitantes com as aves avaliadas pode fornecer dados mais robustos sobre a epidemiologia da hemosporidiose em áreas tropicais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da sucessão ecológica e da sazonalidade na transmissão de hemosporídeos aviários em uma floresta estacional decídua.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito da sucessão ecológica na comunidade de aves no Parque Estadual da Mata Seca.
2. Avaliar o efeito da sucessão ecológica na prevalência e diversidade de hemosporídeos aviários.
3. Avaliar o efeito da sazonalidade sobre a prevalência e a diversidade de hemosporídeos em aves capturadas no PEMS.
4. Avaliar o efeito da sucessão ecológica na abundância e distribuição de espécies de mosquitos no PEMS.
5. Avaliar o efeito da sazonalidade na abundância e distribuição de espécies de mosquitos do PEMS.
6. Identificar possíveis vetores de *Plasmodium* aviário no PEMS.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Área de estudo

O estudo foi conduzido no Parque Estadual da Mata Seca (PEMS), situado no município de Manga, no Vale do Médio São Francisco entre as coordenadas 14°48'36" – 14°56'59" S e 43°55'12" – 44°04'12" W. O PEMS, criado no ano de 2000 e administrado pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF), possui uma área de aproximadamente 15.500 hectares. O clima da região é classificado como tropical com verão seco, possui temperatura média anual de 23,4°C e precipitação anual média de 886 mm. A estação seca tem início em maio, com precipitação média de 6 mm, com os quatro meses subsequentes recebendo menos de 10 mm mensais, determinando uma estação seca acentuada no inverno (Figura 3). A estação chuvosa tem início em outubro e atinge o pico entre dezembro e janeiro, com pluviosidade mensal de 200 mm (Alvares et al. 2013).



**Figura 3:** Estágio de sucessão tardio de Mata Seca na época das chuvas (à esquerda) e na época da seca (à direita). Foto: Diego Oliveira Brandão

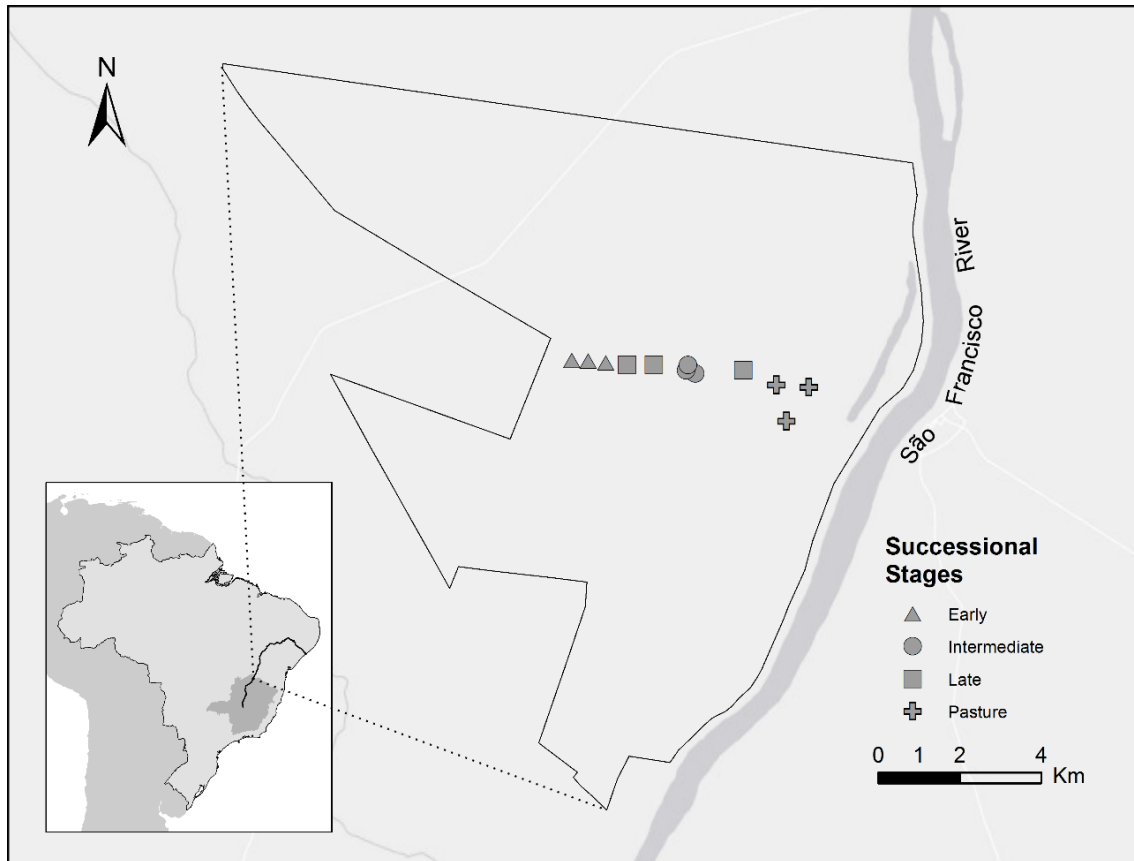
Aproximadamente 1.520 hectares do PEMS consiste em pastagens abandonadas que se encontram em diferentes estágios de sucessão ecológica. O restante da área é caracterizado como um mosaico de florestas estacionais decíduas primárias e secundárias, cujas árvores perdem até 95% de suas folhas durante a estação seca (Madeira et al. 2009, Pezzini et al. 2014).

## 4.2. Coleta de dados

### 4.2.1. Descrição da área de estudo

As aves foram amostradas em áreas representando quatro estágios diferentes de sucessão ecológica. A área definida como “pastagem” foi utilizada para criação extensiva de gado por mais de uma década e foi abandonada no ano de 2008, cinco anos antes do início das coletas (ver mais detalhes sobre as épocas de coleta abaixo). A área era coberta por gramíneas exóticas e possuía árvores e arbustos esparsos. Apesar da sucessão ecológica ser um processo em andamento na “pastagem”, nós definimos como estágio “inicial” de sucessão áreas de pastagem que foram abandonadas no ano 2000, 13 anos antes do início dos estudos. Esse estágio era dominado por um único estrato arbóreo de árvores jovens. O estágio “intermediário” representava áreas de pastagem abandonadas 30 anos antes da realização dos nossos estudos. Essa vegetação era composta por dois estratos arbóreos, com árvores de cerca de 10-12 m de altura; e um estrato inferior de árvores jovens, arbustos e alta densidade de lianas. Finalmente, o estágio “tardio” de sucessão ecológica representa áreas que não possuem registro de intervenção humana há mais de 50 anos, e que também possui dois estratos arbóreos, com árvores altas de copas contínuas a 18-20 metros de altura do solo. O estrato inferior consistia em baixas densidades de árvores jovens e lianas. Maiores informações sobre a fitofisionomia do PEMS podem ser encontradas em Madeira et al. (2009) e Pezzini et al. (2014). O parque conta ainda com um conjunto de lagoas situadas na margem esquerda do Rio São Francisco que formam um sistema de pulso de inundação no período de cheia, quando estas se conectam ao rio.

As capturas foram realizadas em quatro períodos distintos: no final da época chuvosa (abril de 2013), início e no final da época seca (junho e setembro de 2013, respectivamente) e pico da época chuvosa subsequente (janeiro de 2014). Para critérios de repetitividade, as coletas foram realizadas em três pontos de cada estágio sucessional, totalizando 12 pontos amostrais, e a distância entre pontos de um mesmo estágio variou entre 0,13 e 2,27 Km (Figura 4). Cada ponto amostral possuía área de 50 m por 20 m.



**Figura 4: Pontos de coletas das aves do presente estudo.** Os estágios sucessionais estão representados pelos seguintes símbolos: Inicial = triângulo; intermediário = círculo; tardio = quadrado; pastagem = cruz. Não foram realizadas capturas de mosquitos no estágio intermediário (vide “coleta de culicídeos” abaixo).

#### 4.2.2. Captura das aves e coleta de sangue

As aves foram capturadas em rede de neblina (12 m de comprimento por 3 m de altura com 20 mm de malha) com a utilização de 15 redes por ponto amostral. O período de captura era iniciado ao nascer do sol e se estendia por seis horas, com visitas às redes a cada 30 minutos para a retirada das aves. Os indivíduos capturados foram identificados e marcados com anilhas metálicas fornecidas pelo Centro de Pesquisas para Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE).

O sangue das aves foi obtido por punção da veia ulnar com o auxílio de agulha estéril (13 x 4,5mm) e coletado com tudo capilar de vidro sem anticoagulante. O volume coletado correspondia a, no máximo, 0,5% do peso da ave. O material obtido foi acondicionado em microtubos contendo álcool etílico absoluto, sendo acondicionado sob refrigeração por um período máximo de cinco dias. Posteriormente, o material foi encaminhado ao laboratório e estocado a - 20°C até a realização da extração de DNA.

### **4.2.3. Coleta de culicídeos**

Os culicídeos foram amostrados durante os mesmos períodos que as aves, com a única diferença de não terem sido instaladas armadilhas no estágio de sucessão intermediário. As capturas foram realizadas por dois métodos: durante a montagem das redes de neblina e a captura das aves, realizou-se coleta dos mosquitos que entravam em contato com os pesquisadores da equipe ou com as aves. Estes mosquitos coletados ativamente foram armazenados em frascos individuais com a anotação do horário de captura. Também foram utilizadas armadilhas de Shannon, em cujos interiores foram instaladas fontes de luz de LED para a atração de mosquitos. Esse tipo de captura foi realizada por duas horas após o anoitecer, e foi realizada com o auxílio de capturadores automáticos de 15 cm de diâmetro.

## **4.3. Processamento do sangue coletado das aves**

### **4.3.1. Extração e quantificação de DNA a partir do sangue das aves**

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 e Russel (2001). Parte do sangue estocado foi acondicionada em microtubos de 1,5 mL e secados em estufa a 37°C. Posteriormente, ao tubo foi adicionado 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, após agitação em vórtex, as amostras foram incubadas a 55°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 12900 g 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 12900 g por cinco minutos. Na etapa seguinte, a fase inferior da mistura foi cuidadosamente coletada e descartada. Ao líquido restante foi adicionado 300 µL de clorofórmio puro, e o material foi centrifugado a 12900 x g por cinco minutos. A fase inferior foi novamente descartada e aos microtubos foram

adicionados 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol puro mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os microtubos foram levemente agitados até a observação do precipitado, sendo posteriormente centrifugados a 12900 g por 15 minutos. O líquido foi descartado e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após agitação manual, o material foi novamente centrifugado a 12900 g por 15 minutos, o álcool foi descartado e o material foi mantido em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  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  $55^{\circ}\text{C}$  por uma hora e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A quantificação do DNA de todas as amostras foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®) segundo instruções do fabricante.

#### **4.4. Processamento dos culicídeos**

##### **4.4.1. Identificação e separação dos culicídeos**

Os espécimes de culicídeos coletados foram transportados ao Laboratório de Ecologia e Controle Biológico de Insetos da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) e acondicionados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem identificados na menor unidade taxonômica possível. Para isso, foram utilizadas as chaves de identificação de Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini (2002). Gêneros e subgêneros foram abreviados de acordo com Reinert (1975). Em seguida, os mosquitos foram acondicionados em frascos contendo álcool etílico absoluto. Cada frasco continha um *pool* de no máximo 10 indivíduos de uma mesma espécie coletados na mesma época e local.

Após a identificação e separação, os mosquitos foram encaminhados para o Laboratório de Malária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para serem processados visando a extração do DNA genômico. Com o auxílio de micro tesoura e micro pinças, as fêmeas não ingurgitadas tiveram suas asas, pernas e cabeça removidas, devido à capacidade inibidora da PCR exercida pela quitina (Arez et al. 2000). Posteriormente, o abdome foi separado do tórax e cada segmento foi armazenado separadamente, com um máximo de 15 partes de mosquitos por tubo (média de 9 por tubo). Com isso, a primeira parte seria testar os abdomens dos mosquitos quanto à presença de hemospórídeos através de PCR. Posteriormente, os *pools* de tóraces correspondentes aos *pools* de abdomens positivos também seriam submetidos à pesquisa por hemospórídeos, visando a detecção de parasitos presentes nas glândulas salivares dos

mosquitos (vide mais detalhes abaixo). As fêmeas ingurgitadas foram guardadas em tubos individuais para se evitar a contaminação dos demais espécimes com sangue do hospedeiro vertebrado. Foi adicionado álcool etílico absoluto aos tubos contendo mosquitos processados e fêmeas ingurgitadas para serem transportados para a Nihon University, Fujisawa, Japão.

#### **4.4.2. Extração de DNA de *pools* de mosquitos e de fêmeas ingurgitadas**

O álcool etílico absoluto foi removido e evaporado em termo bloco a 37°C das amostras a serem processadas. O DNA genômico dos abdomens foi extraído com o kit comercial QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações. Os *pools* foram homogeneizados em 80 µL de PBS estéril com o auxílio de pistilos estéreis acoplados a um triturador operado por pilhas. Posteriormente, foi adicionado 100 µl da solução ATL e 20 µl de proteinase K. As amostras foram incubadas a 56°C por um mínimo de uma hora e máximo de 18 horas. Ao material foi adicionado 200 µl do tampão AL e seguiu-se incubação 70°C por 10 minutos. Para diminuir a quantidade de quitina do produto, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por cinco minutos e o sobrenadante foi transferido para novos microtubos. Os passos seguintes seguiram estritamente o protocolo do fabricante. O DNA dos *pools* de tóraces provenientes de abdomens positivos para hemosporídeos também foram extraídos seguindo o protocolo acima. O DNA genômico das fêmeas ingurgitadas foi extraído com o kit comercial REExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit® (SIGMA) seguindo as instruções do fabricante.

### **4.5. Detecção de hemosporídeos no sangue das aves**

#### **4.5.1. Diagnóstico molecular de *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). É importante ressaltar que o gene dos parasitos de ambos os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* são amplificados na mesma reação. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados 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 IO (Phoneutria®); 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 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 denaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento a 62°C por 1 min. e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos. A denaturação inicial ocorreu a 94°C por 2 min. e a extensão final a 72°C por 3 min., finalizando a temperatura de 4°C. Os controles positivos derivaram de DNA genômico de pintinhos experimentalmente infectados com *P. gallinaceum* gentilmente cedidos pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou - CPqRR, Belo Horizonte. 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 10% e ácido acético 0,5%, 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).

#### **4.5.2. Nested-PCR para sequenciamento genético 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 c (*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  $\mu$ L de tampão de reação contendo 1X de solução tampão IO (Phoneutria®); 3 mM  $MgCl_2$ ; 0,125 mM dNTP; 1U Taq DNA polimerase (Phoneutria®); 0,4mM dos iniciadores HaemNFI e HaemNR3 e água ultra pura estéril qsp. O programa da primeira reação consiste em 25 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A denaturação inicial ocorreu a 94°C por 3 minutos e a extensão final a 72°C por 10 minutos, finalizando com temperatura de 4°C. Posteriormente, 1  $\mu$ L do produto amplificado foi misturado a 24  $\mu$ L 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.

#### **4.5.3. Purificação dos produtos da *Nested-PCR***

O método utilizado para a purificação do material amplificado é o descrito por Sambrook & Russel (2001) com modificações. Aos produtos de duas *Nested-PCR* (45 $\mu$ L) foi adicionado igual volume de uma solução de PEG 8000 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 12900 g. O sobrenadante foi descartado e ao material precipitado foi adicionado 125 $\mu$ L 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  $\mu$ L de água ultrapura estéril e o sedimento foi suspenso por pipetagem. Parte do DNA purificado (1  $\mu$ L) foi avaliado em gel de poliacrilamida 6% e o restante foi conservado a -20°C até sua utilização.

#### **4.5.4. 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 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C 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 Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia, da Escola de Veterinária da UFMG.

#### **4.5.5. Edição das seqüências genéticas e análises filogenéticas**

Os eletrocromatogramas foram avaliados quanto à qualidade e foram editados nos programas MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) e ChromasPro (Technelysium Ltd). As seqüências obtidas foram comparadas às depositadas em bancos de dados de livre acesso como o Genbank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>) e o MalAvi [Bensh et al. (2009) - <http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>]. Seqüências sem descrição prévia foram depositadas no Genbank com os números de acesso entre KP686094 e KP686108.

A relação filogenética entre as linhagens de parasitos encontradas foi realizada por inferência bayesiana utilizando o programa MrBayes 3.2.2 (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. Como grupo externo foi utilizado o parasito *Leucocytozoon schoutedeni*, como indicado por Outlaw & Ricklefs (2011).

#### **4.6. Análises moleculares dos culicídeos**

#### 4.6.1. Detecção molecular e sequenciamento genético de *Plasmodium/Haemoproteus* em pools de culicídeos

A detecção de hemosporídeos em culicídeo foi realizada primeiramente nos abdomens. Para isso, utilizou-se a *Nested-PCR* de forma semelhante à utilizada nas amostras provenientes do sangue das aves capturadas. No entanto, as PCRs possuíam os reagentes TAKARA Ex Taq® DNA Polymerase nas seguintes concentrações: Tampão 1X, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM de cada dNTP, 1 unidade de Taq e 0.4 mM de cada iniciador. Foi utilizado DNA obtido de mosquito da espécie *Culex pipiens pallens* capturado e infectado por *Plasmodium* como controle positivo e foi utilizada água ultrapura como controle negativo.

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo e revelado em luz UV. Nos casos de amostras positivas, o fragmento-alvo foi obtido a partir do gel e incubado com *thermostable beta-agarase*® Nippon Gene, seguindo as instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento, edição das sequências e a inferência filogenética seguiram padrões similares aos das análises dos parasitos obtidos a partir amostras de sangue das aves. No entanto, para as inferências filogenéticas o enraizamento foi realizado enraizada no ponto médio (midpoint rooting) do modo descrito por Outlaw & Ricklefs (2011). Além das sequencias obtidas a partir das amostras dos mosquitos, foram adicionadas sequências de *Plasmodium* spp. depositadas no MalAvi cujas morfoespécies foram previamente descritas. Bases ambíguas caracterizadas por picos duplos no eletrocromatograma foram resolvidas manualmente seguindo instruções de Matthews et al. (2016). Todas as sequências obtidas a partir dos mosquitos avaliados foram depositadas no Genbank (números de acesso entre KX068685 e KX068694).

#### 4.6.2. Análise de repasto sanguíneo

Foram realizadas PCR *semi-nested* cujos alvos são segmentos do gene *cyt b* de aves e mamíferos visando a identificação da origem do repasto sanguíneo das fêmeas ingurgitadas. Foram utilizados os iniciadores e condições de termociclador segundo Sawabe et al. (2010):

Avian-3 (f) → 5'-GACTGTGAYAAAATYCCMTTCCA-3'

Avian-4 (r) → 5'-GYCTTCAITYTTTGGYTTACAAGAC-3'

Avian-8 (r) → 5'- TCTTTGGTTTACAAGACCAATGTTT-3'

Mammalian-1 (f) → 5'- TGAYATGAAAAAYCATCGTTG-3'

Mammalian-7 (f) → 5'- AAAAACCATCGTTGTATTTCAACTA-3'

Mammalian-2 (r) → 5'- TGTAGTTRTCWGGGTCKCCTA-3'

Foram utilizados os iniciadores Avian-3 e Avian-4 na primeira reação para detectar o DNA de aves, e o produto foi utilizado na segunda reação utilizando os primers Avian-3 e Avian-8. Para a detecção do DNA de mamíferos, foram utilizados os iniciadores Mammalian-1 e Mammalian-7 na primeira reação, e o produto foi utilizado na segunda reação que continha os iniciadores Mammalian-7 e Mammalian-2. Os coquetéis das PCRs continham os mesmos reagentes na mesmas proporções da reação para a detecção de hemossporídeos em mosquitos e os ciclos do termociclador seguiu os descritos por (Sawabe et al. 2010). As reações receberam 1 µl de DNA genômico ou de produto de PCR. Os ciclos em termociclador foram idênticos para todas as reações: denaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72° por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 4 minutos. Como controles positivos das reações foi utilizado DNA proveniente de mosquitos contendo repasto sanguíneo de pinguim de Humboldt para a PCR visando a detecção de gene de aves; e foi utilizado mosquito contendo repasto sanguíneo de cabra como controle positivo para a PCR visando a detecção de DNA de mamíferos. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo das reações.

As amostras de abdomens positivos para hemossporídeos foram submetidas a ambas as PCRs previamente descritas, para testar se elas continham traços de sangue de hospedeiro vertebrado.

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados à semelhança com as amostras de mosquitos positivas para hemossporídeos, mas aqui foram utilizados apenas os iniciadores diretos (*forwards*) das segundas reações. Os eletrocromatogramas foram inspecionadas quanto à presença de picos duplos e os resultados foram comparados ao banco de dados do Genbank através do BLAST. A espécie de vertebrado com a maior identidade comparada com a sequência obtida foi considerada o hospedeiro do mosquito analisado.

#### 4.7. Análises estatísticas

A comparação da prevalência de hemosporídeos nas comunidades de aves separadas de acordo com os estágios sucessionais e por épocas de coleta foi realizada por chi-quadrado implementado no programa R (R Development Core Team 2016). Para a realização de análises posteriores, definimos como espécies bem amostradas aquelas que tiveram sete ou mais indivíduos capturados no presente trabalho. A prevalência entre aves generalistas (que foram capturadas em pastagem e nos estágios inicial, intermediário e tardio) foi comparada entre espécies que apresentaram três ou mais indivíduos capturados em pastagem e também nos demais estágios. Além disso, a prevalência foi comparada entre espécies que foram capturadas exclusivamente em áreas de pastagem e espécies que foram capturadas apenas nos estágios iniciais, intermediários e tardios (especialistas).

As abundâncias relativas das espécies de aves, mosquitos e linhagens de parasitos foram utilizadas para construir matrizes de dissimilaridade utilizando o índice Bray-Curtis e foram ordenadas por escalonamento multidimensional não métrico (*non-metric multidimensional scaling* - NMDS). Essa análise multivariada de ordenação representa a posição das comunidades de um espaço multidimensional (no caso, cada dimensão é uma espécie que compõe a comunidade englobando todas as áreas de coleta) em um número reduzido de dimensões, o que facilita a visualização gráfica. Cada comunidade seria uma parcela, ou seja, cada uma das três áreas de amostragem dentro de cada estágio sucessional, totalizando 12 parcelas para as aves (quatro estágios sucessionais avaliados) e 9 parcelas para os mosquitos (em três estágios sucessionais avaliados). Foram utilizadas duas dimensões para a representação das comunidades avaliadas no presente trabalho. Diferenças entre grupos (estágios sucessionais e épocas de coleta) foram estatisticamente testadas por análise de similaridade (One-way ANOSIM). ANOSIM compara a média das dissimilaridades Bray-Curtis entre e dentro dos grupos. Isso produz um “R” estatístico que é positivo quando a média da dissimilaridade entre grupos é maior do que a média da dissimilaridade dentro dos grupos. R se aproxima de zero quando a média das dissimilaridades entre e dentro de grupos é similar. A significância de R foi testada por permutações entre as variáveis de agrupamento.

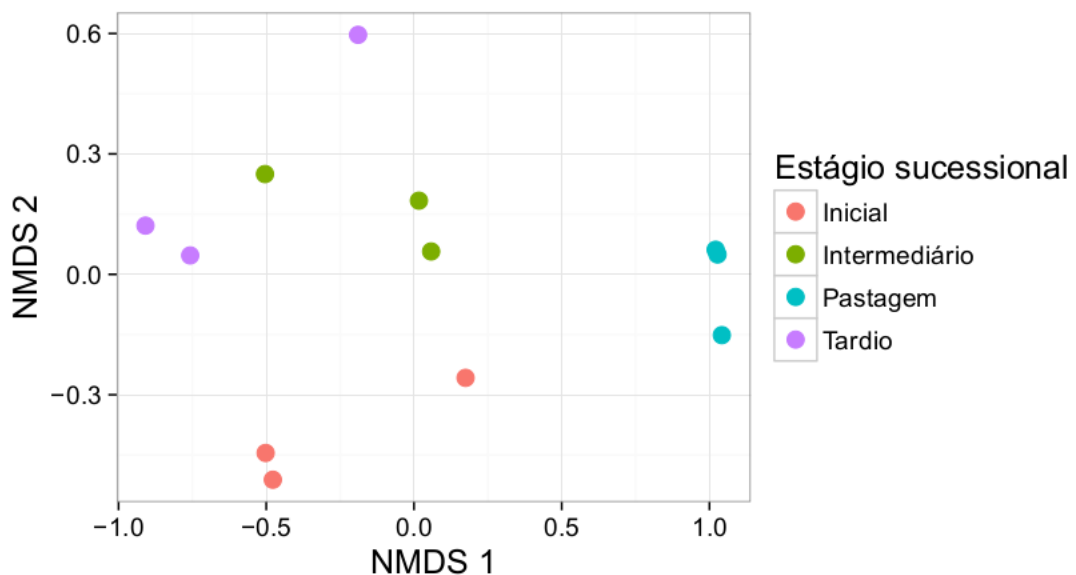
A correlação entre a dissimilaridade Bray-Curtis das aves e das linhagens de hemosporídeos foi avaliada por teste Mantel utilizando 9.999 permutações para testar a significância. Essas análises multivariadas foram realizadas com o pacote vegan (Oksanen et al. 2016) implementado em ambiente R.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Prevalência e diversidade de hemossporídeos em aves hospedeiras

#### 5.1.1. Distribuição das aves

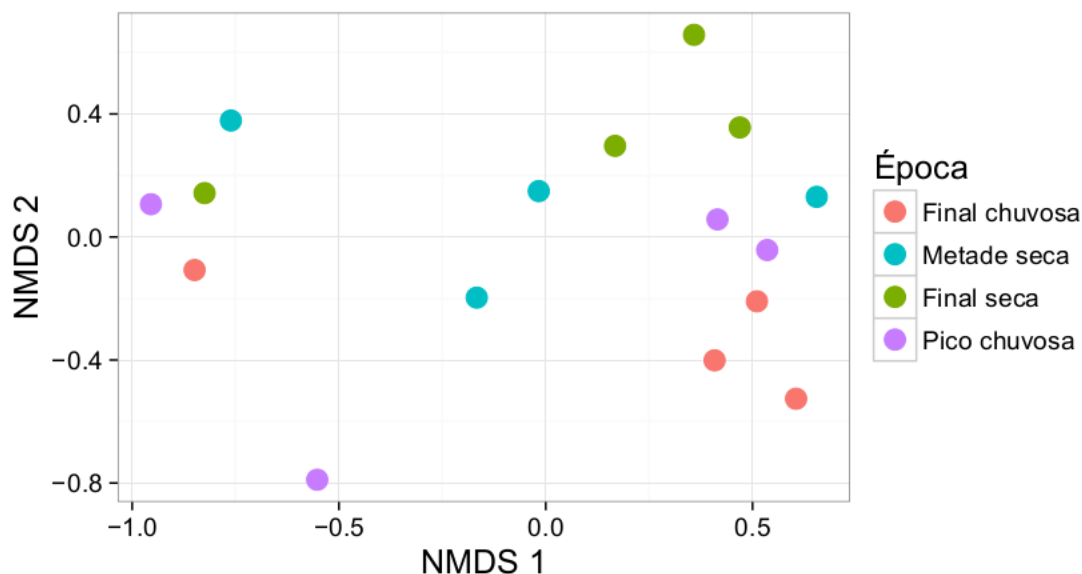
No total, foram amostradas 461 aves pertencentes a cinco ordens (Columbiformes, Galbuliformes, Passeriformes, Piciformes e Psittaciformes), constituindo um total de 21 famílias e 64 espécies. A NMDS revelou diferença na distribuição das comunidades de aves entre estágios sucessionais (Figura 5). Nota-se uma diferença ainda mais marcante quando comparamos as áreas de pastagem às áreas de não pastagem (demais estágios sucessionais) (ANOSIM;  $R = 0,979$ ;  $P = 0,005$ ). Das espécies bem amostradas, três foram específicas de áreas de pastagem; nove específicas dos demais estágios sucessionais; e cinco foram identificadas como generalistas (Apêndice 1).



**Figura 5:** Análise de escalonamento multidimensional não métrico (NMDS: *nonmetric multidimensional scaling*) evidenciando a dissimilaridade entre as comunidades de aves entre os diferentes estágios sucessionais. Houve diferença entre áreas de pastagem e demais estágios (ANOSIM;  $R = 0,979$ ;  $P = 0,005$ ).

Não houve diferença na composição das aves em função da sazonalidade, demonstrando que não há variação na riqueza e abundância geral das aves amostradas (Figura 6). Das 20 espécies bem amostradas, *C. pileatus* e *T. pelzelni* foram comumente

encontrados em todas as coletas. Por outro lado, *Myiopagis viridicata* (n = 19) foi capturada apenas na estação chuvosa. No entanto, não foram capturadas espécies exclusivas da estação seca (Apêndice 2).



**Figura 6: NMDS das comunidades de aves capturadas ao longo das diferentes épocas no PEMS.**

Não houve diferença na dissimilaridade entre comunidades agrupadas por época do ano (ANOSIM;  $R = 0,059$ ;  $P = 0,675$ ).

### 5.1.2. Prevalência geral e diversidade de parasitos

Das 461 aves analisadas quanto à presença de *Plasmodium*/*Haemoproteus*, 193 (41,9%) foram positivas, evidenciando infecção em 46 espécies (vide apêndice 1). Analisando apenas as 20 espécies mais comumente amostradas, foi constatado que a prevalência de infecção por hemosporídeos foi associada à espécie do hospedeiro (chi-quadrado = 50,6; g.l. = 19;  $P < 0,001$ ), variando de 0% (*Conirostrum speciosum*; n = 7) a 75% (*Columbina squammata*; n = 12).

Todas as 193 amostras positivas na PCR de diagnóstico foram submetidas à *Nested-PCR*, cujo alvo é o *cyt b* do parasito, para posterior sequenciamento. Das 97 amostras positivas pela *nested-PCR*, foi possível obter 81 sequências genéticas de excelente qualidade (41%). Foram detectadas sequências do gênero *Plasmodium* em 63 aves, perfazendo 19 linhagens únicas; 18 sequências foram atribuídas ao gênero *Haemoproteus*, com seis linhagens únicas pertencendo ao subgênero *Haemoproteus* (em 11 sequências obtidas) e cinco linhagens pertencendo ao subgênero *Parahaemoproteus* (em 7 sequências obtidas). Cabe ressaltar que uma linhagem genética, ou haplótipo, 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 & Ricklefs 2014). Sequência genética se refere ao resultado obtido após o sequenciamento do parasito presente em cada ave. Por exemplo, sequências obtidas de várias aves podem revelar a mesma linhagem de um parasito, mostrando que um parasito pode infectar mais de uma ave.

Com base nesses conceitos, das 30 linhagens encontradas, 16 foram detectadas apenas uma vez, quatro linhagens foram detectadas duas vezes, quatro linhagens foram detectadas três vezes e seis linhagens foram detectadas quatro ou mais vezes. Um total de 15 novas linhagens foram detectadas pela primeira vez neste estudo (sete de *Plasmodium* e oito de *Haemoproteus*, Apêndice 3).

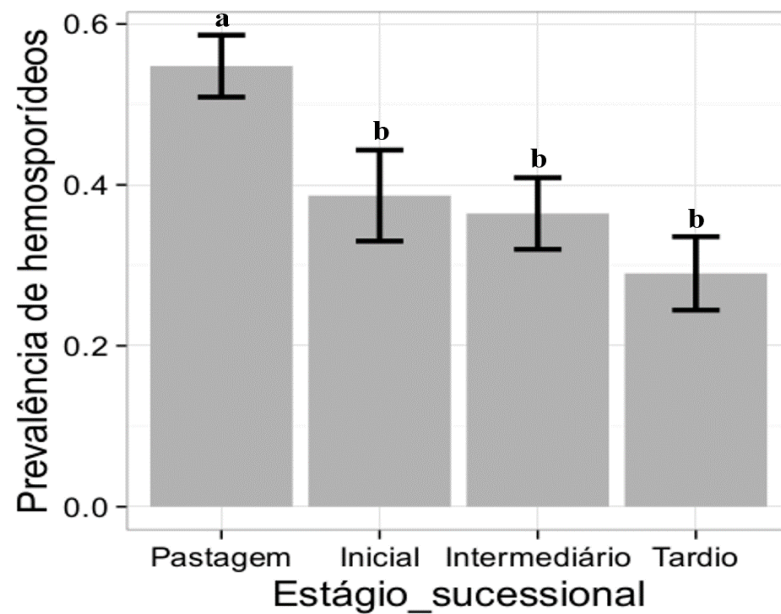
### 5.1.3. Prevalência de hemosporídeos ao longo dos estágios sucessionais

A prevalência de hemosporídeos nas aves variou ao longo dos estágios sucessionais (chi-quadrado = 20,02; g.l. = 3;  $P < 0,001$ ; Tabela 1; Figura 7) e foi mais elevada entre indivíduos capturados em áreas de pastagem do que entre aqueles capturados nos demais estágios sucessionais (pastagem vs inicial, chi-quadrado = 4,75; g.l. = 1;  $P = 0,029$ ; pastagem vs intermediário, chi-quadrado = 8,62; g.l. = 1;  $P = 0,003$ ; pastagem vs. tardio, chi-quadrado = 15,775; g.l. = 1;  $P = < 0,001$ ). No entanto, não houve diferença na prevalência de infecção por hemosporídeos entre os estágios inicial, intermediário e tardio (chi-quadrado = 2,11; g.l. = 2;  $P = 0,3478$ ).

**Tabela 1: Número de aves amostradas e prevalência de hemosporídeos de acordo com a sazonalidade e com os estágios sucessionais no PEMS.**

	Final chuva	Metade seca	Final seca	Pico chuva	Total
Estágio Sucessional	n (prev %)	n (prev %)	n (prev %)	n (prev %)	n (prev %)
Pastagem	34 (52,9%)	28 (46,4%)	44 (56,8%)	60 (58,3%)	168 (54,8%)
Inicial	27 (22,2%)	11 (27,3%)	29 (58,6%)	8 (37,5%)	75 (38,7%)
Intermediário	28 (28,6%)	39 (23,1%)	28 (46,4%)	23 (56,5%)	118 (36,4%)
Tardio	30 (33,3%)	24 (20%)	23 (26,1%)	23 (34,8%)	100 (29%)
<b>Total</b>	<b>119 (35,3%)</b>	<b>102 (29,4%)</b>	<b>126 (49,2%)</b>	<b>114 (51,7%)</b>	<b>461 (41,6%)</b>

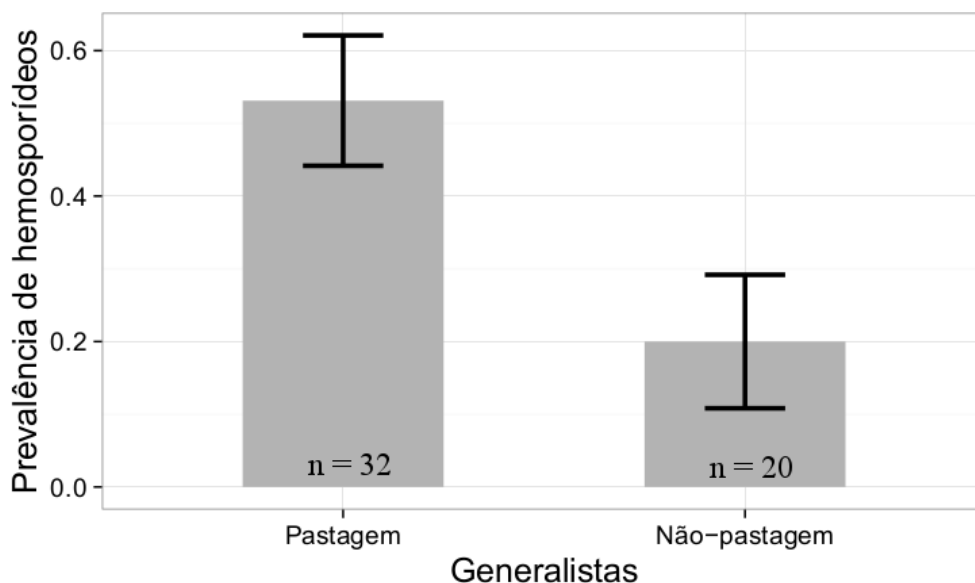
n = número de aves amostradas; prev = prevalência de *Plasmodium/Haemoproteus* avaliada pela PCR diagnóstica.



**Figura 7: Prevalência de hemospóridios de acordo o estágio sucessional em que as aves foram capturadas no Parque Estadual da Mata Seca.** Letras diferentes sobre as barras representam diferença significativa da prevalência entre os estágios sucessionais. Chi-quadrado = 20,02; g.l. = 3;  $P < 0,001$ .

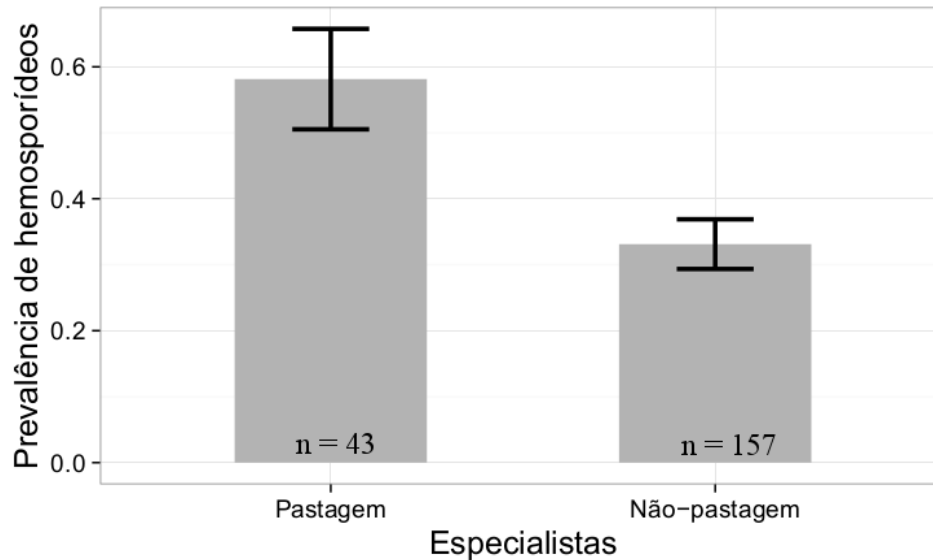
A prevalência de hemospóridios foi maior em áreas de pastagem em relação às áreas de não-pastagem quando avaliadas apenas as espécies de aves generalistas (Figura 8): *Columbina squammata*, *Myiarchus tyrannulus*, *Myiodynastes maculatus*, *Nystalus maculatus*, *Turdus amaurochalinus* [pastagem = 53,1% (17 positivos; n total = 32); não-pastagem = 20% (4 positivos, n total = 20); chi-quadrado = 4,318; g.l. = 1;  $P = 0,037$ ]. Essas espécies foram detectadas frequentando áreas abertas e áreas de mata no PEMS (Dornelas 2010), indicando congruência com os dados levantados no presente trabalho.





**Figura 8: Prevalência de hemosporídeos nas espécies de aves generalistas de acordo com o local de captura.** Espécies generalistas: *Columbina squammata*, *Myiarchus tyrannulus*, *Myiodynastes maculatus*, *Nystalus maculatus*, *Turdus amaurochalinus*: chi-quadrado = 4,318; g.l. = 1;  $P = 0,037$ .

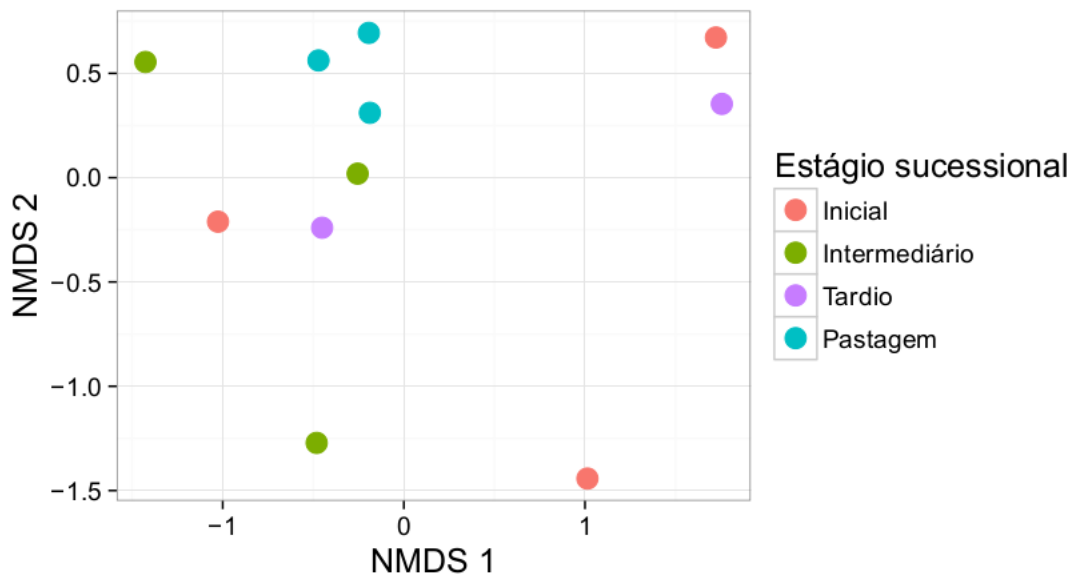
O mesmo efeito foi observado na prevalência de hemosporídeos quando foram comparadas as espécies de aves exclusivas de cada área [pastagem = 58% (25 positivos; n total = 43); não-pastagem = 33,1% (52 positivos; n total = 157); chi-quadrado = 7,898 g.l. = 1;  $P = 0,005$ ; Figura 9]. Aves exclusivas de pastagem foram classificadas como independentes de mata, sendo as aves de não-pasto previamente classificadas como dependentes ou semi-dependentes de matas no PEMS, não sendo encontradas em áreas abertas (Dornelas 2010). *Coryphospingus pileatus* foi analisado separadamente devido ao elevado número de espécimes capturados em todos os estágios e não houve diferença na prevalência quando comparada entre os indivíduos dos quatro estágios sucessionais [prevalência geral de 58,8% (n = 90); chi-quadrado = 0,49; g.l. = 3;  $P = 0,921$ ] ou quando separados entre capturados em pastagem e não-pastagem (chi-quadrado = 0,053; g.l. = 1;  $P = 0,8175$ ).



**Figura 9: Prevalência de hemosporídeos nas espécies de aves exclusivas de áreas de pastagem e em espécies encontradas apenas nos estágios inicial, intermediário e tardio.** Espécies de áreas de pastagem: *Ammodramus humeralis*, *Columbina picui*, *Volatinia jacarina*. Espécies de áreas de não-pastagem: *Basileuterus flaveolus*, *Cnemotriccus fuscatus*, *Formicivora melanogaster*, *Hemitriccus margaritaceiventer*, *Lathrotriccus eulerei*, *Sittasomus griseicapillus*, *Thamnophilus pelzelni*, *Tolmomyias flaviventris*. Chi-quadrado = 7,898 g.l. = 1;  $P = 0,005$ .

#### 5.1.4. Diversidade de hemosporídeos nas aves ao longo dos estágios sucessionais

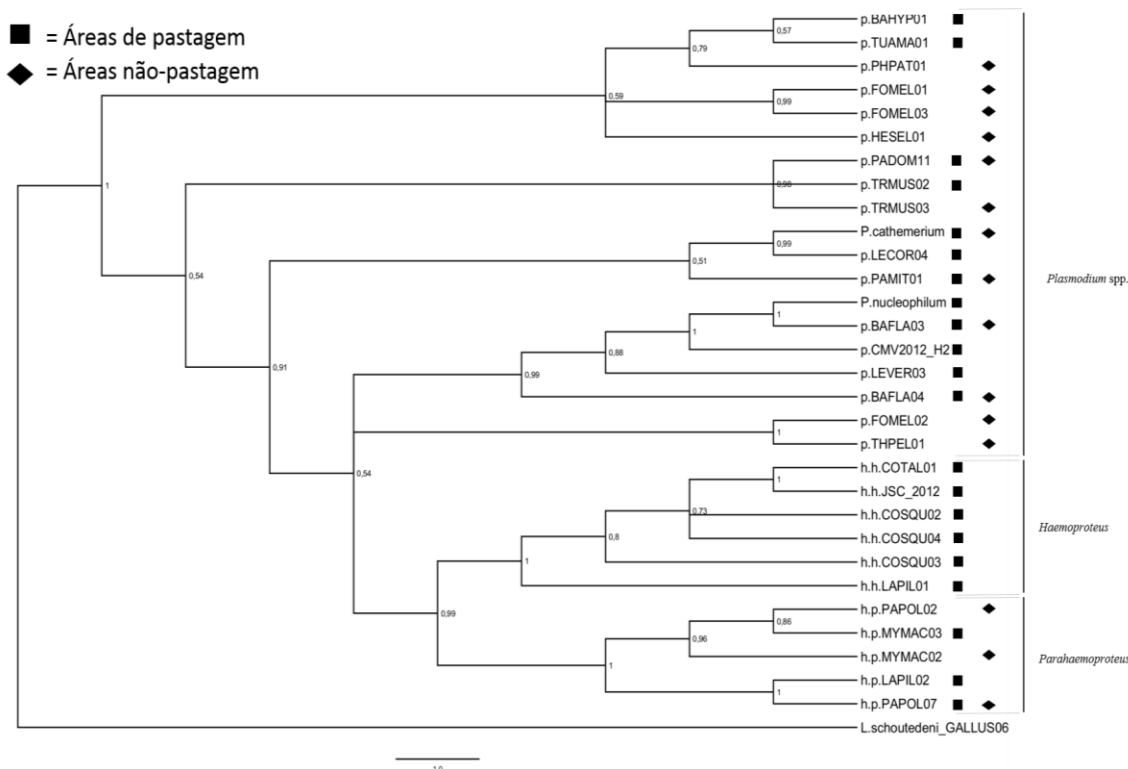
A comunidade de parasitos foi similar entre os estágios sucessionais de acordo com o NMDS (Figura 10), sem dissimilaridade significativa entre os estágios (ANOSIM;  $R = 0,098$ ;  $P = 0,254$ ). Além disso, não houve correlação entre a dissimilaridade das comunidades de aves e de parasitos (Teste de correlação Mantel;  $R = 0,184$ ;  $P = 0,10$ ).



**Figura 10: NMDS mostrando a dissimilaridade entre as comunidades de hemosporídeos obtidos em diferentes estágios sucessionais.** Não houve diferença na dissimilaridade das comunidades entre estágios (ANOSIM;  $R = 0,098$ ,  $P = 0,254$ ). Um ponto de coleta do estágio tardio não está representado devido à ausência de obtenção de linhagens de parasitos.

Com exceção da linhagem BAFLA03, aves da família *Thamnophilidae* apresentaram-se infectadas por parasitos do gênero *Plasmodium* que não foram detectados em indivíduos de outras famílias. Estas linhagens (FOMEL01, FOMEL02, FOMEL03, HESEL01 e THPEL01) conseqüentemente foram encontradas apenas em áreas de não pastagem e estão inseridas em dois clados distantemente relacionados (Figura 11).

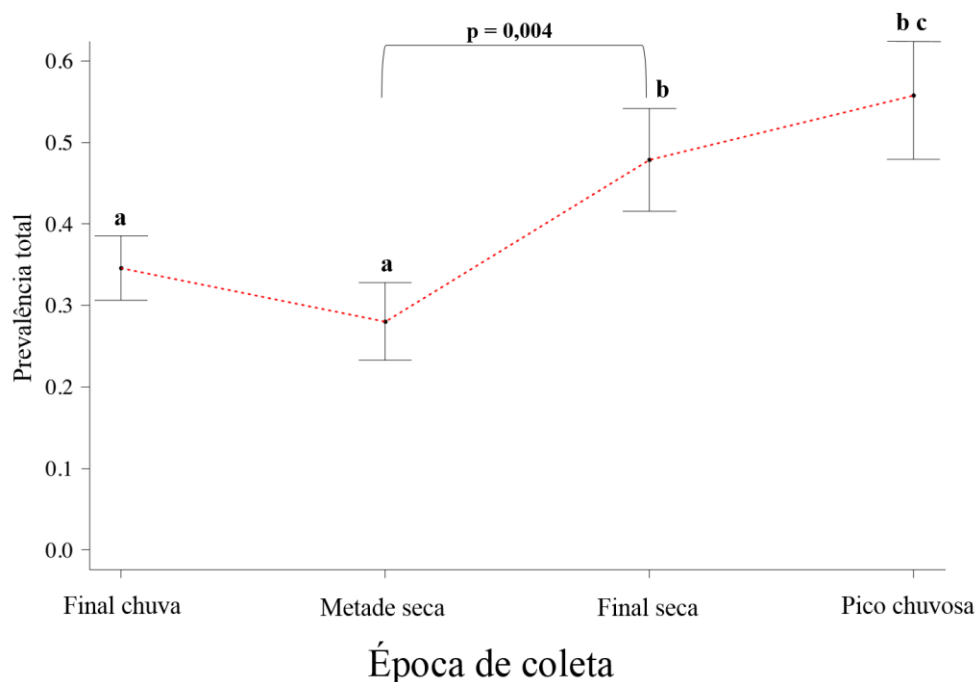
Foram detectados parasitos do subgênero *Haemoproteus* apenas nas áreas de pastagem, com seis linhagens únicas obtidas após a análise de 11 sequências (Figura 11). Quatro das cinco espécies de Columbiformes capturadas e uma espécie de Passeriformes (*Coryphospingus pileatus*) foram positivas para este subgênero ao longo das quatro épocas amostradas. Das sete detecções do subgênero *Parahaemoproteus*, duas foram em *C. pileatus* e uma em *M. maculatus* em áreas de pastagem e quatro foram detectadas em diferentes espécies de Passeriformes capturados no estágio intermediário, área de não-pastagem.



**Figura 11: Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de hemosporídeos de acordo com a captura de seus hospedeiros em áreas de pastagem ou não-pastagem.** Os valores de probabilidades posteriores estão representados em cada dicotomia. O comprimento dos ramos estão ilustrados de acordo com o número de mudanças de nucleotídeos (vide escala). Siglas que precedem os nomes das linhagens: p. = *Plasmodium*; h.h. = *H. (Haemoproteus) spp.*; h.p. = *H. (Parahaemoproteus) spp.* Grupo externo = *Leucocytozoon schoutedeni*.

### 5.1.5. Variação sazonal da prevalência de hemosporídeos nas aves

A prevalência de hemosporídeos revelou que aves capturadas no final da estação chuvosa e na metade da estação seca subsequente apresentaram taxas similares de infecção [36.2% (43/119) vs. 29.4% (30/102); chi-quadrado = 0.838; g.l. = 1;  $P = 0.359$ ]. No entanto, a prevalência aumentou no fim da estação seca [29.4% (30/102) vs. 49.2% (26/126); chi-quadrado = 8.372; g.l. = 1;  $p = 0.004$ ], mantendo-se constante no pico da estação chuvosa seguinte [49.2% (62/126) vs. 51.7% (59/114); chi-quadrado = 0.07; g.l. = 1;  $p = 0.791$ , Figura 12].



**Figura 12: Prevalência geral de hemosporídeos (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) ao longo das épocas de coleta no PEMS.** Notar aumento significativo da prevalência entre a metade e o final da época seca.

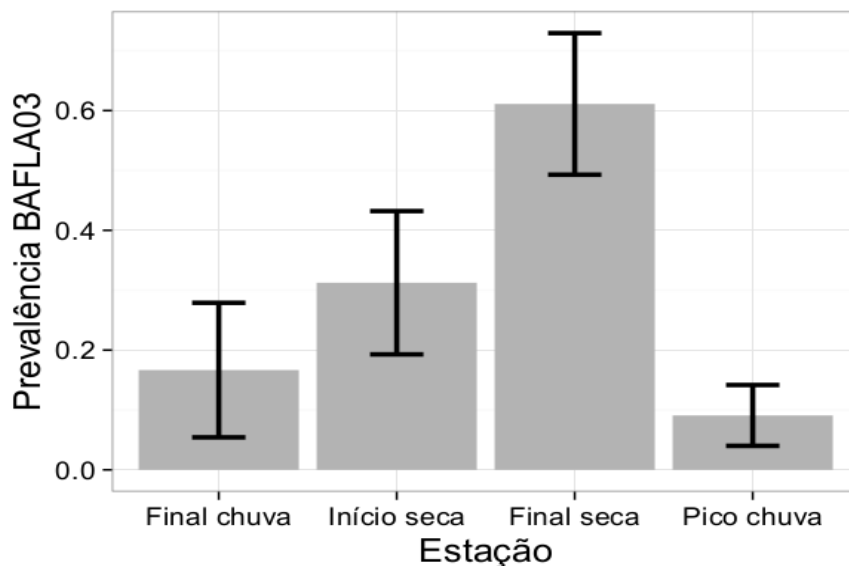
A prevalência também aumentou entre a metade e o final da estação seca em *Thamnophilus pelzelni* [20% (2/10) vs. 72,7% (8/11); chi-quadrado = 3,915; g.l. = 1;  $P = 0,047$ ], mas a diferença não foi significativa para *Coryphospingus pileatus* [48% (n = 27) vs. 67,7% (n = 31); chi-quadrado = 2,284; g.l. = 1;  $P = 0,130$ ] duas espécies bem amostradas nas duas épocas chuvosas (Apêndice 2).

Para eliminar a interferência de *H. (Haemoproteus) spp.* na avaliação sazonal, as aves da ordem Columbiformes foram excluídas da análise e o padrão da prevalência na estação seca se manteve o mesmo (chi-quadrado = 9,26; g.l. = 1;  $P = 0,002$ ). Como parasitos do subgênero *Parahaemoproteus* não foram detectados na estação seca (vide sazonalidade da distribuição dos parasitos abaixo), é seguro afirmar que eles não participaram do aumento da prevalência entre a metade e o final da época seca.

### 5.1.6. Distribuição dos parasitos ao longo das épocas do ano

Foi examinada a sazonalidade da linhagem de *Plasmodium* mais comum no presente estudo (BAFLA03, n = 21). Essa linhagem foi detectada em oito espécies pertencentes a quatro famílias da ordem Passeriformes. Sua prevalência relativa ao final

da estação chuvosa foi de 16,7% (2/12) e se manteve constante em direção à metade da estação seca (31,25%; 5/16; chi-quadrado = 0,194; g.l. = 1;  $P = 0,659$ ). O aumento da prevalência relativa dessa linhagem ao final da estação seca não foi significativo (61,1%; 11/18; g.l. = 1;  $P = 0,162$ ), mas a dominância da BAFLA03 diminuiu no pico da estação chuvosa (8,5%; 3/35; chi-quadrado = 14,76; g.l. = 1;  $P = 0,0001$ ; Figura 13).



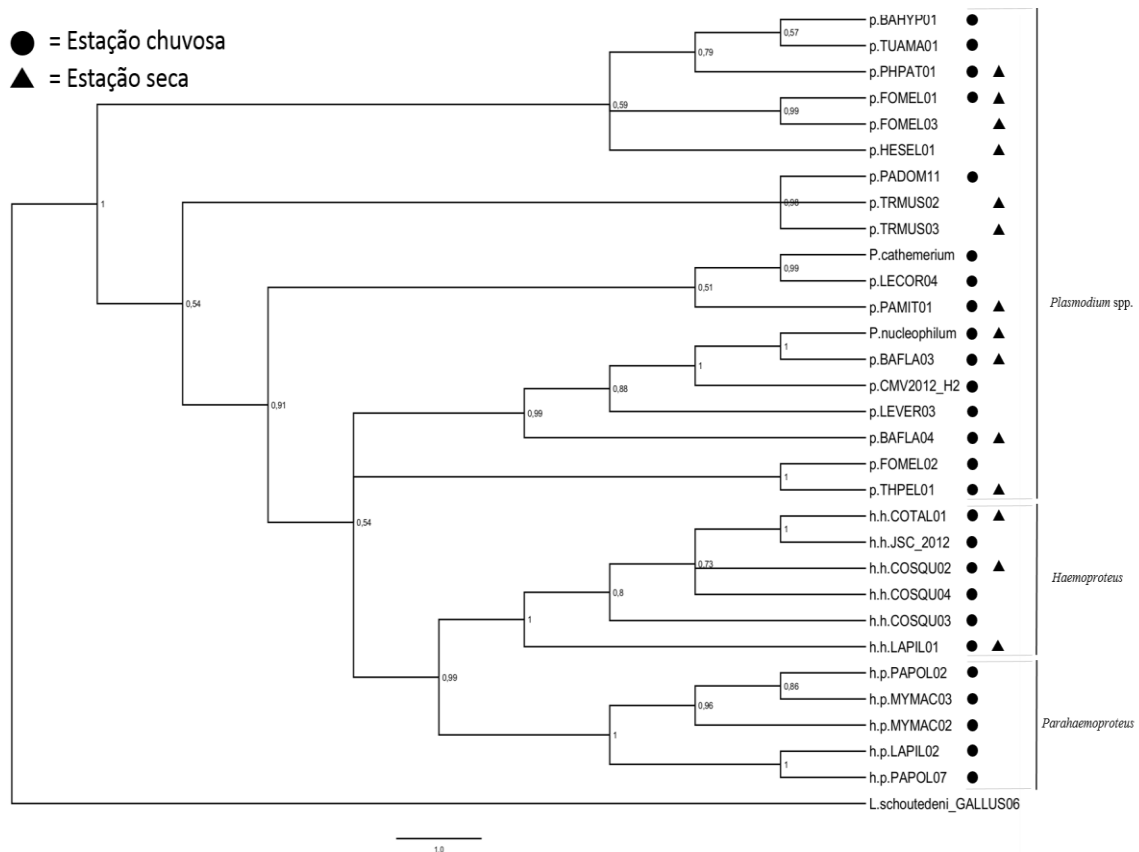
**Figura 13: Prevalência relativa da linhagem de *Plasmodium* BAFLA03 ao longo das épocas de coleta.** Diferença significativa ocorreu apenas entre o final da época seca e o pico da época chuvosa ( $P = 0,0001$ ).

A riqueza de parasitos também variou ao longo das estações no PEMS: 10 linhagens diferentes de parasitos foram detectadas ao final da estação chuvosa; oito e sete linhagens foram detectadas na metade e final da estação seca, respectivamente; e 21 linhagens distintas de *Plasmodium* e *Haemoproteus* foram detectadas no pico da estação chuvosa subsequente.

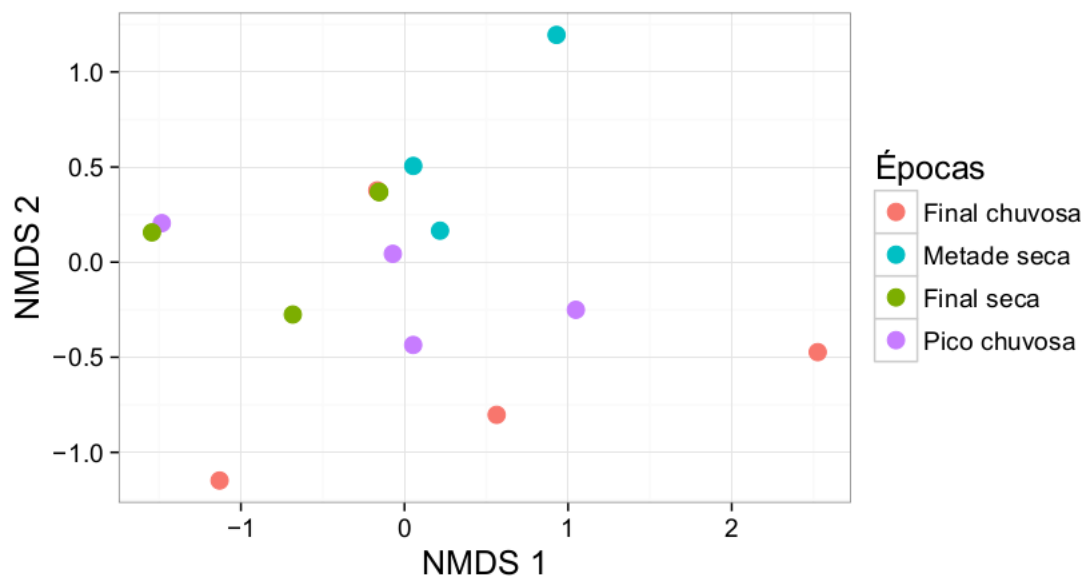
A linhagem PADOM11 foi detectada seis vezes e apenas no pico da estação chuvosa (Figura 14), apesar de três de suas quatro espécies de hospedeiros (*Camptostoma obsoletum*, *Coryphospingus pileatus* e *Volatinia jacarina*) terem sido amostradas durante todo o ano.

O subgênero *Parahaemoproteus* foi detectado apenas durante a estação chuvosa, com cinco linhagens únicas a partir da análise de sete sequências obtidas (sendo duas detectadas no final da estação chuvosa e cinco detectadas no pico da estação chuvosa subsequente). No total, cinco espécies de aves diferentes foram parasitadas por este subgênero, com a linhagem PAPOL07 sendo detectada em três espécies.

Apesar de algumas linhagens terem sido detectadas apenas nas épocas chuvosas, os parasitos apresentaram distribuição homogênea ao longo das épocas de coleta (ANOSIM;  $R = -0,016$ ;  $p = 0,532$ ), o que fica claramente evidenciado pela análise de NMDS (Figura 15).



**Figura 14: Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de hemospóreos separados de acordo com a estação em que seus hospedeiros foram capturados.** Os valores de probabilidades posteriores estão representados em cada dicotomia. O comprimento dos ramos estão ilustrados de acordo com o número de mudanças de nucleotídeos (vide escala). Siglas que precedem os nomes das linhagens: p. = *Plasmodium*; h.h. = *H. (Haemoproteus) spp.*; h.p. = *H. (Parahaemoproteus) spp.* Grupo externo = *Leucocytozoon schoutedeni*.



**Figura 15: NMDS das comunidades de parasitos amostrados em aves capturadas ao longo das diferentes épocas no PEMS.** Não houve diferença na dissimilaridade entre comunidades de hemossporídeos quando agrupadas por época de coleta (ANOSIM;  $R = -0,016$ ;  $p = 0,532$ ).

## 5.2. Distribuição de mosquitos e identificação de possíveis vetores

### 5.2.1. Distribuição dos mosquitos capturados

Foram coletados 27.110 mosquitos em quatro épocas do ano e em diferentes estágios sucessionais (inicial, tardio e de pastagem), coletas estas coincidentes com as capturas das aves. No total, 21.997 indivíduos foram identificados em 35 espécies diferentes, sendo que 12 espécies diferentes compreenderam 97% dos mosquitos identificados. O presente trabalho focou na análise de hemossporídeos nessas espécies mais comuns, assim como foram incluídos os indivíduos do gênero *Culex* por este grupo englobar a maioria das espécies identificadas como vetores confirmados ou putativos de malária aviária (Santiago-Alarcon et al. 2012<sup>b</sup>).

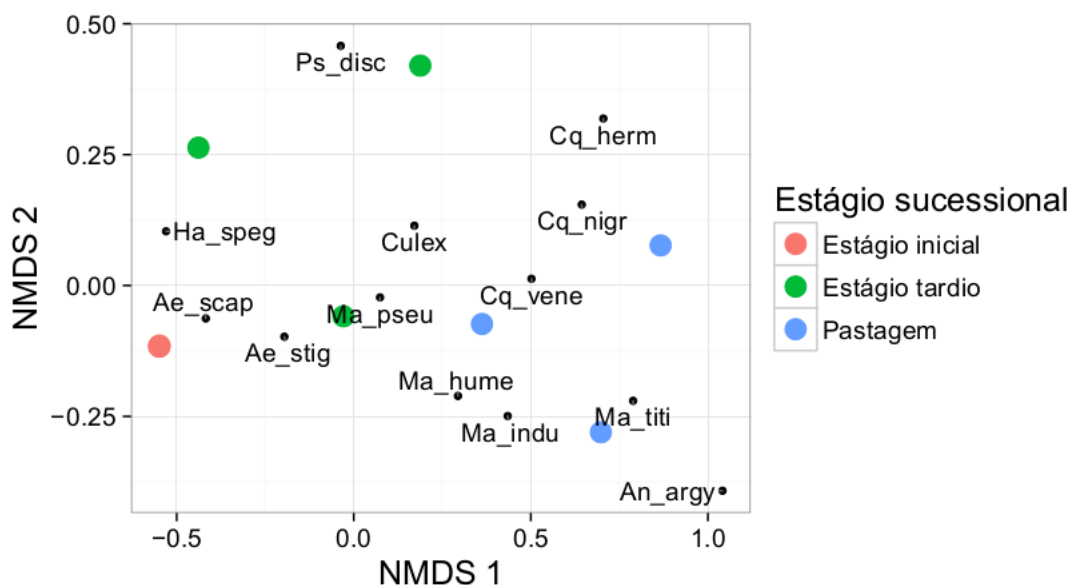
A abundância de mosquitos foi maior nas áreas de pastagem, o que pode ser atribuído principalmente aos indivíduos da tribo Mansoniini (*Mansonia* e *Coquillettidia*). *Anopheles argyritarsis* foi encontrado principalmente nas áreas de pastagem ( $n = 278$ ), com apenas alguns espécimes nos estágios inicial e tardio (um e dois indivíduos, respectivamente). O gênero *Culex* spp. apresentou maiores populações em pastagem e no estágio tardio, enquanto as espécies da tribo Aedini (*Aedes*, *Haemagogus* e *Psorophora*) apresentaram distribuição uniforme ao longo dos estágios sucessionais (Tabela 2). No



entanto, a tribo Aedini ficou mais relacionada aos estágios inicial e tardio, com diferença significativa na análise por NMDS (ANOSIM;  $R = 0.620$ ;  $P = 0.009$ ; Figura 16), mostrando a importância dessa análise para estudos de distribuição de comunidades. Essa análise também apontou que não houve sobreposição entre as comunidades dos diferentes estágios sucessionais.

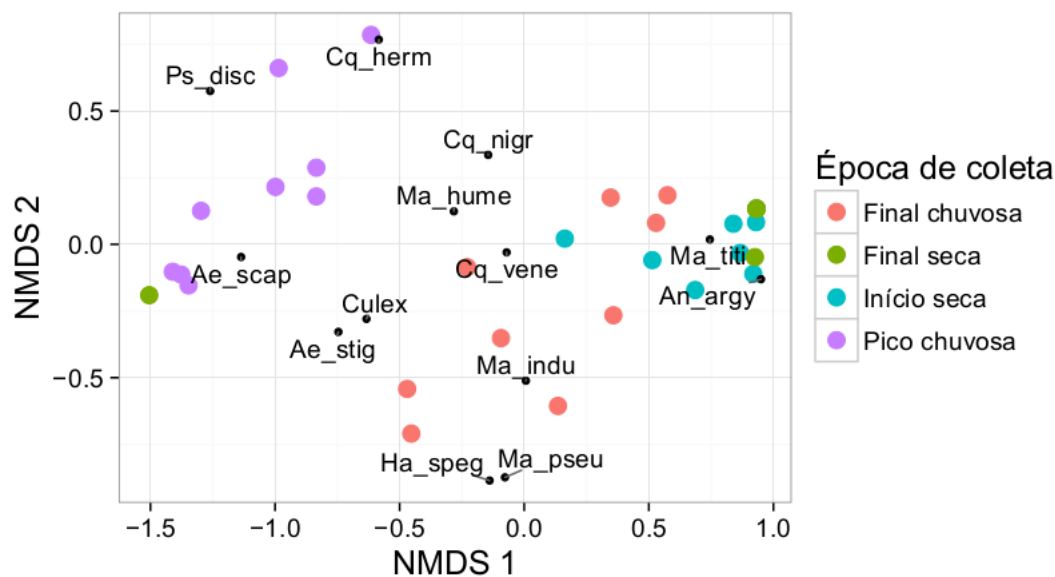
Tabela 2: Abundância das 12 espécies de mosquitos e indivíduos do gênero *Culex* spp. amostrados no presente estudo separados por estação de coleta e estágio sucessional.

Espécie	Final est. chuvosa			Início seca			Final seca			Pico est. chuvosa			Total por estágio			Total
	Pasto	Inicial	Tardio	Pasto	Inicial	Tardio	Pasto	Inicial	Tardio	Pasto	Inicial	Tardio	Pasto	Inicial	Tardio	
<i>Anopheles argyritarsis</i>	213	0	2	62	1	1	3	0	0	0	0	0	278	1	3	282
<i>Aedes scapularis</i>	264	39	63	8	1	1	0	1	0	2739	3507	2836	3011	3548	2900	9459
<i>Aedes stigmaticus</i>	5	10	1	0	0	0	0	0	0	103	76	95	108	86	96	290
<i>Haemagogus spegazzinii</i>	11	17	19	0	0	0	0	0	0	8	33	18	19	50	37	106
<i>Psorophora discrucians</i>	6	0	1	0	0	0	0	0	0	609	160	744	615	160	745	1520
<i>Coquillettidia hermanoi</i>	600	6	6	0	0	0	0	0	0	1674	21	1258	2274	27	1264	3565
<i>Cq. nigricans</i>	42	0	2	1	0	0	0	0	0	51	0	43	94	0	45	139
<i>Cq. venezuelensis</i>	43	1	1	0	0	0	0	0	0	21	1	9	64	2	10	76
<i>Mansonia humeralis</i>	44	1	0	10	0	0	0	0	0	87	2	170	141	3	170	314
<i>Ma. indubitans</i>	56	11	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	56	11	10	77
<i>Ma. pseudotitillans</i>	196	35	31	6	0	1	0	0	0	7	3	1	209	38	33	280
<i>Ma. titillans</i>	3375	81	106	345	9	42	49	0	1	635	57	437	4404	147	586	5137
<i>Culex</i> sp.	0	12	1	0	0	0	0	0	0	148	39	114	148	51	115	314
Total	5310			488			54			15707			11421	4124	6014	21559



**Figura 16: NMDS mostrando a dissimilaridade entre os estágios sucessionais de acordo com as espécies de mosquitos mais abundantes juntamente com *Culex* sp.** A disposição das abreviaturas no interior do gráfico indica o peso de cada espécie na composição da comunidade de cada estágio. (ANOSIM;  $R = 0.620$ ;  $P = 0.009$ ). Todas as três parcelas do estágio inicial apresentaram-se coalescidas em um mesmo ponto. An\_argy = *An. argyritarsis*; Ae\_scap = *Ae. scapularis*; Ae\_stig = *Ae. stigmaticus*; Ha\_speg = *Ha. spgazzinii*; Ps\_disc = *Ps. discrucians*; Cq\_herm = *Cq. hermanoi*; Cq\_nigr = *Cq. nigricans*; Cq\_vene = *Cq. venezuelensis*; Ma\_hume = *Ma. humeralis*; Ma\_indu = *Ma. indubitans*; Ma\_pseu = *Ma. pseudotitillans*; Ma\_titi = *Ma. titillans*; Culex = *Culex* sp.

Houve diminuição da abundância de mosquitos entre o final da estação chuvosa e a metade da estação seca, seguida por um acentuada redução na abundância de mosquitos no final da estação seca, e subsequente elevação da quantidade de espécimes capturados no pico da estação chuvosa subsequente. A dominância de espécies mudou entre o final e o pico da estação chuvosa, com *Ma. titillans* e *Ae. scapularis* representando as espécies mais comuns, respectivamente. A maioria dos *Culex* spp. foi capturada no pico da estação chuvosa ( $n = 301$ ), e esse gênero não foi detectado durante a estação seca (Tabela 2). Houve marcante dissimilaridade entre a comunidade de mosquitos do pico da estação chuvosa com relação às demais épocas de coleta (ANOSIM;  $R = 0,624$ ;  $P = 0,0001$ ; Figura 17).



**Figura 17:** NMDS mostrando a dissimilaridade entre as épocas de coleta de acordo com as 12 espécies de mosquitos mais abundantes juntamente com mosquitos do gênero *Culex*. ANOSIM;  $R = 0.624$ ;  $P = 0.0001$ .

### 5.2.2. Infecção por hemosporídeos em mosquitos capturados no PEMS

Foram avaliados 1.913 *pools* de abdomens quanto à presença de hemosporídeos, gerando um número total de 17.619 abdomens avaliados. Dois de 459 *pools* de *Ma. titillans* foram positivos para *Plasmodium*, totalizando 4.336 abdomens avaliados. Um destes parasitos foi a linhagem de *Plasmodium* MaTIT01, que foi detectado pela primeira vez no presente trabalho. A similaridade genética mínima deste parasito com linhagens depositadas no Genbank foi de 97%, possuindo 15 bases de diferença. O pool positivo refere-se à mosquitos capturados no final da época chuvosa em área de pastagem. O outro parasito detectado em *Ma. titillans* é a linhagem PAMIT01, detectada no pico da estação chuvosa na área de estágio tardio de sucessão. Este parasito também foi encontrado em duas aves no PEMS: um Columbiforme (*Leptotila verreauxi*) capturado em estágio tardio de sucessão no fim da época seca; e em um Passeriforme (*Myiodynastes maculatus*) capturado em área de pastagem no pico da estação chuvosa. Essa linhagem foi previamente detectada em Savacu (*Nycticorax nycticorax*) de vida livre capturado no zoológico de São Paulo (Chagas et al. 2015).

Um pool de *Ma. pseudotitillans*, de um total de 29 testados, perfazendo 224 abdomens, foi positivo para a linhagem de *Plasmodium* TUMIG03. Os mosquitos que

constituíram o pool positivo foram capturados ao fim da estação chuvosa em área de pastagem. A linhagem TUMIG03 foi previamente descrita em duas espécies de mosquitos capturados nos Estados Unidos, *Culex pipiens* e *C. restuans* (Kimura et al. 2010) e em cinco espécies de aves capturadas ao longo do continente americano, com abrangência desde o Alasca até o Brasil, no estado de Minas Gerais (Lacorte et al. 2013).

A análise dos mosquitos do gênero *Culex* revelou dois *pools* positivos em 43 testados (314 abdomens). Em um pool foi detectada uma linhagem que apresentou 100% de similaridade com *Plasmodium gallinaceum*. No outro pool foram detectadas quatro linhagens diferentes em quatro PCRs realizadas separadamente e que revelaram haplótipos diferindo de uma a cinco bases de *P. gallinaceum*. Em um posterior sequenciamento dessa amostra, o resultado obtido revelou seis picos duplos no eletrocromatograma, indicando infecção mista. A resolução das bases ambíguas mostrou que umas das linhagens correspondia a *P. gallinaceum*. Os dois *pools* positivos foram amostrados durante o pico da estação chuvosa em área de pastagem.

Um pool de *Psorophora discrucians* proveniente do pico da época chuvosa em estágio inicial de sucessão (em um total de 173 avaliados, totalizando 1.435 abdomens) revelou infecção mista de *Haemoproteus* com quatro picos duplos. A resolução das ambiguidades possibilitou a identificação de uma linhagem previamente atribuída ao *H. syrnii* detectado em corujinha-do-mato (*Megascops choliba*) no sudeste do Brasil (Vanstreels et al. 2014). Os detalhes acerca das linhagens de parasitos detectados em mosquitos encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Linhagens de parasitos detectadas em mosquitos capturados no Parque Estadual da Mata Seca.

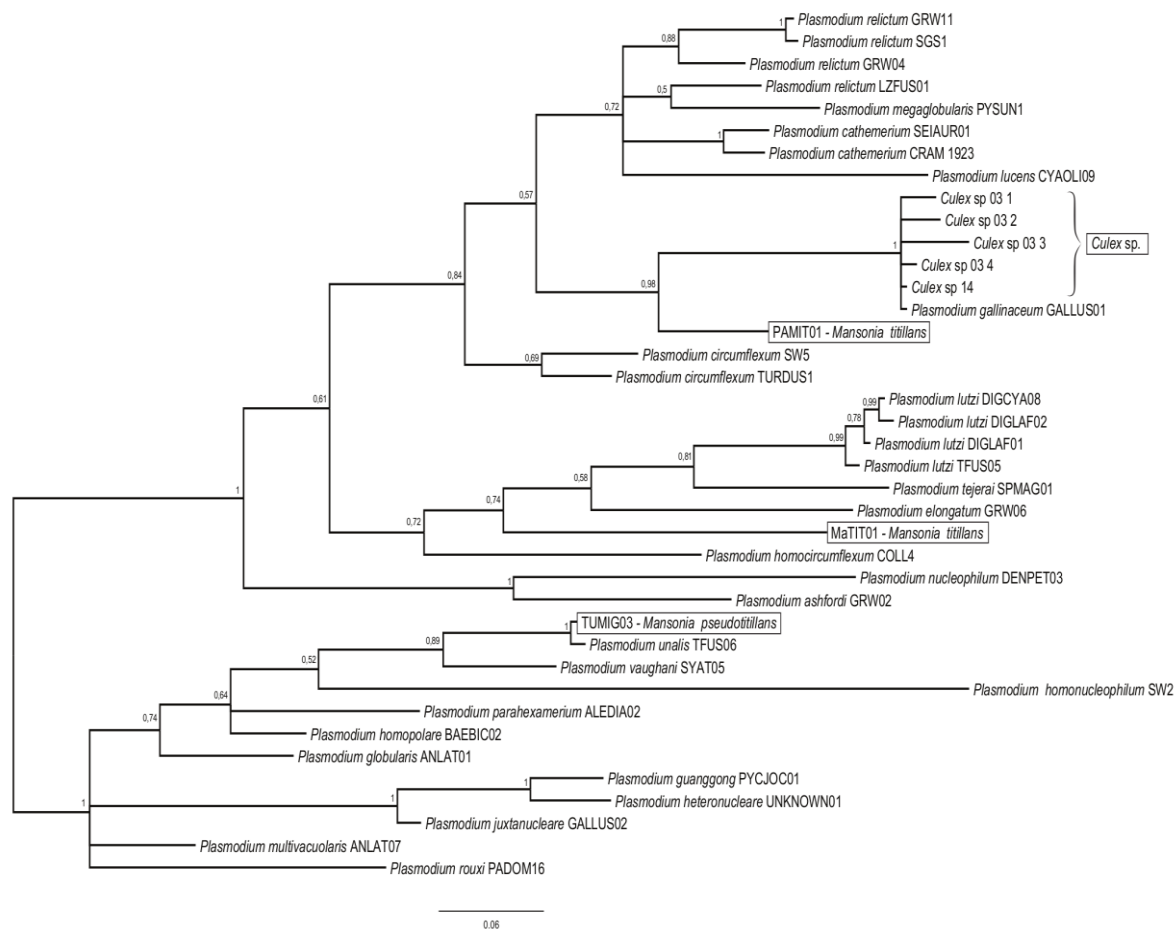
	Estágio sucessional da coleta do pool positivo	Estação	Nome da linhagem (Número de acesso do Genbank)	Hospedeiros vertebrados de descrições prévias (Ordem das aves)	Locais das detecções prévias (Número de acesso do Genbank)
<i>Mansonia titillans</i>	Estágio tardio	Pico chuvosa	PAMIT01 (KX068686)	<i>Leptotila verreauxi</i> (Columb.), <i>Myiodynastes maculatus</i> (Pas.); <i>Nycticorax nycticorax</i> (Pelec.)	PEMS; Zoológico de São Paulo (KU057967)
<i>Mansonia titillans</i>	Pastagem	Final chuvosa	MaTIT01 (KX068685)	Linhagem nova	
<i>Mansonia pseudotitillans</i>	Pastagem	Final chuvosa	TUMIG03 (KX068687)	<i>Catharus ustulatus</i> ; <i>Turdus migratorius</i> ; <i>Tangara icterocephala</i> , <i>Turdus assimilis</i> ; <i>Turdus amaurochalinus</i> (Pas.)	Alasca, EUA (JN792135); Missouri, EUA (AF465548); Costa Rica (JN819328); Lacorte et al. (2013), Brasil (JX021462)
<i>Psorophora discrucians</i>	Estágio inicial	Pico chuvosa	<i>Haemoproteus syrnii</i> - PsDIS01 (KX068688)	<i>Megascops choliba</i> (Strigiformes)	Estado de São Paulo (KJ575554)
<i>Psorophora discrucians</i>	Estágio inicial	Pico chuvosa	PsdIS02 (KX068689)	Linhagem nova	
<i>Culex sp.</i>	Pastagem	Pico chuvosa	<i>P. gallinaceum</i> (KX068694)	<i>Gallus gallus domesticus</i> (Gallif.)	
<i>Culex sp.</i>	Pastagem	Pico chuvosa	<i>P. gallinaceum-like</i> (KX068690-93)	Linhagens novas	

Abreviações das ordens de aves em parênteses: Columb. = Columbiformes; Gallif. = Galliformes; Pas. = Passeriformes; Pelec. = Pelecaniformes. PEMS = Parque Estadual da Mata Seca.

As demais espécies de mosquitos foram negativas para hemossporídeos. O número de *pools* testados e o número de abdomens correspondentes foram: *An. argyritarsis* (29; 270); *Ae. scapularis* (673; 6680); *Ae. stigmaticus* (35; 267); *Hg. spegazzinii* (20; 89); *Cq. hermanoi* (378; 3440); *Cq. nigricans* (18; 145); *Cq. venezuelensis* (11; 67); *Ma. humeralis* (37; 291); *Ma. indubitans* (7; 61).

Todos os *pools* de tóraces correspondentes a *pools* positivos de abdomens foram negativos para a presença de hemossporídeos. Da mesma forma, todas as fêmeas ingurgitadas foram negativas para hemossporídeos (vide espécies testadas abaixo). Todos os abdomens positivos para hemossporídeos foram negativos para a presença de DNA de aves, demonstrando que os parasitos detectados não eram derivados de fase eritrocítica em eventual resíduo de sangue presente no intestino médio dos mosquitos. Apesar de apenas fêmeas visualmente não ingurgitadas terem sido separadas em *pools*, dois dos *pools* positivos possuíam DNA de *Homo sapiens*, o que foi detectado em PCR seguida de sequenciamento.

A análise filogenética dos parasitos encontrados no presente estudo revelou que linhagens de *Plasmodium* de mosquitos do gênero *Mansonia* estão distribuídas em três clados diferentes (Figura 16). A distância genética entre as duas linhagens de *Ma. titillans* foi de 2,9% e cada uma diferiu em 7,5% da linhagem encontrada em *Ma. pseudotitillans*. Todas as linhagens de *Culex* sp. agruparam com *P. gallinaceum*. A linhagem TUMIG03 apresenta apenas uma base de diferença de *Plasmodium unalis*, morfoespécie descrita em *Turdus migratorius* capturados em Bogotá, Colômbia (Mantilla et al. 2013).



**Figura 18: Inferência filogenética bayesiana demonstrando a distribuição de linhagens de *Plasmodium* detectados em mosquitos coletados no PEMS em relação a linhagens cujas morfoespécies foram previamente descritas.** Os valores de probabilidades posteriores estão representados em cada dicotomia. O comprimento dos ramos estão ilustrados de acordo com o número de mudanças de nucleotídeos (vide escala).

### 5.2.3. Identificação do repasto sanguíneo de fêmeas ingurgitadas

Foram testadas 141 fêmeas ingurgitadas quanto à presença de DNA de aves e mamíferos: *Ae. scapularis* (n = 47), *Hg. spegazzinii* (n = 2), *Ps. discruciens* (n = 35), *Cq. hermanoi* (n = 12), *Cq. nigricans* (n = 2), *Cq. venezuelensis* (n = 3), *Ma. humeralis* (n = 4), *Ma. pseudotitillans* (n = 5), *Ma. titillans* (n = 31). Todas as amostras foram negativas para DNA de aves, e 126 foram positivas para a presença de DNA de mamíferos (89,3%). Dois *Ae. scapularis* capturados no pico da estação chuvosa foram positivos para *Mazama gouazoubira*, uma espécie de cervídeo amplamente distribuída no Brasil (Duarte et al. 2012) e que já foi reportada no PEMS (Instituto Estadual de Florestas 2011). Uma fêmea



ingurgitada foi coletada ativamente durante o dia em área em estágio inicial de sucessão, e o outro indivíduo foi coletado em armadilha Shannon em área de pastagem. As amostras restantes foram positivas para DNA de *Homo sapiens*, sendo estes mosquitos capturados em todas as estações e em ambos os métodos de coleta. Não foram capturadas fêmeas ingurgitadas de *Ae. stigmaticus*, *An. argyritarsis* e *Ma. indubitans*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Efeito da sucessão ecológica na distribuição das aves e seus hemosporídeos

Eventos de desflorestamento criaram mosaicos de florestas secundárias em diferentes estágios de sucessão ecológica em praticamente todos os biomas tropicais do globo terrestre. Com isso, faz-se necessário compreender as interações entre parasitos e hospedeiros nas denominadas “florestas do futuro”. Desta forma, nos propusemos a estudar o efeito da sucessão ecológica secundária nas interações entre hospedeiros vertebrados, parasitos e seus vetores. A Mata Seca constitui um ecossistema ameaçado, cujas áreas anteriormente destinadas à pecuária extensiva foram abandonadas em diferentes anos, gerando fragmentos de florestas secundárias que denominamos como “áreas de pastagem” e estágios iniciais, intermediários e tardios de sucessão ecológica. De forma geral, observamos diferenças nas comunidades de aves entre as áreas de pastagem e de não-pastagem em Mata Seca. A prevalência de hemosporídeos também foi diferente entre essas comunidades, com valores significativamente mais elevados em aves capturadas em áreas de pastagem. Estágios avançados de sucessão ecológica no PEMS parecem favorecer as comunidades de aves diminuindo a prevalência de parasitos que possuem potencial patogênico.

Identificamos algumas espécies de aves capturadas exclusivamente em pastagem e estas apresentaram prevalência de hemosporídeos mais elevada do que espécies capturadas exclusivamente em áreas de não pastagem. De maneira semelhante, prevalências mais elevadas de patógenos tem sido demonstradas em espécies de mamíferos resilientes (espécies tolerantes a alterações ambientais), implicando esse tipo de hospedeiro como importantes amplificadores de patógenos em ambientes naturais alterados (Suzán et al. 2009, Young et al. 2014). A comunidade de parasitos foi semelhante entre os estágios sucessionais, mas a prevalência geral foi maior em áreas de pastagem. Espécies exclusivas de pastagem podem ser excelentes reservatórios de hemosporídeos no PEMS, o que pode aumentar as taxas de transmissão local. Espécies indicadoras de áreas de pastagem como *Volatinia jacarina*, *Ammodramus humeralis* e *Columbina picui* constituem populações de elevadas densidades no Parque Estadual da Mata Seca, onde elas constroem seus ninhos no nível do solo e obtêm sementes de gramíneas exóticas (Dornelas et al. 2012). Elas apresentaram infecção pelas quatro

linhagens mais generalistas encontradas no Sudeste do Brasil [vide índices de especificidade das linhagens BAFLA03, PADOM11, *P. cathemerium*, e *P. nucleophilum* em Pinheiro et al. (2016)]. A elevada abundância de hospedeiros e a reduzida especificidade dos parasitos também podem explicar a elevada transmissão de parasitos, resultando em uma maior prevalência nas áreas de pastagem.

Metade das linhagens de parasitos detectadas nessas três espécies de aves resilientes também foram encontradas em *Coryphospingus pileatus* (espécie bem amostrada em todos os estágios sucessionais), incluindo as generalistas BAFLA03, PADOM11 e *P. nucleophilum*. Essa espécie de ave é tolerante a ambientes degradados, mas também foi encontrada em estágios mais avançados de sucessão ecológica. Além disso, *C. pileatus* apresentou prevalência de hemosporídeos consideravelmente elevada em todas as áreas onde foi amostrada (58%). Essa espécie pode ser um importante dispersor de hemosporídeos entre os diferentes estágios sucessionais, tendo em vista o seu elevado parasitismo por linhagens generalistas. No entanto, as baixas prevalências em áreas em estágio inicial, intermediário e tardio de sucessão ecológica demonstram que apenas a presença de *C. pileatus* não é suficiente para aumentar o risco de infecção para os demais indivíduos.

Os escassos estudos acerca do efeito das alterações ambientais sobre a distribuição de hemosporídeos em áreas tropicais revelaram resultados diferentes. A prevalência de hemosporídeos foi mais elevada em florestas intactas em Camarões (Bonneaud et al. 2009, Chasar et al. 2009) e em Gana (Loiseau et al. 2010) quando comparada a áreas degradadas. De forma semelhante, aves capturadas em florestas tropicais contínuas apresentaram maiores índices de infecção por *Haemoproteus* do que aves capturadas em florestas fragmentadas na Austrália (Laurance et al. 2013). No entanto, uma das duas espécies de aves testadas por Chasar et al. (2009) em Camarões apresentou maior prevalência de infecções por algumas linhagens de *Plasmodium* quando capturadas em áreas degradadas. Considerando o presente estudo que sugere que a sucessão ecológica diminui a prevalência geral de hemosporídeos, pode-se apontar que alterações ambientais modulam relações parasito-hospedeiro de formas específicas em escala local. No entanto, os trabalhos acima citados abordaram três ou menos espécies de aves, revelando alterações apenas em níveis populacionais e não em nível de comunidades como avaliado em nosso trabalho. A análise de comunidades de aves do PEMS permitiu sugerir que espécies não dependentes de florestas podem apresentar papel importante no aumento do risco de infecção para outras espécies coabitantes.

Não foi observada correlação na distribuição entre as comunidades das aves e dos parasitos. As aves apresentaram distribuição mais homogênea dentro de cada estágio sucessional, com clara distinção da composição das comunidades entre áreas de pastagem e não pastagem. Por outro lado, parasitos apresentaram uma distribuição mais semelhante entre todos os estágios sucessionais. Isso pode ser explicado pela distribuição das linhagens de hemosporídeos generalistas que infectam aves de áreas de pastagem e de não-pastagem. A proximidade entre as áreas de captura das aves reduz a diferença entre fatores abióticos entre estágios (precipitação, temperatura e altitude) que modulam a prevalência de hemosporídeos (Wood et al. 2007, Chasar et al. 2009). Com isso, os achados do presente trabalho podem ser atribuídos em grande parte à diferença de fatores bióticos que determinam cada estágio sucessional, como a composição de espécies e estrutura vegetal (Madeira et al. 2009, Pezzini et al. 2014), que alteram a distribuição das aves e de mosquitos e a forma como estes se relacionam com os hemosporídeos aqui avaliados.

Alterações ambientais interferem na distribuição de vetores de malária humana (Vittor et al. 2006) e aviária (Reiter & LaPointe 2007), aumentando o risco de infecção de seus hospedeiros vertebrados (Vittor et al. 2009). Com isso, a ecologia dos vetores pode exercer efeitos importantes na distribuição de parasitos entre os diversos estágios de sucessão de florestas secundárias. A distribuição homogênea de hemosporídeos entre as áreas avaliadas no presente trabalho sugere que os vetores se dispersam de um estágio para o outro, e podem transmitir uma dada linhagem de parasito para hospedeiros que não compartilham o mesmo local. As áreas de pastagem no PEMS apresentaram maiores densidades de potenciais vetores de plasmódios aviários (*Mansonia titillans*, *Ma. pseudotitillans* e *Culex* sp.). Essas espécies também foram capturadas em outros estágios sucessionais, sugerindo que elas exploram todos os ambientes avaliados em nosso estudo.

*Plasmodium* spp. que parasitam membros da família *Thamnophilidae* parecem possuir baixa amplitude de hospedeiros vertebrados, indicando um parasitismo por linhagens específicas desse grupo de aves. Das linhagens encontradas no presente trabalho, apenas a linhagem FOMEL01 havia sido descrita em um indivíduo da espécie *Formicivora melanogaster*, desta mesma família (Lacorte et al. 2013). Das 34 sequências de *Plasmodium* recuperadas de aves da família *Thamnophilidae* no trabalho prévio de Lacorte e colaboradores (2013), 29 ficaram restritas ao nível de família, perfazendo 17 linhagens distintas, o que também revela um alta riqueza de parasitos nessa família, corroborando os dados do presente trabalho. Isso justifica estudos futuros de

hemosporídeos com enfoque nessa família, e a avaliação microscópica de *Plasmodium* poderia revelar novas morfoespécies desse gênero de parasito.

Pouco se sabe sobre a distribuição do subgênero *Haemoproteus*. Esses parasitos foram detectados apenas em áreas de pastagem, o que pode ser atribuído à presença de grande parte das aves da ordem Columbiformes nesse estágio sucessional (83,3%; n = 30). Obtivemos apenas uma linhagem de parasito de Columbiformes amostrados em área de não pastagem (de cinco aves amostradas com três positivos), que foi identificado como *Plasmodium* (PAMIT01) e que também foi encontrado em *M. maculatus*, família Tyrannidae. Uma espécie de Passeriformes (*Coryphospingus pileatus*, família Thraupidae) foi detectada com este subgênero de parasito, fato também reportado por Lacorte et al. (2013), mostrando que dípteros da família Hippoboscidae parasitam aves não-Columbiformes. É provável que essa tenha sido uma infecção abortiva, ou seja, uma infecção em que o parasito não completa o seu ciclo a ponto de produzir gametócitos viáveis (Valkiūnas et al. 2009). Até onde se sabe, *H.(Haemoproteus)* spp. completa seu ciclo apenas em Columbiformes (Valkiūnas 2005) e em algumas espécies de aves marinhas (Levin et al. 2012). De todo modo, o presente estudo fornece dados importantes sobre a ecologia do subgênero *Haemoproteus*, demonstrando que esse grupo de parasitos é encontrado apenas em áreas de pastagem no PEMS. Os demais trabalhos que avaliaram o efeito de alterações ambientais na distribuição de hemosporídeos não contemplaram aves Columbiformes, o que impossibilita extrapolações para o entendimento global da distribuição de *H.(Haemoproteus)* spp. em áreas com diferentes níveis de degradação.

O presente trabalho demonstrou que a progressão da sucessão ecológica é eficaz na alteração das comunidades de aves, beneficiando espécies dependentes de floresta. Com isso, o favorecimento da sucessão ecológica pode constituir importante estratégia conservacionista para a avifauna, uma vez que diminui a incidência de patógenos que exercem efeitos deletérios em populações de vida livre.

## 6.2. Recaída de primavera em ambientes tropicais?

Algumas evidências encontradas no presente trabalho apontam para o efeito de “recaída de primavera” (aumento das taxas de merogonia após fase latente da infecção, com o aparecimento de parasitemia secundária) no Neotrópico. Primeiramente, a prevalência geral de hemosporídeos apresentou elevação no final da estação seca (final do mês de setembro, início da primavera), quando comparada à coleta anterior, realizada

na metade da mesma estação. Para verificar se apenas parasitos do gênero *Plasmodium* estavam envolvidos na recaída de primavera, as aves Columbiformes e, conseqüentemente, todas as infecções não-abortivas de parasitos do subgênero *Haemoproteus* foram excluídas da análise. Como o subgênero *Parahaemoproteus* não foi detectado na estação seca, é provável que o gênero *Plasmodium* constitua a grande maioria de parasitos avaliados.

A temporada de reprodução das aves tem início em agosto, final da estação seca, em Minas Gerais (Marini & Durães 2001, Marini et al. 2009). Isso permite inferir que as aves capturadas na Mata Seca estavam no início da temporada reprodutiva, cuja demanda fisiológica parece estar ligada ao desencadeamento da recaída de primavera (Christe et al. 2002, Valkiūnas 2005). A sazonalidade de hemosporídeos ainda não foi muito explorada em ambientes tropicais em todo o globo, apesar de vários trabalhos já terem sido realizados em locais de clima temperado (Applegate et al. 1971, Bensch & Åkesson 2003, Bensch et al. 2007, Hasselquist et al. 2007, Wilkinson et al. 2016). Recursos hídricos, como pequenos corpos d'água espalhados ao longo do PEMS, são criticamente reduzidos ao final da estação seca (observações pessoais). Além disso, há uma redução na disponibilidade de alimentos nessa época devido, principalmente, à redução da quantidade de frutos e sementes (Pezzini et al., 2014), e de insetos (Neves et al., 2014), que constituem importante fonte de nutrientes para essas aves. Como o estado nutricional das aves é importante para combater infecções por *Plasmodium* (Cornet et al. 2014a), a marcante sazonalidade deste ecossistema também pode influenciar o aumento da prevalência de hemosporídeos observado ao final da estação seca no presente estudo. As menores quantidades de mosquitos e de potenciais vetores de malária aviária foram detectadas no final da estação seca, podendo indicar que o aumento da prevalência de hemosporídeos não está associado ao aumento das taxas de transmissão. Os únicos trabalhos no Neotrópico, não encontraram variação na prevalência de hemosporídeos (Valkiūnas et al. 2004) e nem na distribuição de linhagens (Fallon et al. 2004) em aves capturadas nas estações secas e chuvosas, demonstrando que pouco se sabe sobre a sazonalidade de hemosporídeos nessa bioregião.

A prevalência da linhagem de *Plasmodium* mais comum (BAFLA03) não aumentou significativamente entre o meio e o final da estação seca, sugerindo que o aumento da prevalência geral de hemosporídeos entre esses dois períodos foi causado por múltiplas linhagens. Essa mesma linhagem constituía 31,25% dos parasitos na metade da estação seca, tornou-se a mais comum no início da primavera (61,1%) e foi diluída na alta

riqueza de parasitos detectados no pico da estação chuvosa. Isso demonstra uma flutuação da dominância de parasitos ao longo do ano no PEMS, fato este já observado em regiões de clima temperado (Castro et al. 2011, Lalubin et al. 2013). A linhagem BAFLA03 pode ser mais adaptada à sobrevivência durante a estação seca (Cosgrove et al. 2008), evento que pode estar relacionado à capacidade do parasito em evadir do sistema imune da aves, em que ele manteria parasitemias muito baixas e um ciclo exoeritrocítico latente durante períodos de ausência de vetores.

Por outro lado, a linhagem PADOM11 apresentou marcada restrição sazonal, sendo detectada seis vezes apenas no pico da estação chuvosa. Este parasito apresenta ampla distribuição em outros ambientes no sudeste do Brasil (Lacorte et al. 2013), embora estes autores não tenham avaliado as linhagens obtidas de acordo com as épocas do ano. Este parasito foi detectado em mosquitos da espécie *Culex restuans* nos Estados Unidos (Kimura et al. 2010), mas sem confirmação do papel dessa espécie de mosquito como vetor da linhagem PADOM11.

Os resultados do presente trabalho sugerem pela primeira vez uma variação sazonal na prevalência de *Plasmodium* na região Neotropical. Efeito da sazonalidade também foi demonstrado em duas linhagens específicas de *Plasmodium*, cuja prevalências variaram ao longo do ano. Estudos futuros nessas áreas devem envolver coletas contínuas por vários anos consecutivos, a fim de elucidar a dinâmica temporal de hemosporídeos aviários em regiões ainda pouco estudadas.

### 6.3. Sazonalidade de parasitos do gênero *Haemoproteus*

Parasitos do subgênero *Parahaemoproteus* foram detectados em aves capturadas apenas nas duas coletas realizadas na estação chuvosa. A análise dos vetores demonstrou que as populações de culicídeos diminuíram na metade da estação seca e atingiram níveis muito baixos ao final da mesma estação. Com isso, pode-se inferir que a população de dípteros da família Ceratopogonidae, vetores deste subgênero, também entra em declínio ao longo da estação seca, interrompendo a transmissão de seus parasitos. Parasitos do subgênero *Parahaemoproteus* podem ficar restritos aos órgãos internos das aves durante épocas de ausência de vetores e, com isso, não são detectados na corrente sanguínea (Mendes et al. 2013, Pérez-Rodríguez et al. 2015). No entanto, não se pode excluir a hipótese de que estes parasitos sejam eliminados pelo sistema imune dos hospedeiros, com a reinfecção acontecendo em época de condições favoráveis para os vetores. Nesse

segundo cenário, aves visitando o PEMS durante a estação chuvosa poderiam ser as fontes de infecção para os vetores, que reiniciariam a transmissão local. As duas hipóteses não são mutuamente excludentes e poderiam acontecer simultaneamente em espécies de aves diferentes ou com linhagens de parasitos diferentes. Algumas linhagens de *Parahaemoproteus* desaparecem da corrente sanguínea das aves durante o inverno, e reiniciam o ciclo eritrocítico no início da primavera ou apenas no verão (Pérez-Rodríguez et al. 2015). No PEMS, linhagens de *Parahaemoproteus* não foram detectadas no início da primavera e reapareceram, de fato, apenas no pico da estação chuvosa seguinte. No entanto, não foram realizadas coletas nos terços médio e final da primavera, o que permitiria apontar com mais clareza a época do reestabelecimento da parasitemia por parte destes parasitos.

Interessantemente, o subgênero *Haemoproteus* foi detectado ao longo de todo o ano, mostrando que estes parasitos não apresentam sazonalidade marcante. Isso indica que seus vetores podem persistir durante todo o ano. De fato, dípteros Hippoboscidae passam quase toda a fase adulta no corpo do hospedeiro (Levin & Parker 2012), o que proporciona a transmissão de *H.(Haemoproteus)* spp. em médias e altas latitudes durante todo o ano (Valkiūnas 2005). Assim, parasitos desse subgênero podem persistir durante as condições desfavoráveis da estação seca no PEMS, sendo transmitidos ao longo de todo o ano.

#### 6.4. Procurando por potenciais vetores de malária aviária

O presente estudo revelou a presença de *Plasmodium* em abdomens de mosquitos das espécies *Ma. titillans* (linhagens PAMIT01 e MaTIT01) e *Ma. pseudotitillans* (TUMIG01), sugerindo que essas espécies são potenciais vetores de malária aviária em Mata Seca no Brasil. No entanto, apenas a detecção molecular de *Plasmodium* em mosquitos não confirma a competência de transmissão do parasito. Para confirmação do papel como vetores de hemosporídeos é necessária a visualização de esporozoítos na glândula salivar de mosquitos através de microscopia óptica ou a realização de infecções experimentais (Valkiūnas 2011, Kim & Tsuda 2015). Contudo, nossos resultados representam um passo importante para a identificação de vetores de malária aviária em áreas de elevada biodiversidade como o Neotrópico.

Mosquitos do gênero *Mansonia* e *Coquillettidia* dependem de macrófitas aquáticas durante as fases imaturas do desenvolvimento para a obtenção de oxigênio



(Paula et al. 2012). Com isso, pode-se inferir que estes culicídeos utilizam apenas lagos permanentes ou temporários no PEMS. Diversas aves aquáticas se aglomeram ao redor destes lagos, especialmente durante a estação chuvosa (Dornelas et al. 2012), fazendo com que aquelas aves sejam importantes fontes de repasto para mosquitos da tribo Mansoniini na área de estudo. Chagas et al. (2015) detectaram a linhagem PAMIT01 no zoológico de São Paulo em *Nycticorax nycticorax* de vida livre, uma ave aquática e que também habita o PEMS (Dornelas et al. 2012). Essa mesma linhagem foi encontrada em duas aves na área de estudo, sendo que uma delas (*Myiodynastes maculatus*) também foi capturada no pico da estação chuvosa, período em que os mosquitos do *pool* positivo foram capturados.

Vale a pena mencionar novamente que a linhagem MaTIT01 foi detectada aqui pela primeira vez. Este parasito possui 15 pares de base de diferença em relação à linhagem mais próxima reportada no Genbank e ainda não se sabe quais seriam seus possíveis hospedeiros vertebrados. Pesquisas por hemosporídeos em vetores podem revelar linhagens de parasitos que não são encontradas em comunidades de aves amostradas no mesmo local (Gager et al. 2008, Kimura et al. 2010, Njabo et al. 2011). Linhagens patogênicas reduzem a locomoção ou mesmo provocam o óbito de seus hospedeiros vertebrados, evitando a captura destes em redes de neblina, consequentemente diminuindo as chances de detecção destes parasitos (Valkiūnas 2005, Mukhin et al. 2016). Além disso, aves que não voam em nível do solo são subamostradas em trabalhos que empregam redes de neblina, fazendo com que seus parasitos também não sejam efetivamente avaliados. A ausência de linhagens geneticamente próximas à MaTIT01 revela a necessidade de que novos estudos continuem a avaliar hemosporídeos em mosquitos e em aves não pertencentes às ordens Passeriformes e Columbiformes, como aves aquáticas, em ambientes naturais no Brasil.

A linhagem TUMIG03, detectada em *Ma. pseudotitillans*, foi encontrada em aves de diferentes famílias de Passeriformes em um ampla extensão do continente americano (Ricklefs & Fallon 2002, Dodge et al. 2013), incluindo o sudeste do Brasil (Lacorte et al. 2013), perfazendo cinco espécies de hospedeiros vertebrados. Kimura et al. (2010) encontraram essa mesma linhagem em duas espécies de *Culex* capturados nos Estados Unidos, demonstrando que este parasito pode apresentar grande amplitude de vetores em paralelo com uma ampla diversidade de hospedeiros vertebrados e distribuição geográfica. Além disso, TUMIG03 e *Plasmodium unalis* são proximamente relacionados

filogeneticamente e, provavelmente, constituem a mesma morfoespécie. Com isso, *Ma. pseudotitillans* constitui potencial vetor de *P. unalis* no Brasil.

A detecção de *P. gallinaceum* e de outras linhagens relacionadas em *Culex* sp. é intrigante e deve ser interpretada com cautela. Este gênero de mosquito é o principal vetor de *Plasmodium* aviário (Santiago-Alarcon et al. 2012b) e, por isso, foi incluído na análise de hemossporídeos, apesar da falta de identificação específica. Não existe confirmação da transmissão de *P. gallinaceum* fora do continente asiático (Valkiūnas 2005), mas linhagens proximamente relacionadas a este parasito foram detectadas em aves de vida livre capturadas no Cerrado em Minas Gerais (Lacorte et al. 2013) e em Jacutingas (*Aburria jacutinga*) mantidas em cativeiro também no estado de Minas Gerais (Motta et al. 2013). No entanto, não houve detecção de linhagens proximamente relacionadas a *P. gallinaceum* no presente trabalho. Estudos futuros nessa área devem avaliar a presença de hemossporídeos em aves não capturadas em redes de neblina, como as da ordem Galliformes e aves aquáticas, para aumentar a chance de detecção deste grupo de parasitos em seus hospedeiros vertebrados.

Dípteros da família Culicidae ainda não foram confirmados como vetores de ambos os subgêneros de *Haemoproteus* (Valkiūnas et al. 2013), mas no presente estudo, foram detectados parasitos do subgênero *H.(Parahaemoproteus)* sp. em um *pool* de *Psorophora discrucians*. Trabalhos experimentais demonstraram que DNA de *Plasmodium* pode ser detectado em insetos não-vetores mesmo na ausência de DNA do hospedeiro vertebrado, o que é atribuído a uma infecção abortiva de longa duração (Kim et al. 2009, Valkiūnas et al. 2013). Neste caso, o parasito pode se desenvolver em um inseto não vetor até a forma de oocisto, por exemplo, posteriormente entrando em processo de degeneração antes da conclusão da esporogonia e conseqüente formação dos esporozoítos. Esse cenário pode explicar o presente achado e, com isso, mosquitos do gênero *Psorophora* não foram incluídos como vetores potenciais de *Haemoproteus*. No entanto, pode-se concluir que *Ps. discrucians* utiliza aves como fonte de repasto sanguíneo, caracterizando-o como uma espécie de mosquito com um certo grau de ornitofilia.

Os tipos de armadilhas empregadas podem influenciar as comunidades de mosquitos capturados, o que, por conseqüência, pode alterar a prevalência de hemossporídeos (Carlson et al. 2015). O sistema de armadilha utilizado no presente estudo utiliza lâmpadas de LED e a presença de humanos como isca para os insetos, o que pode ter atraído uma grande proporção de insetos não-ornitofílicos. Isso ainda é corroborado

pelo resultado da análise de repasto sanguíneo dos mosquitos capturados, que revelou apenas DNA derivado de *Homo sapiens* na ampla maioria das fêmeas ingurgitadas (98%). No entanto, estudos incluindo o gênero *Mansonia* e *Ae. scapularis* no Brasil demonstraram que esses mosquitos podem apresentar taxas de ornitofilia variando entre 20 e 43% (Alencar et al. 2005, Lorosa et al. 2010, dos Santos Silva et al. 2012). Além disso, Njabo et al. (2011) descreveram três espécies do gênero *Coquillettidia* como vetores potenciais de *Plasmodium* aviário em Camarões. Como este gênero de mosquito juntamente com *Mansonia* spp. e *Ae. scapularis* constituíram 86% das amostras aqui testadas, era esperado encontrar uma prevalência maior de hemosporídeos em comparação com os resultados obtidos. Por outro lado, Gager et al. (2008) não detectou hemosporídeos em 2.760 mosquitos dos gêneros *Mansonia* e *Coquillettidia* capturados no Panamá, demonstrando que esses gêneros podem não ser importantes vetores de malária aviária na região Neotropical. Estes resultados conflitantes enfatizam a necessidade de mais trabalhos visando a identificação de hemosporídeos aviários nas Américas Central e do Sul.

Não foi detectado DNA de hemosporídeos nos tóraces correspondentes aos *pools* de abdomens positivos. Vetores de malária aviária podem apresentar tóraces negativos mesmo quando os abdomens correspondentes são detectados com hemosporídeos em condições naturais (Kim & Tsuda 2015) e experimentais (Kim et al. 2009, Kazlauskienė et al. 2013). Por exemplo, detecção de tóraces positivos por PCR se inicia nove dias após infecção experimental de vetores competentes em 16% dos insetos, e a positividade se mantém entre 22,2 e 60% a partir de então (Kim et al. 2009). Foi demonstrado em outro modelo experimental que apenas 19% dos esporozoítos formados penetram a glândula salivar. O restante dos parasitos são destruídos em até 24 horas após atingirem a hemocele do vetor (Hillyer et al. 2007), demonstrando que a sensibilidade dos métodos de diagnóstico podem não ser eficientes para detectar os parasitos presentes nos tóraces em alguns casos. Os resultados do presente estudo não permitem confirmar as espécies de *Mansonia* como vetores de malária aviária. No entanto, estudos futuros não podem menosprezar *Ma. titillans* e *Ma. pseudotitillans* como vetores potenciais baseados apenas na falta de detecção de hemosporídeos nos tóraces desses mosquitos. O mesmo se aplica à potencial transmissão de *P. gallinaceum* e outras linhagens semelhantes por parte de *Culex* sp.

Em resumo, mosquitos do gênero *Mansonia* podem ser considerados como potenciais vetores de plasmódios aviários em Florestas Estacionais Decíduas no Brasil.

Não foram detectadas linhagens de alta prevalência nas aves capturadas na área de estudo, apontando que *Ma. titillans* e *Ma. pseudotitillans* possivelmente transmitem linhagens de parasitos secundários no sistema de transmissão avaliado. De fato, a linhagem MaTIT01 foi descrita aqui pela primeira vez e a linhagem PAMIT01 foi detectada duas vezes em um total de 63 sequências de *Plasmodium* encontradas nas aves capturadas nos mesmos locais e períodos onde foram coletados os mosquitos. A linhagem TUMIG03 foi encontrada em seis aves no Brasil (Lacorte et al. 2013), mas nenhuma delas foi amostrada em locais de Mata Seca no estado de Minas Gerais. Os mesmos autores detectaram 33 linhagens diferentes de *Plasmodium* compreendendo 106 sequências em três localidades de Mata Seca, incluindo o local do presente estudo. Isso demonstra a singularidade da comunidade de hemosporídeos da região e revela a necessidade de estudos futuros visando elucidar as relações entre estes parasitos e seus vetores.

Estudos futuros devem direcionar esforços em dissecar o intestino médio e as glândulas salivares de possíveis vetores, para evidenciar a fase de esporogonia e a capacidade dos esporozoítos em invadir as glândulas salivares do mosquito. No entanto, o processo de dissecação exige que os mosquitos estejam vivos, tornando-o impraticável em várias situações de campo. O método de detecção aqui empregado, realizando-se o diagnóstico inicial apenas em *pools* de abdomens e consequente análise dos tóraces provenientes de *pools* positivos, é amplamente empregado e permite avaliar com mais asserção o papel da espécie de mosquito como vetor do parasito em questão do que quando utiliza-se *pools* contendo ambos os segmentos de mosquitos (Ishtiaq et al. 2008, Kim & Tsuda 2010, Ejiri et al. 2011). A partir da detecção sistemática de *Plasmodium* em *pools* capturados em uma certa localidade, poder-se-ia focar na dissecação e avaliação microscópica do parasito na espécie alvo, como recomendado por Kim & Tsuda (2015), para a incriminação contundente de um vetor de malária aviária. Sendo assim, o presente trabalho constitui um importante primeiro-passo para o estudo de vetores de hemosporídeos aviários no Brasil e reforça a necessidade em conciliar métodos de biologia molecular e microscopia óptica neste campo de estudo.

## 7. CONCLUSÕES

- 1) A sucessão ecológica secundária favoreceu mudanças na comunidade de aves em curto prazo de tempo no Parque Estadual da Mata Seca, aumentando a quantidade de espécies dependentes de floresta em estágios mais avançados.
- 2) A sucessão ecológica secundária diminui a prevalência de parasitos de potencial patogênico em comunidades de aves de vida livre.
- 3) Espécies de aves que utilizam vários estágios sucessionais apresentam maiores riscos de infecção em áreas de pastagem.
- 4) O fenômeno conhecido como “recaída de primavera” parece ocorrer em aves no PEMS, indicando sazonalidade na prevalência e na dominância de linhagens de *Plasmodium*.
- 5) A distribuição dos parasitos do subgênero *Parahaemoproteus* apresenta sazonalidade marcante no PEMS, sendo detectados apenas durante a estação chuvosa.
- 6) O presente trabalho expande a lista de possíveis vetores de *Plasmodium* aviários, incluindo mosquitos das espécies *Mansonia titillans* e *Ma. pseudotitillans*.
- 7) O baixo sucesso na obtenção de mosquitos positivos pode ser atribuído ao método de captura aqui utilizado (armadilha Shannon), e por isso sugere-se que futuros trabalhos utilizem diversos tipos de armadilhas em períodos de 24 horas para minimizar este viés de coleta.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alencar J, Lorosa ES, Silva J dos S, Lopes CM, Guimarães AE 2005. Observações sobre padrões alimentares de mosquitos (Diptera: Culicidae) no Pantanal Mato-Grossense. *Neotrop Entomol* 34: 681–687.
- Almazán-Núñez RC, Arizmendi M del C, Eguiarte LE, Corcuera P 2015. Distribution of the community of frugivorous birds along a successional gradient in a tropical dry forest in southwestern Mexico. *J. Trop. Ecol.* 31: 57–68.
- Altizer S, Dobson A, Hosseini P, Hudson P, Pascual M, Rohani P 2006. Seasonality and the dynamics of infectious diseases: Seasonality and infectious diseases. *Ecol. Lett.* 9: 467–484.
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Moraes G de, Leonardo J, Sparovek G 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 22: 711–728.
- Alvarez-Anorve MY, Quesada M, Sanchez-Azofeifa GA, Avila-Cabadilla LD, Gamon JA 2012. Functional regeneration and spectral reflectance of trees during succession in a highly diverse tropical dry forest ecosystem. *Am. J. Bot.* 99: 816–826.
- Applegate JE, Beaudoin RL, Seeley DC 1971. The effect of spring relapse in English sparrows on infectivity of malaria to mosquitoes. *J. Wildl. Dis.*
- Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, Rosário VE do 2000. *Plasmodium* sp.: Optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (*Anopheles* sp.) samples. *Exp. Parasitol.* 94: 269–272.
- Arroyo-Rodríguez V, Melo FPL, Martínez-Ramos M, Bongers F, Chazdon RL, Meave JA, Norden N, Santos BA, Leal IR, Tabarelli M 2015. Multiple successional pathways in human-modified tropical landscapes: new insights from forest succession, forest fragmentation and landscape ecology research: Multiple successional pathways. *Biol. Rev.:* n/a-n/a.

- Belo NO, Pinheiro RT, Reis ES, Ricklefs RE, Braga ÉM 2011. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. *PLoS ONE* 6: e17654.
- Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW 1993. Avian Haematozoa: mortality and pathogenicity. *J. Nat. Hist.* 27: 993–1001.
- Bensch S, Åkesson S 2003. Temporal and Spatial Variation of Hematozoans in Scandinavian Willow Warblers. *J. Parasitol.* 89: 388–391.
- 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.
- 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? *Evol. Int. J. Org. Evol.* 58: 1617–1621.
- Bensch S, Waldenström J, Jonzén N, Westerdahl H, Hansson B, Sejberg D, Hasselquist D 2007. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *J. Anim. Ecol.* 76: 112–122.
- Bonneaud C, Sepil I, Milá B, Buermann W, Pollinger J, Sehgal RNM, Valkiūnas G, Iezhova TA, Saatchi S, Smith TB 2009. The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *J. Trop. Ecol.* 25: 439.
- Braga ÉM, Silveira P, Belo NO, Valkiūnas 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.
- Brearley G, Rhodes J, Bradley A, Baxter G, Seabrook L, Lunney D, Liu Y, McAlpine C 2013. Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes: Wildlife disease in human-modified landscapes. *Biol. Rev.* 88: 427–442.

- Brook BW, Bradshaw CJA, Koh LP, Sodhi NS 2006. Momentum drives the crash: Mass extinction in the tropics. *Biotropica* 38: 302–305.
- Bueno MG, Lopez RPG, Menezes RMT de, Costa-Nascimento M de J, Lima GFM de C, Araújo RA de S, Guida FJV, Kirchgatter K 2010. Identification of *Plasmodium relictum* causing mortality in penguins (*Spheniscus magellanicus*) from São Paulo Zoo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 173: 123–127.
- Cannell BL, Krasnec KV, Campbell K, Jones HI, Miller RD, Stephens N 2013. The pathology and pathogenicity of a novel *Haemoproteus* spp. infection in wild Little Penguins (*Eudyptula minor*). *Vet. Parasitol.* 197: 74–84.
- Carlson JS, Walther E, TroutFryxell R, Staley S, Tell LA, Sehgal RNM, Barker CM, Cornel AJ 2015. Identifying avian malaria vectors: sampling methods influence outcomes. *Parasit. Vectors* 8: 365.
- Carrete M, Serrano D, Illera JC, López G, Vögeli M, Delgado A, Tella J 2009. Goats, birds, and emergent diseases: apparent and hidden effects of exotic species in an island environment. *Ecol. Appl.* 19: 840–853.
- Castro I, Howe L, Tompkins DM, Barraclough RK, Slaney D 2011. Presence and seasonal prevalence of *Plasmodium* spp. in a rare endemic New Zealand passerine (tieke or saddleback, *Philesturnus carunculatus*). *J. Wildl. Dis.* 47: 860–867.
- Chagas CRF, Guimarães L de O, Monteiro EF, Valkiūnas G, Katayama MV, Santos SV, Guida FJV, Simões RF, Kirchgatter K 2015. Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. *Parasitol. Res.* 115: 1443–1452.
- Chasar A, Loiseau C, ValkiūNas G, Iezhova T, Smith TB, Sehgal RNM 2009. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Mol. Ecol.* 18: 4121–4133.



- Christe P, Møller AP, González G, De Lope F 2002. Intra-seasonal variation in immune defence, body mass and hematocrit in adult house martins *Delichon urbica*. *J. Avian Biol.* 33: 321–325.
- 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.
- Confalonieri UEC, Margonari C, Quintão AF 2014. Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Trop.* 129: 33–41.
- Consoli RAGB, Oliveira RL de 1994. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.
- Cornet S, Bichet C, Larcombe S, Faivre B, Sorci G 2014a. Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. *J. Anim. Ecol.* 83: 256–265.
- Cornet S, Nicot A, Rivero A, Gandon S 2014b. Evolution of plastic transmission strategies in avian malaria. *PLoS Pathog* 10: e1004308.
- 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.
- Dinhopl N, Nedorost N, Mostegl MM, Weissenbacher-Lang C, Weissenböck H 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.
- Dodge M, Guers SL, Sekercioğlu ÇH, Sehgal RNM 2013. North American transmission of hemosporidian parasites in the Swainson's thrush (*Catharus ustulatus*), a migratory songbird. *J. Parasitol.* 99: 548–553.
- Dornelas AAF 2010. Avifauna do Parque Estadual da Mata Seca. Dissertação de mestrado, 76 p. Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais.

- Dornelas AAF, Paula DC de, Santo MME, Azofeifa GS, Leite LO 2012. Avifauna of the Mata Seca State Park, north of Minas Gerais. *Rev. Bras. Ornitol.-Braz. J. Ornithol.* 20: 14.
- Duarte JMB, Vogliotti A, Santos Zanetti E dos, Oliveira ML de, Tiepolo LM, Rodrigues LF, Almeida LB de 2012. Avaliação do risco de extinção do veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* G. Fischer [von Waldhein], 1814, no Brasil. *Biodiversidade Bras.:* 50–58.
- Dunn RR 2004. Recovery of faunal communities during tropical forest regeneration. *Conserv. Biol.* 18: 300–309.
- Ejiri H, Sato Y, Kim KS, Tsuda Y, Murata K, Saito K, Watanabe Y, Shimura Y, Yukawa M 2011. Blood Meal Identification and Prevalence of Avian Malaria Parasite in Mosquitoes Collected at Kushiro Wetland, a Subarctic Zone of Japan. *J. Med. Entomol.* 48: 904–908.
- Ellis VA, Collins MD, Medeiros MCI, Sari EHR, Coffey ED, Dickerson RC, Lugarini C, Stratford JA, Henry DR, Merrill L, Matthews AE, Hanson AA, Roberts JR, Joyce M, Kunkel MR, Ricklefs RE 2015. Local host specialization, host-switching, and dispersal shape the regional distributions of avian haemosporidian parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 11294–11299.
- Espírito-Santo MM, Sevilha AC, Anaya FC, Barbosa R, Fernandes GW, Sanchez-Azofeifa GA, Scariot A, Noronha SE de, Sampaio CA 2009. Sustainability of tropical dry forests: Two case studies in southeastern and central Brazil. *For. Ecol. Manag.* 258: 922–930.
- Falcão LAD, Espírito-Santo MM do, Leite LO, Garro RNSL, Avila-Cabadilla LD, Stoner KE 2014. Spatiotemporal variation in phyllostomid bat assemblages over a successional gradient in a tropical dry forest in southeastern Brazil. *J. Trop. Ecol.* 30: 123–132.
- Fallon SM, Ricklefs RE, Latta SC, Bermingham E 2004. Temporal stability of insular avian malarial parasite communities. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271: 493–500.
- Fallon SM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E 2003. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *J. Parasitol.* 89: 1044–1047.

- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Marm Kilpatrick A 2011. “Bird biting” mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1577–1585.
- Fecchio A, Lima MR, Svensson-Coelho M, Marini MÂ, Ricklefs RE 2013. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. *Parasitology* 140: 181–192.
- Finegan B 1996. Pattern and process in neotropical secondary rain forests: the first 100 years of succession. *Trends Ecol. Evol.* 11: 119–124.
- Forratini OP 2002. *Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2*. EdUSP, São Paulo, SP.
- Gager AB, Del Rosario Loaiza J, Dearborn DC, Bermingham E 2008. Do mosquitoes filter the access of *Plasmodium* cytochrome *b* lineages to an avian host? *Mol. Ecol.* 17: 2552–2561.
- Garnham PCC 1966. *Malaria parasites and other haemosporidia*. Blackwell Scientific.
- Gonzalez-Quevedo C, Davies RG, Richardson DS 2014. Predictors of malaria infection in a wild bird population: landscape-level analyses reveal climatic and anthropogenic factors (K Wilson, Ed.). *J. Anim. Ecol.* 83: 1091–1102.
- Guariguata MR, Ostertag R 2001. Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. *For. Ecol. Manag.* 148: 185–206.
- Hasselquist D, Östman Ö, Waldenström J, Bensch S 2007. Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *J. Ornithol.* 148: 401–409.
- 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.

- Hellgren O, Waldenström J, Peréz-Tris J, Szöll E, Si ö, Hasselquist D, Krizanauskiene A, Ottosson U, Bensch S 2007. Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach. *Mol. Ecol.* 16: 1281–1290.
- Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD 2007. Efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito haemocoel. *Int. J. Parasitol.* 37: 673–681.
- Instituto Estadual de Florestas 2011. *Atlas da Fauna em Unidades de Conservação do Estado de Minas Gerais – volume I Mastofauna*. IEF, Belo Horizonte.
- Ishtiaq F, Guillaumot L, Clegg SM, Phillimore AB, Black RA, Owens IPF, Mundy NI, Sheldon BC 2008. Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. *Mol. Ecol.* 17: 4545–4555.
- Kazlauskienė R, Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova TA, Valkiūnas G 2013. *Plasmodium relictum* (lineages pSGS1 and pGRW11): Complete synchronous sporogony in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*. *Exp. Parasitol.* 133: 454–461.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS 2006. Effects of species diversity on disease risk: Effects of species diversity on disease risk. *Ecol. Lett.* 9: 485–498.
- 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.
- Kim K, Tsuda Y 2015. Sporogony and sporozoite rates of avian malaria parasites in wild *Culex pipiens pallens* and *C. inatomii* in Japan. *Parasit. Vectors* 8: 633.
- Kim KS, Tsuda Y, Sasaki T, Kobayashi M, Hirota Y 2009. Mosquito blood-meal analysis for avian malaria study in wild bird communities: laboratory verification and application to *Culex sasai* (Diptera: Culicidae) collected in Tokyo, Japan. *Parasitol. Res.* 105: 1351–1357.

- Kimura M, Darbro JM, Harrington LC 2010. Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. *J. Parasitol.* 96: 144–151.
- 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.
- Lacorte GA, Félix GMF, Pinheiro RRB, Chaves AV, Almeida-Neto G, Neves FS, Leite LO, Santos FR, Braga ÉM 2013. Exploring the diversity and distribution of Neotropical avian malaria parasites – A molecular survey from Southeast Brazil (G Snounou, Ed.). *PLoS ONE* 8: e57770.
- Lafferty KD, Dobson AP, Kuris AM 2006. Parasites dominate food web links. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 11211–11216.
- Lalubin F, Delédevant A, Glaizot O, Christe P 2013. Temporal changes in mosquito abundance (*Culex pipiens*), avian malaria prevalence and lineage composition. *Parasit Vectors* 6: 307.
- Laurance SGW, Jones D, Westcott D, Mckeown A, Harrington G, Hilbert DW 2013. Habitat fragmentation and ecological traits influence the prevalence of avian blood parasites in a Tropical Rainforest landscape. *PLoS ONE* 8: e76227.
- 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.
- Levin II, Valkiūnas G, Iezhova TA, O'Brien SL, Parker PG 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.
- Liu X-B, Liu Q-Y, Guo Y-H, Jiang J-Y, Ren D-S, Zhou G-C, Zheng C-J, Zhang Y, Liu J-L, Li Z-F, others 2011. The abundance and host-seeking behavior of culicine species (Diptera: Culicidae) and *Anopheles sinensis* in Yongcheng city, people's Republic of China. *Parasit. Vectors* 4: 1.

- Loaiza JR, Miller MJ 2013. Seasonal pattern of avian Plasmodium-infected mosquitoes and implications for parasite transmission in central Panama. *Parasitol. Res.* 112: 3743–3751.
- Loiseau C, Iezhova T, Valkiūnas G, Chasar A, Hutchinson A, Buermann W, Smith TB, Sehgal RNM 2010. Spatial variation of haemosporidian parasite infection in African rainforest bird species. *J. Parasitol.* 96: 21–29.
- Lorosa ES, Faria MS, De Oliveira LCM, Alencar J, Marcondes CB 2010. Blood meal identification of selected mosquitoes in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 26: 18–23.
- Madeira BG, Espírito-Santo MM, Neto SD, Nunes YRF, Arturo Sánchez Azofeifa G, Fernandes GW, Quesada M 2009. Changes in tree and liana communities along a successional gradient in a tropical dry forest in south-eastern Brazil. *Plant Ecol.* 201: 291–304.
- Mantilla JS, González AD, Valkiūnas G, Moncada LI, Matta NE 2013. Description and molecular characterization of *Plasmodium* (Novyella) *unalis* sp. nov. from the Great Thrush (*Turdus fuscater*) in highland of Colombia. *Parasitol. Res.* 112: 4193–4204.
- Marini MÂ, Durães R 2001. Annual patterns of molt and reproductive activity of passerines in south-central Brazil. *The condor* 103: 767–775.
- Marini M, Sousa N, Borges F, Silveira M 2009. Biologia reprodutiva de *Elaenia cristata* (Aves: Tyrannidae) em cerrado do Brasil central. *Neotropical Biol. Conserv.* 4: 2–12.
- Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 261–273.
- Matthews AE, Ellis VA, Hanson AA, Roberts JR, Ricklefs RE, Collins MD 2016. Avian haemosporidian prevalence and its relationship to host life histories in eastern Tennessee. *J. Ornithol.* 157: 533–548.

- Mendenhall CD, Archer HM, Brenes FO, Sekercioglu CH, Sehgal RNM 2013. Balancing biodiversity with agriculture: Land sharing mitigates avian malaria prevalence: Balancing biodiversity with agriculture. *Conserv. Lett.* 6: 125–131.
- Mendes L, Pardal S, Morais J, Antunes S, Ramos JA, Perez-Tris J, Piersma T 2013. Hidden haemosporidian infections in Ruffs (*Philomachus pugnax*) staging in Northwest Europe en route from Africa to Arctic Europe. *Parasitol. Res.* 112: 2037–2043.
- Miles L, Newton AC, DeFries RS, Ravilious C, May I, Blyth S, Kapos V, Gordon JE 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *J. Biogeogr.* 33: 491–505.
- Moens MAJ, Pérez-Tris J 2016. Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. *Int. J. Parasitol.* 46: 41–49.
- Motta ROC, Romero Marques MV, Ferreira Junior FC, Andery D de A, Horta RS, Peixoto RB, Lacorte GA, Moreira P de A, Paes Leme F de O, Melo MM, Martins NR da S, Braga ÉM 2013. Does haemosporidian infection affect hematological and biochemical profiles of the endangered Black-fronted piping-guan (*Aburria jacutinga*)? *PeerJ* 1: e45.
- Moura NG, Lees AC, Andretti CB, Davis BJW, Solar RRC, Aleixo A, Barlow J, Ferreira J, Gardner TA 2013. Avian biodiversity in multiple-use landscapes of the Brazilian Amazon. *Biol. Conserv.* 167: 339–348.
- Mukhin A, Palinauskas V, Platonova E, Kobylkov D, Vakoliuk I, Valkiūnas G 2016. The strategy to survive primary malaria infection: an experimental study on behavioural changes in parasitized birds. *PLOS ONE* 11: e0159216.
- Nassar J, Stoner KE, Ávila-Cabadilla L, Espírito-Santo MM do, Aranguren CI, González-Carcacía JA, Lobato-García JM, Olívio-Leite L, Álvarez-Añorve M, Matos Brandão HN de, others 2013. Fruit-eating bats and birds of three seasonal tropical dry forests in the Americas. *Trop. Dry For. Am.*: 173–220.

- Neves FS, Silva JO, Espírito-Santo MM, Fernandes GW 2014. Insect herbivores and leaf damage along successional and vertical gradients in a Tropical Dry Forest. *Biotropica* 46: 14–24.
- Njabo KY, Cornel AJ, Bonneaud C, Toffelmier E, Sehgal RNM, Valkiūnas G, Russell AF, Smith TB 2011. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Mol. Ecol.* 20: 1049–1061.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H 2016. *vegan: Community Ecology Package*.
- 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.
- Ostfeld RS, Keesing F 2000. Biodiversity and disease risk: the case of Lyme disease. *Conserv. Biol.* 14: 722–728.
- Outlaw DC, Ricklefs RE 2011. Rerooting the evolutionary tree of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 13183–13187.
- Outlaw DC, Ricklefs RE 2014. Species limits in avian malaria parasites (Haemosporida): how to move forward in the molecular era. *Parasitology* 141: 1223–1232.
- Pardini R, Bueno A de A, Gardner TA, Prado PI, Metzger JP 2010. Beyond the fragmentation threshold hypothesis: regime shifts in biodiversity across fragmented landscapes. *PLoS ONE* 5: e13666.
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* 30: 1395–1405.



- Paula MB, Gomes A de C, Natal D, Duarte AMR de C, Mucci LF 2012. Effects of artificial flooding for hydroelectric development on the population of *Mansonia humeralis* (Diptera: Culicidae) in the Paraná River, São Paulo, Brazil. *J. Trop. Med.* 2012: 1–6.
- Pérez-Rodríguez A, Hera I de la, Bensch S, Pérez-Tris J 2015. Evolution of seasonal transmission patterns in avian blood-borne parasites. *Int. J. Parasitol.* 45: 605–611.
- Pezzini FF, Ranieri BD, Brandão DO, Fernandes GW, Quesada M, Espírito-Santo MM, Jacobi CM 2014. Changes in tree phenology along natural regeneration in a seasonally dry tropical forest. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 148: 965–974.
- Pinheiro RBP, Félix GMF, Chaves AV, Lacorte GA, Santos FR, Braga ÉM, Mello MAR 2016. Trade-offs and resource breadth processes as drivers of performance and specificity in a host-parasite system: a new integrative hypothesis. *Int. J. Parasitol.* 46: 115–121.
- Portillo-Quintero CA, Sánchez-Azofeifa GA 2010. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biol. Conserv.* 143: 144–155.
- Posada D, Crandall KA 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Quesada M, Sanchez-Azofeifa GA, Alvarez-Añorve M, Stoner KE, Avila-Cabadilla L, Calvo-Alvarado J, Castillo A, Espírito-Santo MM, Fagundes M, Fernandes GW, Gamon J, Lopezaraiza-Mikel M, Lawrence D, Morellato LPC, Powers JS, Neves F de S, Rosas-Guerrero V, Sayago R, Sanchez-Montoya G 2009. Succession and management of tropical dry forests in the Americas: Review and new perspectives. *For. Ecol. Manag.* 258: 1014–1024.
- R Development Core Team 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Randolph SE, Dobson ADM 2012. Pangloss revisited: a critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology* 139: 847–863.

- Reinert JF 1975. Mosquito Generic and Subgeneric Abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 7: 105–110.
- Reiter ME, LaPointe DA 2007. Landscape factors influencing the spatial distribution and abundance of mosquito vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in a mixed residential-agricultural community in Hawai'i. *J. Med. Entomol.* 44: 861–868.
- Ricklefs RE, Fallon SM 2002. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 269: 885–892.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Roos FL, Belo NO, Silveira P, Braga EM 2015. Prevalence and diversity of avian malaria parasites in migratory Black Skimmers (*Rynchops niger*, Laridae, Charadriiformes) from the Brazilian Amazon Basin. *Parasitol. Res.* 114: 3903–3911.
- Rueda LM 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 477–487.
- Sambrook J, Russell DW 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Azofeifa GA, Powers JS, Fernandes GW, Quesada M 2013. *Tropical Dry Forests in the Americas: Ecology, Conservation, and Management*.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17: 914–921.
- Santiago-Alarcon D, Havelka P, Schaefer HM, Segelbacher G 2012a. Bloodmeal analysis reveals avian *Plasmodium* infections and broad host preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors (RE Paul, Ed.). *PLoS ONE* 7: e31098.

- Santiago-Alarcon D, Palinauskas V, Schaefer HM 2012b. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biol. Rev.* 87: 928–964.
- Santos CF 2011. Mosquitos (Diptera: Culicidae) do Parque Estadual da Mata Seca, MG: sazonalidade e impacto da pecuária bovina.
- Santos Silva J dos, Alencar J, Costa JM, Seixas-Lorosa E, Guimarães AÉ 2012. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in six Brazilian environmental preservation areas. *J. Vector Ecol.* 37: 342–350.
- Sawabe K, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Roychoudhury S, Higa Y, Kasai S, Tsuda Y, Nishiumi I, Hisai N, Hamao S, Kobayashi M 2010. Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan. *J. Med. Entomol.* 47: 442–450.
- 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. *The Auk* 120: 130.
- Sehgal RNM 2015. Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4: 421–430.
- Sevilha AC, Scariot A, Noronha SE de 2004. Representatividade UCs em florestas estacionais decíduais no Brasil. In: *Ann. 55th Congr. Nac. Botânica*, Sociedade Brasileira de Botânica, pp. 1–63.
- Smith KF, Sax DF, Lafferty KD 2006. Evidence for the Role of Infectious Disease in Species Extinction and Endangerment. *Conserv. Biol.* 20: 1349–1357.

- Suzán G, Marcé E, Giermakowski JT, Mills JN, Ceballos G, Ostfeld RS, Armién B, Pascale JM, Yates TL 2009. Experimental Evidence for Reduced Rodent Diversity Causing Increased Hantavirus Prevalence. *PLoS ONE* 4: e5461.
- Svensson-Coelho M, Ellis VA, Loiselle BA, Blake JG, Ricklefs RE 2014. Reciprocal specialization in multihost Malaria Parasite communities of birds: a temperate-tropical comparison. *Am. Nat.* 184: 624–635.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729.
- Valkiūnas G 2005. *Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Valkiūnas G 2011. Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Mol. Ecol.* 20: 3084–3086.
- Valkiūnas G, Iezhova TA, Brooks DR, Hanelt B, Brant SV, Sutherlin ME, Causey D 2004. Additional observations on blood parasites of birds in Costa Rica. *J. Wildl. Dis.* 40: 555–561.
- Valkiūnas G, Iezhova TA, Loiseau C, Sehgal RNM 2009. Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of Hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected brds. *J. Parasitol.* 95: 1512–1515.
- Valkiūnas G, Kazlauskienė R, Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova TA 2013. Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitol. Res.* 112: 2159–2169.
- Vanstreels RET, Kolesnikovas CKM, Sandri S, Silveira P, Belo NO, Ferreira Junior FC, Epiphanyo S, Steindel M, Braga ÉM, Catão-Dias JL 2014. Outbreak of avian malaria associated

to multiple species of *Plasmodium* in Magellanic Penguins undergoing rehabilitation in Southern Brazil (T Spielmann, Ed.). *PLoS ONE* 9: e94994.

Vieira DL, Scariot A 2006. Principles of natural regeneration of tropical dry forests for restoration. *Restor. Ecol.* 14: 11–20.

Villar CM, Bryan AL, Lance SL, Braga EM, Congrains C, Del Lama SN 2013. Blood parasites in nestlings of wood stork populations from three regions of the American continent. *J. Parasitol.* 99: 522–527.

Vittor AY, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields TIM, Lozano WS, Pinedo-Cancino V, Patz JA 2006. The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 3–11.

Vittor AY, Pan W, Gilman RH, Tielsch J, Glass G, Shields T, Sánchez-Lozano W, Pinedo VV, Salas-Cobos E, Flores S, Patz JA 2009. Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 5–12.

Warner RE 1968. The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *The Condor* 70: 101–120.

Wilcove DS, Rothstein D, Dubow J, Phillips A, Losos E 1998. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience*: 607–615.

Wilkinson LC, Handel CM, Van Hemert C, Loiseau C, Sehgal RNM 2016. Avian malaria in a boreal resident species: long-term temporal variability, and increased prevalence in birds with avian keratin disorder. *Int. J. Parasitol.* 46: 281–290.

Wood MJ, Cosgrove CL, Wilkin TA, Knowles SCL, Day KP, Sheldon BC 2007. Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Mol. Ecol.* 16: 3263–3273.

Young HS, Dirzo R, Helgen KM, McCauley DJ, Billeter SA, Kosoy MY, Osikowicz LM, Salkeld DJ, Young TP, Dittmar K 2014. Declines in large wildlife increase landscape-level prevalence of rodent-borne disease in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 7036–7041.

## 9. APÊNDICES

Apêndice 1: Número de aves capturadas e prevalência de hemossporídeos de acordo com o estágio sucessional.

Espécie	Família	Pastagem (prev)		Inicial (prev)		Interm. (prev)		Tardio (prev)		Total (prev)	
<i>Nystalus maculatus</i> <sup>c</sup>	Buconidae (Galbuliformes)	9	22%	2	0%	3	0%	0	NA	14	14%
<i>Columbina squammata</i> <sup>c</sup>	Columbidae (Columbiformes)	9	77%	0	NA	2	50%	1	100%	12	75%
<i>Columbina picui</i> <sup>b</sup>	Columbidae (Columbiformes)	8	62%	0	NA	0	NA	0	NA	8	63%
<i>Leptotila verreauxi</i>	Columbidae (Columbiformes)	2	50%	1	0%	0	NA	1	100%	4	50%
<i>Sittasomus griseicapillus</i> <sup>a</sup>	Dendrocolaptidae	0	NA	4	50%	13	46%	7	28%	24	42%
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	Dendrocolaptidae	0	NA	1	0%	2	0%	1	0%	4	0%
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Dendrocolaptidae	1	0%	3	0%	0	NA	0	NA	4	0%
<i>Synallaxis scutata</i>	Furnariidae	0	NA	0	NA	2	50%	3	33%	5	40%
<i>Furnarius leucopus</i>	Furnariidae	0	NA	3	66%	1	0%	0	NA	4	50%
<i>Basileuterus flaveolus</i> <sup>a</sup>	Parulidae	0	NA	1	0%	3	33%	4	50%	8	38%
<i>Ammodramus humeralis</i> <sup>b</sup>	Passerelidae	8	62%	0	NA	0	NA	0	NA	8	63%
<i>Hemitriccus margaritaceiventer</i> <sup>a</sup>	Pipromorphidae	0	NA	3	0%	3	33%	1	0%	7	14%
<i>Tolmomyias flaviventris</i> <sup>a</sup>	Rhynchocyclidae	0	NA	1	0%	10	10%	10	20%	21	14%
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Rhynchocyclidae	0	NA	0	NA	1	0%	4	0%	5	0%

Foram incluídas apenas espécies amostradas quatro ou mais vezes. prev = prevalência de hemossporídeos. <sup>a</sup> = espécies bem amostradas (sete ou mais indivíduos) capturadas nos estágios iniciais, intermediários e tardios; <sup>b</sup> = espécies bem amostradas capturadas apenas em áreas de pastagem; <sup>c</sup> = espécies bem amostradas com três ou mais indivíduos capturados em áreas de pastagem e três ou mais indivíduos capturados em áreas de não pastagem; <sup>d</sup> = espécies bem amostradas que não se encaixam nas categorias anteriores.

## Continuação Apêndice 1

Espécie	Família	Pastagem (prev)		Inicial (prev)		Interm. (prev)		Tardio (prev)		Total (prev)	
<i>Thamnophilus pelzelni</i> <sup>a</sup>	Thamnophilidae	0	NA	9	66%	18	27%	16	50%	43	44%
<i>Formicivora melanogaster</i> <sup>a</sup>	Thamnophilidae	0	NA	4	50%	7	42%	8	37%	19	42%
<i>Sakesphorus cristatus</i>	Thamnophilidae	0	NA	2	100%	2	50%	2	100%	6	83%
<i>Thamnophilus capistratus</i>	Thamnophilidae	0	NA	1	100%	3	33%	1	0%	5	40%
<i>Coryphospingus pileatus</i> <sup>c</sup>	Thraupidae	56	60%	8	62%	21	52%	5	60%	90	59%
<i>Volatinia jacarina</i> <sup>e</sup>	Thraupidae	27	55%	1	0%	0	NA	0	NA	28	54%
<i>Conirostrum speciosum</i> <sup>d</sup>	Thraupidae	1	0%	2	0%	1	0%	3	0%	7	0%
<i>Paroaria dominicana</i>	Thraupidae	2	0%	2	100%	0	NA	0	NA	4	50%
<i>Troglodytes musculus</i> <sup>d</sup>	Troglodytidae	2	50%	0	NA	2	50%	3	0%	7	29%
<i>Turdus amaurochalinus</i> <sup>c</sup>	Turdidae	3	33%	3	0%	1	0%	2	0%	9	11%
<i>Myiopagis viridicata</i> <sup>f</sup>	Tyrannidae	1	0%	5	40%	4	0%	9	11%	19	16%
<i>Myiarchus tyrannulus</i> <sup>c</sup>	Tyrannidae	5	60%	3	33%	1	0%	2	0%	11	36%
<i>Cnemotriccus fuscatus</i> <sup>a</sup>	Tyrannidae	0	NA	2	0%	4	50%	4	50%	10	40%
<i>Myiodynastes maculatus</i> <sup>c</sup>	Tyrannidae	6	66%	0	NA	1	100%	3	0%	10	50%
<i>Lathrotriccus euleri</i> <sup>a</sup>	Tyrannidae	0	NA	3	0%	1	0%	3	33%	7	14%
<i>Campostoma obsoletum</i>	Tyrannidae	3	33%	1	0%	0	NA	1	0%	5	20%

prev = prevalência de hemospóridios. <sup>a</sup> = espécies bem amostradas (sete ou mais indivíduos) capturadas nos estágios iniciais, intermediários e tardios; <sup>b</sup> = espécies bem amostradas capturadas apenas em áreas de pastagem; <sup>c</sup> = espécies bem amostradas com três ou mais indivíduos capturados em áreas de pastagem e três ou mais indivíduos capturados em áreas de não pastagem; <sup>d</sup> = espécies bem amostradas que não se encaixam nas categorias anteriores. <sup>e</sup> = *V. jacarina* foi considerada não dependente de floresta de acordo com Dornelas (2010). <sup>f</sup> = *M. viridicata* foi considerada dependente de floresta por Dornelas (2010).



**Apêndice 2: Número de aves capturadas e prevalência de hemosporídeos de acordo com as épocas de coleta.**

Espécie	Família	Final chuva (prev)		Início seca (prev)		Final seca (prev)		Pico chuva (prev)		Total (prev)	
<i>Nystalus maculatus</i>	Buconidae (Galbuliformes)	1	0%	5	20%	4	25%	4	0%	14	14%
<i>Columbina squammata</i>	Columbidae (Columbiformes)	1	0%	2	50%	3	100%	6	83%	12	75%
<i>Columbina picui</i>	Columbidae (Columbiformes)	1	0%	4	75%	1	100%	2	50%	8	63%
<i>Leptotila verreauxi</i>	Columbidae (Columbiformes)	2	50%	1	0%	1	100%	0	NA	4	50%
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	Dendrocolaptidae	12	50%	4	0%	2	50%	6	50%	24	42%
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	Dendrocolaptidae	2	0%	0	NA	2	0%	0	NA	4	0%
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Dendrocolaptidae	2	0%	0	NA	1	0%	1	0%	4	0%
<i>Synallaxis scutata</i>	Furnariidae	0	NA	2	50%	0	NA	3	33%	5	40%
<i>Furnarius leucopus</i>	Furnariidae	0	NA	1	0%	3	66%	0	NA	4	50%
<i>Basileuterus flaveolus</i>	Parulidae	2	0%	1	0%	2	50%	3	66%	8	38%
<i>Ammodramus humeralis</i>	Passerelidae	1	0%	0	NA	1	100%	6	66%	8	63%
<i>Hemitriccus margaritaceiventer</i>	Pipromorphidae	3	0%	4	25%	0	NA	0	NA	7	14%
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	Rhynchocyclidae	5	40%	6	100%	7	0%	3	33%	21	14%
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Rhynchocyclidae	0	NA	1	0%	3	0%	1	0%	5	0%
<i>Thamnophilus pelzelni</i> <sup>a</sup>	Thamnophilidae	13	46%	10	20%	11	72%	9	33%	43	44%

## Continuação apêndice 2

Espécie	Família	Final chuva (prev)		Início seca (prev)		Final seca (prev)		Pico chuva (prev)		Total (prev)	
<i>Formicivora melanogaster</i>	Thamnophilidae	4	25%	8	25%	3	100%	4	50%	19	42%
<i>Sakesphorus cristatus</i>	Thamnophilidae	0	NA	1	100%	4	75%	1	100%	6	83%
<i>Thamnophilus capistratus</i>	Thamnophilidae	0	NA	3	0%	2	100%	0	NA	5	40%
<i>Coryphospingus pileatus<sup>a</sup></i>	Thraupidae	13	53%	27	48%	31	67%	19	63%	90	59%
<i>Volatinia jacarina</i>	Thraupidae	4	75%	1	0%	8	37%	15	60%	28	54%
<i>Conirostrum speciosum</i>	Thraupidae	3	0%	2	0%	1	0%	1	0%	7	0%
<i>Paroaria dominicana</i>	Thraupidae	1	100%	0	NA	2	50%	1	0%	4	50%
<i>Troglodytes musculus</i>	Troglodytidae	1	0%	4	50%	2	0%	0	NA	7	29%
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Turdidae	5	20%	0	NA	1	0%	3	0%	9	11%
<i>Myiopagis viridicata<sup>b</sup></i>	Tyrannidae	14	7%	0	NA	0	NA	5	40%	19	16%
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Tyrannidae	1	0%	1	0%	9	44%	0	NA	11	36%
<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Tyrannidae	5	60%	3	0%	1	0%	1	100%	10	40%
<i>Myiodynastes maculatus</i>	Tyrannidae	2	50%	0	NA	1	0%	7	57%	10	50%
<i>Lathrotriccus euleri</i>	Tyrannidae	4	25%	1	0%	1	0%	1	0%	7	14%
<i>Camptostoma obsoletum</i>	Tyrannidae	1	0%	1	0%	1	0%	2	50%	5	20%

Foram incluídas apenas espécies amostradas quatro ou mais vezes. prev = prevalência de hemossporídeos. <sup>a</sup> = espécies bem amostradas (sete ou mais indivíduos) em todas as épocas avaliadas; <sup>b</sup> = espécie bem amostrada capturada apenas em época chuvosa.

**Apêndice 3: Descrição das linhagens de hemosporídeos detectadas de acordo com o estágio sucessional e a época de coleta.**

<b>Linhagem</b>	<b>Espécie</b>	<b>Estágio sucessional</b>	<b>Período</b>	<b>n</b>
<b>h.h.COSQU02</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pastagem	Final Seca	1
<b>h.h.COSQU02</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pastagem	Pico chuvosa	2
<b>h.h.COSQU03</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
<b>h.h.COSQU04</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
h.h.COTAL01	<i>Columbina talpacoti</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
h.h.COTAL01	<i>Columbina talpacoti</i>	Pastagem	Início seca	1
h.h.JSC-2012 isolate SoCh3	<i>Columbina minuta</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
<b>h.h.LAPIL01</b>	<i>Columbina picui</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
<b>h.h.LAPIL01</b>	<i>Columbina picui</i>	Pastagem	Início seca	1
<b>h.h.LAPIL01</b>	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Início seca	1
<b>h.p.LAPIL02</b>	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
<b>h.p.MYMAC02</b>	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Intermediário	Pico chuvosa	1
<b>h.p.MYMAC03</b>	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
h.p.PAPOL02	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Intermediário	Pico chuvosa	1
<b>h.p.PAPOL07</b>	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
<b>h.p.PAPOL07</b>	<i>Pachyramphus polychopterus</i>	Intermediário	Início chuvosa	1
<b>h.p.PAPOL07</b>	<i>Thamnophilus pelzelni</i>	Intermediário	Início chuvosa	1
P. nucleophilum	<i>Ammodramus humeralis</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
P. nucleophilum	<i>Colaptes melanochloros</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
P. nucleophilum	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Início seca	1
P. nucleophilum	<i>Volatinia jacarina</i>	Pastagem	Início chuvosa	1
p.BAFLA03	<i>Basileuterus flaveolus</i>	Tardio	Final Seca	1
p.BAFLA03	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Tardio	Início chuvosa	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediário	Pico chuvosa	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediário	Início seca	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediário	Final Seca	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Início seca	3
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Final Seca	5
p.BAFLA03	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Pastagem	Final Seca	2
p.BAFLA03	<i>Myiopagis viridicata</i>	Inicial	Pico chuvosa	1
p.BAFLA03	<i>Sakesphorus cristatus</i>	Intermediário	Início seca	1
p.BAFLA03	<i>Thlypopsis sordida</i>	Pastagem	Início chuvosa	1
p.BAFLA03	<i>Volatinia jacarina</i>	Pastagem	Final Seca	2
p.BAFLA03	<i>Volatinia jacarina</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.BAFLA04	<i>Coereba flaveola</i>	Intermediário	Início seca	1
p.BAFLA04	<i>Columbina squammata</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediário	Início seca	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Tardio	Início seca	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Início seca	1
p.BAHYP01	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Início chuvosa	1

## Continuação apêndice 3.

<b>Linhagem</b>	<b>Espécie</b>	<b>Estágio sucessional</b>	<b>Período</b>	<b>n</b>
p.CMV-2012 haplotype H2	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.FOMEL01	<i>Formicivora melanogaster</i>	Tardio	Pico chuvosa	1
p.FOMEL01	<i>Formicivora melanogaster</i>	Intermediário	Início seca	1
<b>p.FOMEL02</b>	<i>Formicivora melanogaster</i>	Tardio	Início chuvosa	1
<b>p.FOMEL03</b>	<i>Formicivora melanogaster</i>	Inicial	Final Seca	1
<b>p.HESEL01</b>	<i>Herpsilochmus sellowi</i>	Intermediário	Final Seca	1
<b>p.LEVER03</b>	<i>Leptotila verreauxi</i>	Pastagem	Início chuvosa	1
<i>P. cathemerium</i>	<i>Ammodramus humeralis</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
<i>P. cathemerium</i>	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Intermediário	Início chuvosa	1
<i>P. cathemerium</i>	<i>Myiopagis viridicata</i>	Inicial	Pico chuvosa	1
<i>P. cathemerium</i>	<i>Synallaxis scutata</i>	Intermediário	Pico chuvosa	1
p.PADOM11	<i>Camptostoma obsoletum</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.PADOM11	<i>Campylorhamphus trochilirostris</i>	Intermediário	Pico chuvosa	1
p.PADOM11	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.PADOM11	<i>Volatinia jacarina</i>	Pastagem	Pico chuvosa	3
p.PAMIT01	<i>Leptotila verreauxi</i>	Tardio	Final Seca	1
p.PAMIT01	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Pastagem	Pico chuvosa	1
p.PHPAT01	<i>Basileuterus flaveolus</i>	Tardio	Pico chuvosa	1
p.PHPAT01	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediário	Final Seca	1
p.PHPAT01	<i>Paroaria dominicana</i>	Inicial	Final Seca	1
p.P-T138	<i>Volatinia jacarina</i>	Pastagem	Início chuvosa	1
p.P-T138	<i>Volatinia jacarina</i>	Pastagem	Pico chuvosa	3
<b>p.THPEL01</b>	<i>Thamnophilus pelzelni</i>	Inicial	Início chuvosa	1
<b>p.THPEL01</b>	<i>Thamnophilus pelzelni</i>	Intermediário	Final Seca	1
<b>p.TRMUS02</b>	<i>Troglodytes musculus</i>	Pastagem	Início seca	1
<b>p.TRMUS03</b>	<i>Troglodytes musculus</i>	Intermediário	Início seca	1
p.TUAMA01	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Pastagem	Início chuvosa	1

n = número de vezes que a associação entre linhagem/espécie/estágio/época foi encontrada. Siglas que precedem os nomes das linhagens: h.h. = *H. (Haemoproteus) spp.*; h.p. = *H. (Parahaemoproteus) spp.*, p. = *Plasmodium*. Linhagens detectadas pela primeira vez no presente estudo estão em negrito.

## 10. Manuscrito em preparação

### **Habitat modification and secondary succession influence avian haemosporidian distributions in southeastern Brazil**

Francisco C. Ferreira Junior, Vincenzo A. Ellis, Raquel A. Rodrigues, Lemuel O. Leite, Magno A. Z. Borges, Érika M. Braga.

#### **Introduction**

Land conversion for the purposes of livestock farming and agriculture development can alter vector-borne disease distributions (Brearley et al., 2013; Confalonieri et al., 2014). Such changes can result in the loss of biodiversity (Wilcove et al., 1998; Smith et al., 2006) and an increase in the prevalence of infectious disease in humans (Vittor et al., 2006; Civitello et al., 2015) and wildlife (Sehgal, 2010; Civitello et al., 2015). As human populations grow, human-mediated environmental changes will continue to occur and will impact host-parasite interactions worldwide (Sehgal, 2015). Therefore, it is of crucial importance to understand how habitat modifications affect the distributions of disease-causing organisms.

Natural forest regeneration may mitigate land conversion effects by improving habitat quality. This process, known as secondary succession, results from the initial arrival of short-lived pioneers species and ultimately the return of long-lived species after the human-modified land has been abandoned (Finegan, 1996; Guariguata and Ostertag, 2001). It often takes decades after land abandonment for previously forested areas to reach the structure and complexity (e.g. tree height, density, and species number) of mature forests (Miles et al., 2006; Alvarez-Anorve et al., 2012; Arroyo-Rodríguez et al., 2015). However, there is some controversy regarding how efficient these “secondary forests” are at sustaining long-term biodiversity (Brook et al., 2006). Nevertheless,

secondary succession undoubtedly changes faunal richness and composition (Dunn, 2004) by increasing the local diversity of forest-dependent animals (Pardini et al., 2010; Moura et al., 2013).

Changes in vertebrate community structure can influence disease transmission as well (Ezenwa et al., 2006; Keesing et al., 2010; Johnson et al., 2013). Thus, it is logical to suspect that pathogens distributions may change within areas undergoing secondary succession. For example, disturbed areas (i.e., those in the early stages of succession) can favor resilient species that are important pathogen reservoirs (Allan et al., 2009; Pardini et al., 2010), thereby increasing pathogen transmission and disease risk (Keesing et al., 2006; Suzán et al., 2009). Conversely, advanced successional stages, which harbor greater species diversity than early stages, may have lower disease risk as a result of the “dilution effect” (Ostfeld and Keesing, 2000; Keesing et al., 2006).

Avian haemosporidians are vector-borne protozoan parasites in the genera *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon*. These parasites are globally distributed and infect a wide number of host species (Clark et al., 2014; Moens and Pérez-Tris, 2016), which is considered an important parasite phenotype known as “host breadth”. Avian haemosporidian host breadth may be labile over small geographic and temporal scales (Ellis et al., 2015), potentially posing risks to naïve birds populations, especially in rapidly changing environments (Santiago-Alarcon et al., 2012). Furthermore, habitat modification in tropical forests has been associated with changes in prevalence and species richness of these parasites in places such as Cameroon (Bonneau et al., 2009; Chasar et al., 2009), Ghana (Loiseau et al., 2010), Australia (Laurance et al., 2013), and Costa Rica (Mendenhall et al., 2013).

Seasonally Dry Tropical Forest (SDTF) is one of the most threatened ecosystems in the world (Miles et al., 2006; Quesada et al., 2009). Most remaining areas of SDTF are found

in the Americas, and more than 66% of these forests have been lost due to human activities (Portillo-Quintero and Sánchez-Azofeifa, 2010). The current distribution of SDTF along the American continent is mostly composed of mosaics of secondary forest at different successional stages that vary in habitat structure, biodiversity, and integrity of ecological functions (Quesada et al., 2009; Alvarez-Anorve et al., 2012). One of the largest areas of SDTF is found in Brazil, but only 3.9% of its distribution is protected by Brazilian law (Sevilha et al., 2004). The reestablishment of forest on abandoned pasturelands has become an ongoing process in some parts of Brazil (Espírito-Santo et al., 2009; Portillo-Quintero and Sánchez-Azofeifa, 2010). This process has increased local plant diversity and structure (Madeira et al., 2009; Pezzini et al., 2014), changed insect-plant interactions (Neves et al., 2014) and the distributions of vertebrates such as bats (Nassar et al., 2013; Falcão et al., 2014) and birds (Nassar et al., 2013).

The objective of our work was to test whether secondary succession in SDTFs influences the distribution and prevalence of avian haemosporidian parasites. To do this, we measured the prevalence and diversity of avian haemosporidians in areas corresponding to different successional stages in a SDTF in southeastern Brazil. Since SDTFs undergo tremendous change in foliage coverage, with up to 95% of leaf area lost during the dry season (Madeira et al., 2009; Pezzini et al., 2014), we expected to find seasonal effects on haemosporidian distribution as well. Avian haemosporidians can exhibit seasonal changes in prevalence in temperate climates, with some parasite lineages having lower prevalence during the winter compared with spring and summer (Cosgrove et al., 2008; Kim & Tsuda, 2012; Lalubin et al., 2013). To address this, we sampled parasites at the peak and end of the rainy season, as well as at the middle and end of the dry season.

## **Material and methods**

### **Study site**

This study was conducted at the Mata Seca State Park (MSSP), a conservation site of 15,466 ha located in the São Francisco river valley in southeastern Brazil (14°48'36" – 14°56'59"S and 43°55'12" – 44°04'12"W). The region's climate is classified as tropical with dry summers ["As" category in Köppen's classification (Alvares et al., 2013)], with an average temperature of 23.4°C. The dry season starts in May with an average rainfall of 6 mm and the four following months typically receive less than 10 mm of rain in total. The rainy season starts in October and peaks between December and January, with monthly precipitation around 200 mm (Alvares et al., 2013). The area has a history of extensive cattle grazing, and approximately 1,525 ha of the MSSP consist of abandoned pasture fields at different successional stages, with the remaining areas considered as mosaics of secondary and primary patches of SDTF. These forests are dominated by deciduous trees that lose up to 95% of leaf area during the dry season (Madeira et al., 2009; Pezzini et al., 2014).

We captured birds in four different successional stages inside the MSSP, defined as "pasture", "early stage", "intermediate stage", and "late stage". We established three plots within each successional stage. The distance between plots within a successional stage varied from 0.13km to 2.27km. Pasture was used for extensive cattle grazing and was abandoned in 2008, five years before the beginning of our study. This vegetation consisted of exotic grass species, herbs and shrubs, and sparse trees. Early stage was defined as pastures that were abandoned in the year 2000, 13 years before our study. This successional stage had a single stratum of sparse trees, dominated by grasses, herbs, and shrubs. The intermediate stage represented pastures abandoned around 30 years before our study. This vegetation was composed of two strata of trees: deciduous trees of 10-12m in height and an understory of young trees, herbaceous species, and a high density of lianas. Finally, the late stage had no record of human intervention for at



least the last 50 years. This successional stage also had two strata of trees: tall deciduous trees forming a closed canopy at 18-20m in height and a lower stratum of low-density young trees and lianas. Further details regarding phenological changes can be found in Madeira et al. (2009) and in Pezzini et al. (2014).

We sampled birds at the end of the rainy season in April of 2013, at the middle (June) and at the end (September) of the dry season in 2013, and at the peak of the rainy season in January of 2014. Sampling effort was the same for all plots and sampling periods. For bird collection, we operated 15 mist-nets (12m long X 3m high with 20mm mesh size) during six hours starting at sunrise, for one at each plot, and nets were checked every 30 minutes.

### **Blood collection and DNA extraction**

We obtained blood through brachial venipuncture and stored the samples in absolute alcohol at room temperature for a maximum of five days. Samples were ultimately kept at -20°C until DNA was extracted. Before release, birds were tagged with individual aluminum leg-rings provided by the Brazilian Research Center for the Conservation of Wild Birds (CEMAVE).

Approximately 10  $\mu$ L of blood was transferred to 1.5 mL microtubes and samples were dried at 37°C for subsequent DNA extraction, for which we used a conventional phenol-chloroform method with isopropanol precipitation (Sambrook and Russell, 2001). The genomic DNA pellet was resuspended in 50  $\mu$ L of ultrapure water and quantified using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

### **Molecular characterization of haemosporidians**

Between 50 and 100 ng of the extracted DNA was used for a screening PCR that amplifies a 154-nucleotide segment of RNA-coding mitochondrial DNA of *Plasmodium* and

*Haemoproteus* in a single reaction. We used the primers 343F (5'-GCTCACGCATCGCTTCT-3') and 496R (5'-GACCGGTCATTTTCTTTG-3') designed by Fallon et al. (2003) under PCR conditions and amplification analysis described by Roos et al. (2015).

DNAs from positive individuals were submitted to a nested-PCR targeting the amplification of a 478 bp region of the cytochrome *b* gene. For the first reaction, we used primers HaemNFI (5'-AGACATGAAATATTATGGITAAG-3') and HaemNR3 (5'-GAAATAAGATAAGAAATACCATTC-3') (Hellgren et al., 2004) with 50-100 ng of genomic DNA. A 1- $\mu$ L aliquot of this PCR product was then used as a template for the second reaction with the primers HaemF (5'-CTTATGGTGTCTGA-TATATGCATG-3') and HaemR2 (5'-CGCTTATCTGGAGATTGTAATGGTT-3') (Bensch et al., 2000). DNA extracted from blood samples of chickens experimentally infected with *Plasmodium gallinaceum* and ultrapure water were used as positive and negative controls, respectively. These nested-PCRs followed the protocol in Hellgren et al., (2004)

Products from all positive nested-PCRs were purified with Polyethylene Glycol 8000 following Sambrook and Russell (2001). Bi-directional sequencing with dye-terminator fluorescent labeling was performed in an ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems). DNA sequences were edited using MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) and compared with data available in public databases such as Genbank and MalAvi (Bensch et al., 2009). We considered sequences as different cytochrome *b* lineages when they differed by one or more nucleotides. Lineages with no database records were considered novel and sequences were deposited in Genbank and MalAvi.

A Bayesian phylogenetic tree for the parasite sequences found in this study was produced using MrBayes 3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with the GTR + I + G model of nucleotide evolution, as recommended by ModelTest (Posada and Crandall, 1998). We

ran two Markov chains simultaneously for 5 million generations in total that were sampled every 1000 generations. The first 1250 trees (25%) were discarded as a burn-in step and the remaining trees were used to calculate the posterior probabilities of each estimated node in the final consensus tree. We used *Leucocytozoon schoutedeni* as the outgroup to root the phylogenetic tree was midpoint rooted for presentation as suggested by Outlaw and Ricklefs (2011).

### **Statistical analysis**

We used chi-square with Yates correction to assess the difference in prevalence between different successional stages and sampling periods. We compared haemosporidian prevalence between species that were captured only in the pasture with species that were not captured in the pasture (henceforth non-pasture species). For species that were captured both in the pasture and in non-pasture areas, we compared prevalence between birds grouped according to the area of capture (pasture and non-pasture). For these analyses, we used only birds captured seven or more times.

The relative abundances of bird species and parasite lineages across successional stages and seasons were used to construct Bray-Curtis dissimilarity matrices and were ordinated by non-metric multidimensional scaling (NMDS). Differences between groups (i.e., successional stages and seasons) were tested statistically by one-way analysis of similarity (ANOSIM). ANOSIM compares average Bray-Curtis dissimilarities within and between groups (e.g. successional stages, temporal sampling periods). It produces an “R” statistic which is positive when average dissimilarities between groups are greater than average dissimilarities within groups. R approaches zero when average dissimilarities between and within groups are similar. R is tested for significance by permuting the grouping variable. The correlation between Bray-Curtis dissimilarity in birds and haemosporidians was assessed with a Mantel test using 9,999 permutations to test

for significance. These multivariate analyses were conducted in the package *vegan* (Oksanen et al., 2016) in R v.3.3.1 (R Development Core Team, 2016).

## Results

### Bird distribution

We analyzed blood samples from 461 birds belonging to 5 orders, 21 families, and 64 species. Our NMDS analysis suggested that bird communities in the pasture areas were different from those from the other successional stages, and this difference was statistically confirmed (ANOSIM;  $R = 0.979$ ;  $P = 0.005$ ).

There was no difference in bird composition in relation to seasons or between rainy and dry seasons (ANOSIM;  $R = -0.059$ ;  $P = 0.675$ ). From the 20 well-sampled species, *Coryphospingus pileatus* and *Thamnophilus pelzelni* were commonly found in all months, and *Myiopagis viridicata* ( $n = 19$ ) was captured only in the rainy season. There were no species exclusively found in the dry season.

### General parasite prevalence and diversity

From 461 individuals screened, 193 (42%) from 46 species were positive for *Plasmodium*/*Haemoproteus*. Prevalence differed greatly among the 20 best sampled host species (chi-square = 50.6;  $df = 19$ ;  $P < 0.001$ ), and ranged from 0% (*Conirostrum speciosum*;  $n = 7$ ) to 75% (*Columbina squammata*;  $n = 12$ ) (see Sup. table1).

All 193 samples that screened positive were subjected to the cytochrome *b* PCR, which successfully amplified infections from 97 of the individuals that screened positive. However, high-quality sequences were obtained from only 81 of those 97 samples, with no mixed infections detected. *Plasmodium* parasites were detected in 63 birds, representing 19 unique lineages. *Haemoproteus* was detected in 18 birds, representing

six unique lineages in the subgenus *Haemoproteus* and five unique lineages from the subgenus *Parahaemoproteus*. A total of 15 lineages were detected here for the first time (seven *Plasmodium* and eight *Haemoproteus*, sup. table 2).

### Parasite distribution across successional stages

Overall prevalence differed across successional stages (chi-square = 20.02; df = 3;  $P < 0.001$ ; Figure 2). In particular, prevalence was higher in the pasture than in any of the three successional stages (pasture vs early, chi-square = 4.75; df = 1;  $P = 0.029$ ; pasture vs intermediate, chi-square = 8.62; df = 1;  $P = 0.003$ ; pasture vs. late, chi-square = 15.775; df = 1;  $P = < 0.001$ ); but there was no difference in prevalence between the non-pasture successional stages (chi-squared = 2.11; df = 2;  $P = 0.3478$ ). Prevalence was higher in the pasture areas than in non-pasture ones when we compared only bird species common in both areas (e.g., individuals sampled at least three times in each pasture and non-pasture successional stages): *Columbina squammata*, *Myiarchus tyrannulus*, *Myiodynastes maculatus*, *Nystalus maculatus*, *Turdus amaurochalinus* [pasture = 53.1% (17 infections in 32 birds sampled); non-pasture = 20% (4/20); chi-square = 4.318;  $P = 0.037$ , Figure 3a]. Prevalence was also higher in birds exclusive from the pasture when compared with non-pasture species [pasture = 58% (25/43); non-pasture = 33.1% (52/157); chi-square = 7.898; df = 1;  $P = 0.005$ , sup. Figure 3b]. We analyzed *Coryphospingus pileatus* separately, since it was distributed across all successional stages, and there was no difference in prevalence among stages [58.8% (n = 90); chi-square = 0.49; df = 3;  $P = 0.921$ ] or when comparing the pasture to non-pasture stages (chi-square = 0.053; df = 1;  $P = 0.8175$ ).

Parasite communities were homogeneously distributed across successional stages as revealed by the NMDS analysis (Figure 4). Furthermore, statistical testing also showed no difference in parasite communities among successional stages (ANOSIM;  $R = 0.098$ ;

$P = 0.254$ ), suggesting that parasites may be less limited by successional stages than their hosts. Moreover, there was no correlation between the dissimilarity of bird and parasite communities among successional stages (Mantel correlation test;  $r = 0.184$ ;  $P = 0.10$ ).

We detected *Haemoproteus* (*Haemoproteus*) spp. parasites only in the pasture, with six unique lineages in 11 sequenced infections (Figure 5). Four out of five species of doves (order Columbiformes) and one species of passerine (*Coryphospingus pileatus*) were infected by this subgenus in all four sampling periods. *Parahaemoproteus* parasites were three times in the pasture and four times in the intermediate stage.

### **Parasite prevalence and distribution along seasons**

Total haemosporidian prevalence did not vary between the end of the rainy season and the middle of the dry season [36.2% (43/119) vs. 29.4% (30/102); chi-square = 0.838; df = 1;  $P = 0.359$ ], but prevalence did increase at the end of the dry season [29.4% (30/102) vs. 49.2% (62/126); chi-square = 8.372; df = 1;  $P = 0.004$ ]. Prevalence then remained at the same level at peak of the following rainy season [49.2% (62/126) vs. 51.7% (59/114); chi-square = 0.07; df = 1;  $P = 0.791$ ]. Parasite prevalence also increased from the middle to the end of the dry season in *Thamnophilus pelzelni* [20% (2/10) vs. 72.7% (8/11); chi-square = 3.915; df = 1;  $P = 0.047$ , sup. table 3], but the difference was not statistically significant for *Coryphospingus pileatus* [48% (13/27) vs. 67.7% (21/31); chi-square = 1.547; df = 1;  $P = 0.213$ , Table 2], two species well sampled in both dry periods. To remove the effect of the *H.* (*Haemoproteus*) spp. in the seasonal analysis, we excluded Columbiformes birds and the pattern in prevalence remained the same between the middle and the end of the dry season [25.8% (24/93) vs. 47.1% (57/121); chi-square = 9.26; df = 1;  $P = 0.002$ ]. The *Parahaemoproteus* subgenus was not detected during the dry season.

We also examined the effect of season on the prevalence of the most common *Plasmodium* lineage in the sample (BAFLA03,  $n = 21$ ). BAFLA03 infected eight species in four families from the order Passeriformes. Prevalence of this lineage at the end of the rainy season was 16.7% (2/12) and remained at the same level towards the middle of the dry season (31.25%; 5/16; chi-square = 0.194;  $df = 1$ ;  $P = 0.659$ ). The prevalence of BAFLA03 increased at the end of the dry season (61.1%; 11/18), but that change was not statistically significant (chi-square = 1.95;  $df = 1$ ;  $P = 0.162$ ). However, BAFLA03 prevalence did decrease at the peak of the rainy season (8.6%; 3/35; chi-square = 14.76;  $df = 1$ ;  $P = 0.0001$ ).

Parasite lineage richness also varied with season at MSSP: 10 parasite lineages were detected at the end of the rainy season; eight and seven lineages were detected at the middle and at the end of the dry season, respectively; and 21 parasite lineages were detected at the peak of the following rainy season (Table 3).

The lineage PADOM11 was detected six times and only at the peak of the rainy season, even though three out of four of its hosts (*Camptostoma obsoletum*, *C. pileatus*, and *V. jacarina*) were captured all year-round (Figure 5).

The subgenus *Parahaemoproteus* was only detected during the rainy season, with one lineage being detected twice at the end of the rainy season and five lineages detected at the peak of the following rainy season.

## Discussion

Past deforestation events have created mosaics of secondary forests at different successional stages in all tropical biomes of the globe. Hence, it is important to understand host-parasite interactions in these so-called “forests of the future”. We found differences in bird communities between the pasture and all other non-pasture areas in a

Seasonally Dry Tropical Forest, with higher haemosporidian prevalence in birds captured in pasture areas. However, parasite communities was similar within all successional stages, showing that their distribution is less restricted to habitat modifications.

Species captured exclusively in the pasture had a higher prevalence than species captured in non-pasture areas. Indeed, high pathogen prevalence has been demonstrated in mammalian species that are resilient to habitat modification, and this has been shown to amplify transmission in disturbed areas (Suzán et al., 2009; Young et al., 2014). This suggests that species exclusive from pasture areas may be highly competent reservoirs of heamosporidians, what could increase local transmission. *Volatinia jacarina*, *Ammodramus humeralis* and *Columbina picui* inhabit pasture areas of SDTF at high population densities. These specialist species, build nests at the ground level, where they obtain grass seeds (Dornelas et al., 2012). These species were found to be infected by four of the most host-generalist *Plasmodium* lineages detected in Southeastern Brazil [see specificity indexes for BAFLA03, PADOM11, *P. cathemerium* (PADOM09), and *P. nucleophilum* (DENPET03) in Pinheiro et al. (2016)] and were more often infected than those specialist birds from non-pasture areas. The increased abundance of hosts and the low host specificity of the parasites also may explain the increased parasite transmission and resulting in higher prevalence in the pasture successional stage.

Half of the parasite lineages detected in those three pasture species were also detected in *Coryphospingus pileatus* (the bird species well-sampled in all stages), including BAFLA03, PADOM11, and *P. nucleophilum*. *Coryphospingus pileatus* is tolerant to disturbed habitats but was commonly found in areas at advanced successional stages as well. Prevalence in this species was considerably high in all areas (58.8%). We expect that *C. pileatus* may be important for parasite dispersal among successional stages, given its broad habitat distribution. However, we do not currently have data to evaluate this



possibility. Vector abundance and distribution may also play a role in parasite prevalence in hosts at different successional stages. In a separate analysis of this area, Ferreira Junior et al. (*in review*) found a higher abundance of putative avian malaria vectors and higher abundance of total mosquito species in pasture areas when compared with other successional stages. This indicates that higher vector abundance may pose greater risks of infection of avian haemosporidian, what have been demonstrated in human malaria (Vittor et al., 2009).

Haemosporidian prevalence was higher in more intact forests of Cameroon (Bonneaud et al., 2009; Chasar et al., 2009) and in Ghana (Loiseau et al., 2010), and *Haemoproteus* prevalence was higher in continuous forests when compared with fragmented areas in Australia (Laurance et al., 2013). However, one of the two bird species assessed by Chasar et al. (2009) were more infected by some *Plasmodium* clades when sampled in disturbed areas. We demonstrated that the progression of secondary ecological succession benefits avian communities by reducing haemosporidian prevalence. These contrasting results in studies across tropical forests corroborate previous studies pointing that altered ecosystems shape host-parasite interactions at local scales in peculiar ways (Wood et al., 2007; Carrete et al., 2009). Analyzing parasite distribution in whole bird communities enabled us to point that some bird species increase the likelihood of infection for its co-inhabiting counterparts. Moreover, we found that other species are not important at dispersing parasites across successional stages, even though it ranges between areas with different forest degrees of integrity.

Interestingly, bird and parasite distributions were not correlated across successional stages. Birds had a more structured distribution across successional stages even at this small geographic scale, with a clear distinction between species sampled in the pasture and non-pasture areas. Conversely, haemosporidians had a more homogenous

distribution, suggesting that they move more freely across successional stages. The proximity of our sample areas implies relatively small differences in certain abiotic factors (e.g., rainfall, temperature, and altitude) among successional stages. Such factors are known to influence the prevalence of avian haemosporidians (Wood et al., 2007; Chasar et al., 2009 but see Ellis et al. 2015), so controlling for them allowed us to isolate the effect of the successional stage. Thus, our findings can be attributed mainly to different biotic factors between differing stages, such as vegetation structure (species richness, height and density of trees), what had been demonstrated to vary greatly in the beginning of the ecological succession in our area of study (Madeira et al., 2009; Pezzini et al., 2014).

Since we did not detect *H. (Parahaemoproteus)* spp. in the dry season, it is likely that *Plasmodium* spp. constituted the vast majority of parasites responsible for the increase in prevalence at the end of the dry season. Our mist-netting during the end of the dry season (last week of September 2013) corresponded to one month after the beginning of the breeding season of birds in southeastern Brazil (Marini and Durães, 2001; Marini et al., 2009). The increase in *Plasmodium* prevalence in birds may therefore be associated with seasonal changes driven by the avian host reproductive period (Applegate et al., 1971; Christe et al., 2002; Valkiūnas, 2005), which is related to the spring relapse (i.e., increase in merogony rates after latent period, with consequent appearance of secondary parasitemia) in temperate latitudes (Bensch and Åkesson, 2003; Valkiūnas, 2005; Bensch et al., 2007). Hydric resources, such as bodies of water scattered through MSSP, are critically limited at the end of the dry season (personal observations). Moreover, food availability is limited during this season as well, mainly due to the reduction of fruits, seeds (Pezzini et al., 2014), and insects (Neves et al., 2014) that constitute important nutrient resources for these birds. As avian nutritional status is important to control malaria

infections (Cornet et al., 2014), the marked seasonality of this ecosystem may also influence the increase in haemosporidian prevalence observed in this study. Few studies have addressed seasonality of avian haemosporidians in the Neotropics, and they found no difference in overall prevalence (Fallon et al., 2004; Valkiūnas et al., 2004) and in parasite lineages distributions (Fallon et al., 2004) when comparing birds sampled in dry and rainy seasons. We also found evidence of a seasonal effect in a single well-sampled parasite lineage (BAFLA03), which accounted for 61% of the detected lineages at the end of the dry season, being diluted in a high richness of parasites in the peak of the following rainy season, in a relative prevalence of 8,5%.

We did not detect *Parahaemoproteus* during the dry season, showing that this subgenus also has marked seasonality. Mosquito population decreased at the beginning of this season in the MSSP, and reached very low levels by the end of the dry season (Ferreira Jr et al., *in review*). With that, we can infer that the abundance of Ceratopogonidae insects, vectors of this subgenus (Valkiūnas, 2005), also decrease during the dry season, interrupting parasite transmission. The subgenera *Parahaemoproteus* can be restricted to internal organs during periods of absence of its vector, thus they are not detected in the blood stream (Mendes et al., 2013; Pérez-Rodríguez et al., 2015). This may explain our findings, but an alternative explanation would be that these parasites are eliminated by the hosts' immune system at the beginning of the dry season, with re-infection occurring when environmental conditions are favorable to vectors in the rainy season. For this second hypothesis, birds visiting the park during the rainy season could be the source of infection to vectors, restarting local transmission cycle. Both scenarios are not mutually exclusive, and they could be tested by conducting monthly samplings in MSSP or in other seasonal tropical forests.

Little is known about the distribution of the *Haemoproteus* subgenus in. We detected these parasites only in pasture areas, and this was likely due to the markedly higher presence of Columbiformes birds in this successional stage. A passerine bird (*C. pileatus*) captured in the pasture was also infected with *H. (Haemoproteus)* spp., and this subgenus has also been found in a passerine in another part of southeastern Brazil (Lacorte et al., 2013), suggesting that Hippoboscidae flies also feed upon non-Columbiformes in Brazil. These likely were abortive infections (Valkiūnas et al., 2009), given that this subgenus completes their life cycle only in Columbiformes and in some marine birds (Levin et al., 2012). Interestingly, *H. (Haemoproteus)* subgenus was detected during the dry season, showing that their vectors may persist all year around. In fact, Hippoboscid flies spend almost all their adult life cycle on the host (Levin and Parker, 2012), making parasite transmission possible during all year in mid and high latitudes (Valkiūnas, 2005). Therefore, Hippoboscidae flies may not be susceptible to severe population decrease during the dry season in MSSP, so they can transmit *Haemoproteus* throughout all year. The present study associated *H. (Haemoproteus)* sp. to the pasture areas, and demonstrated that seasonal and spatial aspects of these parasites are different from *Parahaemoproteus*. These parasites have different vertebrate hosts and vectors, making the distinction between both subgenera important in ecological studies of haemosporidians.

Our results show that the recovery of disturbed areas into more complex forests change avian communities, benefitting the ones related to advanced successional stages with a lower prevalence of pathogenic parasites. Understanding the effects of forest recovery on the dispersal of parasites may help to formulate conservation strategies to improve environmental and animal health. We also found effects of seasonality on parasite prevalence and in lineages dominance at community and individual levels. This result

warrants further long-term investigations in tropical forests to understand temporal drivers of parasite ecology.

## References

- Allan, B.F., Langerhans, R.B., Ryberg, W.A., Landesman, W.J., Griffin, N.W., Katz, R.S., Oberle, B.J., Schutzenhofer, M.R., Smyth, K.N., de St Maurice, A., et al. (2009). Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia* 158, 699–708.
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., de Moraes, G., Leonardo, J., and Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22, 711–728.
- Alvarez-Anorve, M.Y., Quesada, M., Sanchez-Azofeifa, G.A., Avila-Cabadilla, L.D., and Gamon, J.A. (2012). Functional regeneration and spectral reflectance of trees during succession in a highly diverse tropical dry forest ecosystem. *American Journal of Botany* 99, 816–826.
- Applegate, J.E., Beaudoin, R.L., and Seeley, D.C. (1971). The effect of spring relapse in English sparrows on infectivity of malaria to mosquitoes. *J. Wildl. Dis.*
- Arroyo-Rodríguez, V., Melo, F.P.L., Martínez-Ramos, M., Bongers, F., Chazdon, R.L., Meave, J.A., Norden, N., Santos, B.A., Leal, I.R., and Tabarelli, M. (2015). Multiple successional pathways in human-modified tropical landscapes: new insights from forest succession, forest fragmentation and landscape ecology research: Multiple successional pathways. *Biological Reviews* n/a-n/a.
- Bensch, S., and Åkesson, S. (2003). Temporal and Spatial Variation of Hematozoans in Scandinavian Willow Warblers. *Journal of Parasitology* 89, 388–391.
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Ostman, O., Hansson, B., Westerdahl, H., and Pinheiro, R.T. (2000). Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc Biol Sci* 267, 1583–1589.
- Bensch, S., Waldenström, J., Jonzén, N., Westerdahl, H., Hansson, B., Sejberg, D., and Hasselquist, D. (2007). Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *Journal of Animal Ecology* 76, 112–122.
- Bensch, S., Hellgren, O., and Pérez-Tris, J. (2009). MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. *Molecular Ecology Resources* 9, 1353–1358.
- Bonneaud, C., Sepil, I., Milá, B., Buermann, W., Pollinger, J., Sehgal, R.N.M., Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Saatchi, S., and Smith, T.B. (2009). The prevalence of avian *Plasmodium* is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *Journal of Tropical Ecology* 25, 439.

- Brearley, G., Rhodes, J., Bradley, A., Baxter, G., Seabrook, L., Lunney, D., Liu, Y., and McAlpine, C. (2013). Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes: Wildlife disease in human-modified landscapes. *Biological Reviews* 88, 427–442.
- Brook, B.W., Bradshaw, C.J.A., Koh, L.P., and Sodhi, N.S. (2006). Momentum drives the crash: Mass extinction in the tropics. *Biotropica* 38, 302–305.
- Carrete, M., Serrano, D., Illera, J.C., López, G., Vögeli, M., Delgado, A., and Tella, J. (2009). Goats, birds, and emergent diseases: apparent and hidden effects of exotic species in an island environment. *Ecological Applications* 19, 840–853.
- Chasar, A., Loiseau, C., ValkiūNas, G., Iezhova, T., Smith, T.B., and Sehgal, R.N.M. (2009). Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology* 18, 4121–4133.
- Christe, P., Møller, A.P., González, G., and De Lope, F. (2002). Intra-seasonal variation in immune defence, body mass and hematocrit in adult house martins *Delichon urbica*. *Journal of Avian Biology* 33, 321–325.
- Civitello, D.J., Cohen, J., Fatima, H., Halstead, N.T., Liriano, J., McMahon, T.A., Ortega, C.N., Sauer, E.L., Sehgal, T., Young, S., et al. (2015). Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 8667–8671.
- Clark, N.J., Clegg, S.M., and Lima, M.R. (2014). A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *International Journal for Parasitology* 44, 329–338.
- Confalonieri, U.E.C., Margonari, C., and Quintão, A.F. (2014). Environmental change and the dynamics of parasitic diseases in the Amazon. *Acta Tropica* 129, 33–41.
- Cornet, S., Bichet, C., Larcombe, S., Faivre, B., and Sorci, G. (2014). Impact of host nutritional status on infection dynamics and parasite virulence in a bird-malaria system. *J Anim Ecol* 83, 256–265.
- Cosgrove, C.L., Wood, M.J., Day, K.P., and Sheldon, B.C. (2008). Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology* 77, 540–548.
- Dornelas, A.A.F., de Paula, D.C., Santo, M.M.E., Azofeifa, G.S., and Leite, L.O. (2012). Avifauna of the Mata Seca State Park, north of Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ornitologia-Brazilian Journal of Ornithology* 20, 14.
- Dunn, R.R. (2004). Recovery of faunal communities during tropical forest regeneration. *Conservation Biology* 18, 300–309.
- Ellis, V.A., Collins, M.D., Medeiros, M.C.I., Sari, E.H.R., Coffey, E.D., Dickerson, R.C., Lugarini, C., Stratford, J.A., Henry, D.R., Merrill, L., et al. (2015). Local host specialization, host-switching, and dispersal shape the regional distributions of avian haemosporidian parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11294–11299.

Espírito-Santo, M.M., Sevilha, A.C., Anaya, F.C., Barbosa, R., Fernandes, G.W., Sanchez-Azofeifa, G.A., Scariot, A., Noronha, S.E. de, and Sampaio, C.A. (2009). Sustainability of tropical dry forests: Two case studies in southeastern and central Brazil. *Forest Ecology and Management* 258, 922–930.

Ezenwa, V.O., Godsey, M.S., King, R.J., and Guptill, S.C. (2006). Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273, 109–117.

Falcão, L.A.D., do Espírito-Santo, M.M., Leite, L.O., Garro, R.N.S.L., Avila-Cabadilla, L.D., and Stoner, K.E. (2014). Spatiotemporal variation in phyllostomid bat assemblages over a successional gradient in a tropical dry forest in southeastern Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 30, 123–132.

Fallon, S.M., Ricklefs, R.E., Swanson, B.L., and Bermingham, E. (2003). Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *Journal of Parasitology* 89, 1044–1047.

Fallon, S.M., Ricklefs, R.E., Latta, S.C., and Bermingham, E. (2004). Temporal stability of insular avian malarial parasite communities. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 271, 493–500.

Finegan, B. (1996). Pattern and process in neotropical secondary rain forests: the first 100 years of succession. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 119–124.

Guariguata, M.R., and Ostertag, R. (2001). Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. *Forest Ecology and Management* 148, 185–206.

Hellgren, O., Waldenström, J., and Bensch, S. (2004). A New Pcr Assay for Simultaneous Studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from Avian Blood. *Journal of Parasitology* 90, 797–802.

Johnson, P.T.J., Preston, D.L., Hoverman, J.T., and Richgels, K.L.D. (2013). Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* 494, 230–233.

Keesing, F., Holt, R.D., and Ostfeld, R.S. (2006). Effects of species diversity on disease risk: Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* 9, 485–498.

Keesing, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K.E., Mitchell, C.E., et al. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468, 647–652.

Kim, K.S., and Tsuda, Y. (2012). Avian *Plasmodium* lineages found in spot surveys of mosquitoes from 2007 to 2010 at Sakata wetland, Japan: do dominant lineages persist for multiple years? *Molecular Ecology* 21, 5374–5385.

Lacorte, G.A., Félix, G.M.F., Pinheiro, R.R.B., Chaves, A.V., Almeida-Neto, G., Neves, F.S., Leite, L.O., Santos, F.R., and Braga, É.M. (2013). Exploring the diversity and distribution of Neotropical avian malaria parasites – A molecular survey from Southeast Brazil. *PLoS ONE* 8, e57770.

- Lalubin, F., Delédevant, A., Glai Zot, O., and Christe, P. (2013). Temporal changes in mosquito abundance (*Culex pipiens*), avian malaria prevalence and lineage composition. *Parasit Vectors* 6, 307.
- Laurance, S.G.W., Jones, D., Westcott, D., Mckeown, A., Harrington, G., and Hilbert, D.W. (2013). Habitat fragmentation and ecological traits influence the prevalence of avian blood parasites in a Tropical Rainforest landscape. *PLoS ONE* 8, e76227.
- Levin, I.I., and Parker, P.G. (2012). Prevalence of *Hemoproteus iwa* in Galapagos great frigatebirds (*Fregata minor*) and their obligate fly ectoparasite (*Olfersia spinifera*). *J. Parasitol.* 98, 924–929.
- Levin, I.I., Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., O'Brien, S.L., and Parker, P.G. (2012). Novel *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the swallow-tailed gull (Lariidae), with remarks on the host range of hippoboscids-transmitted avian hemoproteids. *J. Parasitol.* 98, 847–854.
- Loiseau, C., Iezhova, T., Valkiūnas, G., Chasar, A., Hutchinson, A., Buermann, W., Smith, T.B., and Sehgal, R.N.M. (2010). Spatial variation of haemosporidian parasite infection in African rainforest bird species. *J. Parasitol.* 96, 21–29.
- Madeira, B.G., Espírito-Santo, M.M., Neto, S.D., Nunes, Y.R.F., Arturo Sánchez Azoifeifa, G., Fernandes, G.W., and Quesada, M. (2009). Changes in tree and liana communities along a successional gradient in a tropical dry forest in south-eastern Brazil. *Plant Ecology* 201, 291–304.
- Marini, M.Â., and Durães, R. (2001). Annual patterns of molt and reproductive activity of passerines in south-central Brazil. *The Condor* 103, 767–775.
- Marini, M., Sousa, N., Borges, F., and Silveira, M. (2009). Biologia reprodutiva de *Elaenia cristata* (Aves: Tyrannidae) em cerrado do Brasil central. *Neotropical Biology and Conservation* 4, 2–12.
- Mendenhall, C.D., Archer, H.M., Brenes, F.O., Sekercioglu, C.H., and Sehgal, R.N.M. (2013). Balancing biodiversity with agriculture: Land sharing mitigates avian malaria prevalence: Balancing biodiversity with agriculture. *Conservation Letters* 6, 125–131.
- Mendes, L., Pardal, S., Morais, J., Antunes, S., Ramos, J.A., Perez-Tris, J., and Piersma, T. (2013). Hidden haemosporidian infections in Ruffs (*Philomachus pugnax*) staging in Northwest Europe en route from Africa to Arctic Europe. *Parasitology Research* 112, 2037–2043.
- Miles, L., Newton, A.C., DeFries, R.S., Ravilious, C., May, I., Blyth, S., Kapos, V., and Gordon, J.E. (2006). A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography* 33, 491–505.
- Moens, M.A.J., and Pérez-Tris, J. (2016). Discovering potential sources of emerging pathogens: South America is a reservoir of generalist avian blood parasites. *International Journal for Parasitology* 46, 41–49.



- Moura, N.G., Lees, A.C., Andretti, C.B., Davis, B.J.W., Solar, R.R.C., Aleixo, A., Barlow, J., Ferreira, J., and Gardner, T.A. (2013). Avian biodiversity in multiple-use landscapes of the Brazilian Amazon. *Biological Conservation* 167, 339–348.
- Nassar, J., Stoner, K.E., Ávila-Cabadilla, L., do Espírito-Santo, M.M., Aranguren, C.I., González-Carcacia, J.A., Lobato-García, J.M., Olívio-Leite, L., Álvarez-Añorve, M., de Matos Brandão, H.N., et al. (2013). Fruit-eating bats and birds of three seasonal tropical dry forests in the Americas. *Tropical Dry Forests in the Americas* 173–220.
- Neves, F.S., Silva, J.O., Espírito-Santo, M.M., and Fernandes, G.W. (2014). Insect herbivores and leaf damage along successional and vertical gradients in a Tropical Dry Forest. *Biotropica* 46, 14–24.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., et al. (2016). *vegan: Community Ecology Package*.
- Ostfeld, R.S., and Keesing, F. (2000). Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool.* 78, 2061–2078.
- Outlaw, D.C., and Ricklefs, R.E. (2011). Rerooting the evolutionary tree of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 13183–13187.
- Pardini, R., Bueno, A. de A., Gardner, T.A., Prado, P.I., and Metzger, J.P. (2010). Beyond the fragmentation threshold hypothesis: regime shifts in biodiversity across fragmented landscapes. *PLoS ONE* 5, e13666.
- Pérez-Rodríguez, A., de la Hera, I., Bensch, S., and Pérez-Tris, J. (2015). Evolution of seasonal transmission patterns in avian blood-borne parasites. *International Journal for Parasitology* 45, 605–611.
- Pezzini, F.F., Ranieri, B.D., Brandão, D.O., Fernandes, G.W., Quesada, M., Espírito-Santo, M.M., and Jacobi, C.M. (2014). Changes in tree phenology along natural regeneration in a seasonally dry tropical forest. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology* 148, 965–974.
- Pinheiro, R.B.P., Félix, G.M.F., Chaves, A.V., Lacorte, G.A., Santos, F.R., Braga, É.M., and Mello, M.A.R. (2016). Trade-offs and resource breadth processes as drivers of performance and specificity in a host-parasite system: a new integrative hypothesis. *Int. J. Parasitol.* 46, 115–121.
- Portillo-Quintero, C.A., and Sánchez-Azofeifa, G.A. (2010). Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biological Conservation* 143, 144–155.
- Posada, D., and Crandall, K.A. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Quesada, M., Sanchez-Azofeifa, G.A., Alvarez-Añorve, M., Stoner, K.E., Avila-Cabadilla, L., Calvo-Alvarado, J., Castillo, A., Espírito-Santo, M.M., Fagundes, M., Fernandes, G.W., et al. (2009). Succession and management of tropical dry forests in the Americas: Review and new perspectives. *Forest Ecology and Management* 258, 1014–1024.

- R Development Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).
- Ronquist, F., and Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Roos, F.L., Belo, N.O., Silveira, P., and Braga, E.M. (2015). Prevalence and diversity of avian malaria parasites in migratory Black Skimmers (*Rynchops niger*, Laridae, Charadriiformes) from the Brazilian Amazon Basin. *Parasitology Research* 114, 3903–3911.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., and Schaefer, H.M. (2012). Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews* 87, 928–964.
- Sehgal, R.N.M. (2010). Deforestation and avian infectious diseases. *Journal of Experimental Biology* 213, 955–960.
- Sehgal, R.N.M. (2015). Manifold habitat effects on the prevalence and diversity of avian blood parasites. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4, 421–430.
- Sevilha, A.C., Scariot, A., and Noronha, S.E. de (2004). Representatividade UCs em florestas estacionais decíduais no Brasil. In *Annals of the 55th Congresso Nacional de Botânica*, (Sociedade Brasileira de Botânica), pp. 1–63.
- Smith, K.F., Sax, D.F., and Lafferty, K.D. (2006). Evidence for the Role of Infectious Disease in Species Extinction and Endangerment. *Conservation Biology* 20, 1349–1357.
- Suzán, G., Marcé, E., Giermakowski, J.T., Mills, J.N., Ceballos, G., Ostfeld, R.S., Armien, B., Pascale, J.M., and Yates, T.L. (2009). Experimental Evidence for Reduced Rodent Diversity Causing Increased Hantavirus Prevalence. *PLoS ONE* 4, e5461.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–2729.
- Valkiūnas, G. (2005). *Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia* (Boca Raton, Florida: CRC Press).
- Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Brooks, D.R., Hanelt, B., Brant, S.V., Sutherlin, M.E., and Causey, D. (2004). Additional observations on blood parasites of birds in Costa Rica. *J. Wildl. Dis.* 40, 555–561.
- Valkiūnas, G., Iezhova, T.A., Loiseau, C., and Sehgal, R.N.M. (2009). Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of Hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected brds. *Journal of Parasitology* 95, 1512–1515.
- Vittor, A.Y., Gilman, R.H., Tielsch, J., Glass, G., Shields, T.I.M., Lozano, W.S., Pinedo-Cancino, V., and Patz, J.A. (2006). The effect of deforestation on the human-biting rate of

*Anopheles darlingi*, the primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74, 3–11.

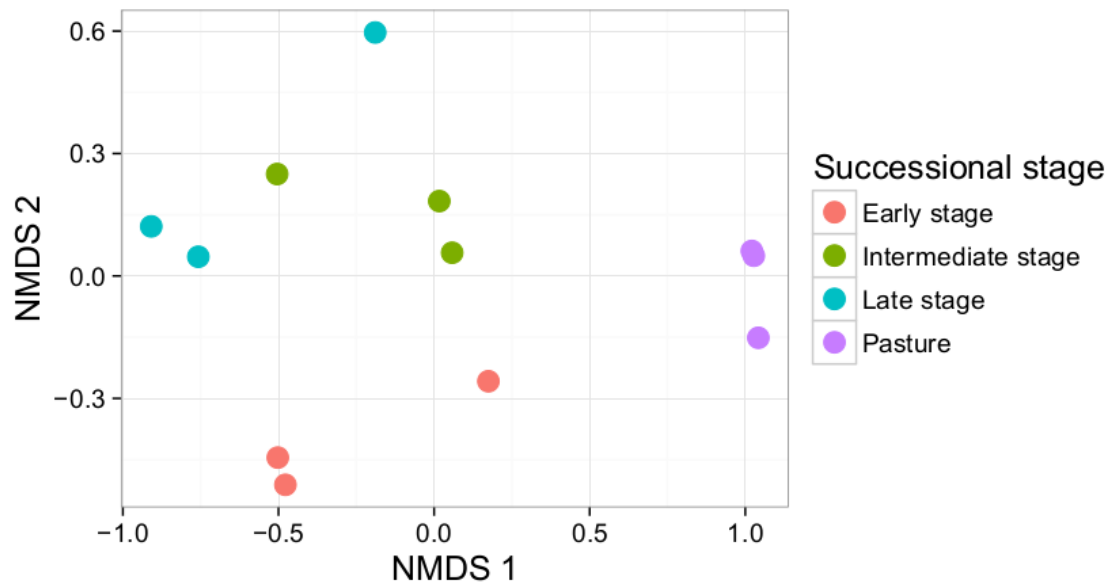
Vittor, A.Y., Pan, W., Gilman, R.H., Tielsch, J., Glass, G., Shields, T., Sánchez-Lozano, W., Pinedo, V.V., Salas-Cobos, E., Flores, S., et al. (2009). Linking deforestation to malaria in the Amazon: characterization of the breeding habitat of the principal malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 5–12.

Wilcove, D.S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A., and Losos, E. (1998). Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience* 607–615.

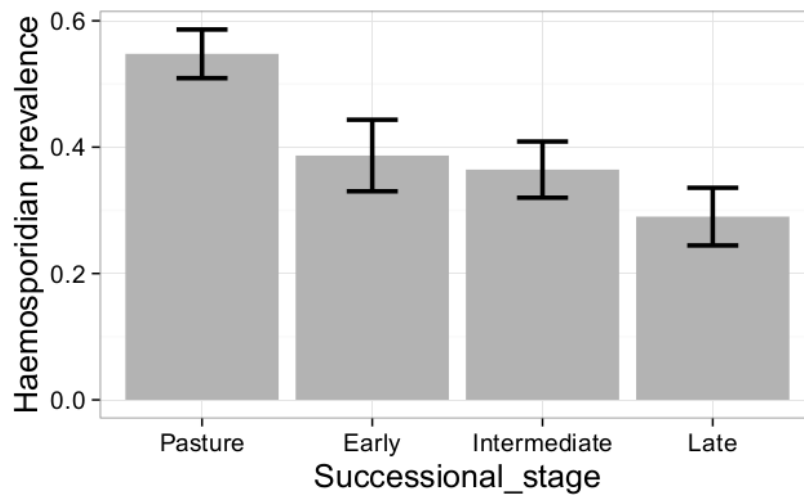
Wood, M.J., Cosgrove, C.L., Wilkin, T.A., Knowles, S.C.L., Day, K.P., and Sheldon, B.C. (2007). Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology* 16, 3263–3273.

Young, H.S., Dirzo, R., Helgen, K.M., McCauley, D.J., Billeter, S.A., Kosoy, M.Y., Osikowicz, L.M., Salkeld, D.J., Young, T.P., and Dittmar, K. (2014). Declines in large wildlife increase landscape-level prevalence of rodent-borne disease in Africa. *PNAS* 111, 7036–7041.

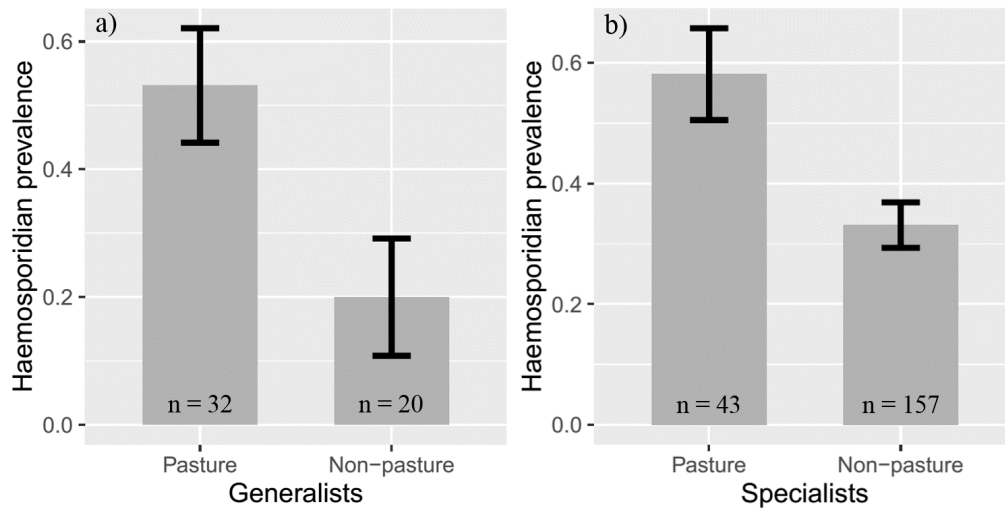
**Figure 1: Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) showing bird communities dissimilarity between successional stages**



**Figure 2: Haemosporidian prevalence across successional determined by screening PCR. Standard error bars are shown.**

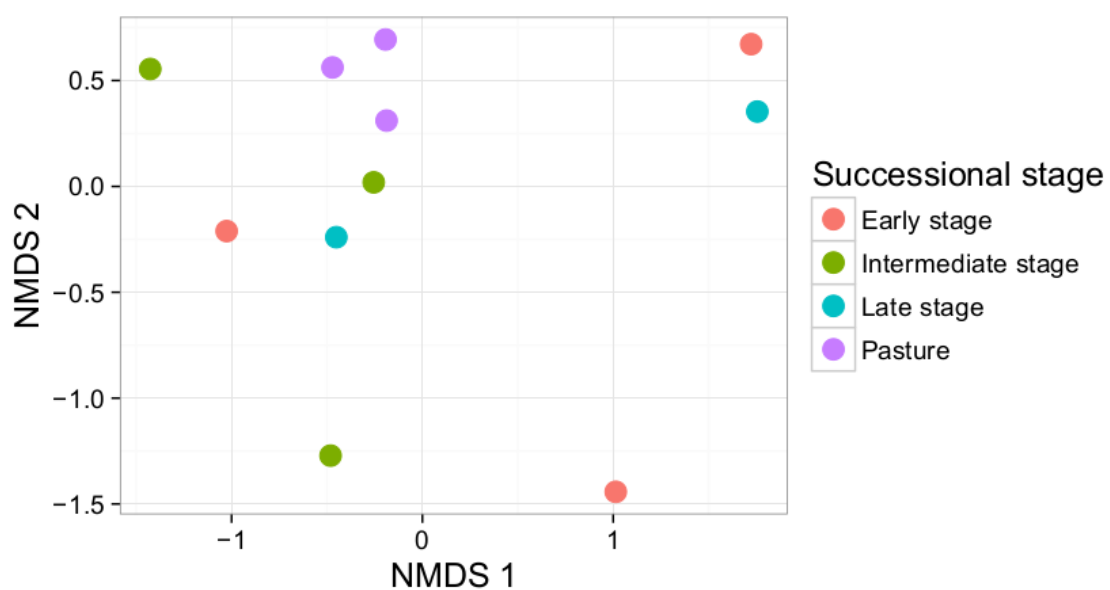


**Figure 3: Haemosporidian prevalence in generalists birds when captured in pasture and in non-pasture areas (a), and in birds specialists (exclusive) from pasture and from non-pasture areas (b). Standard error bars are shown.**



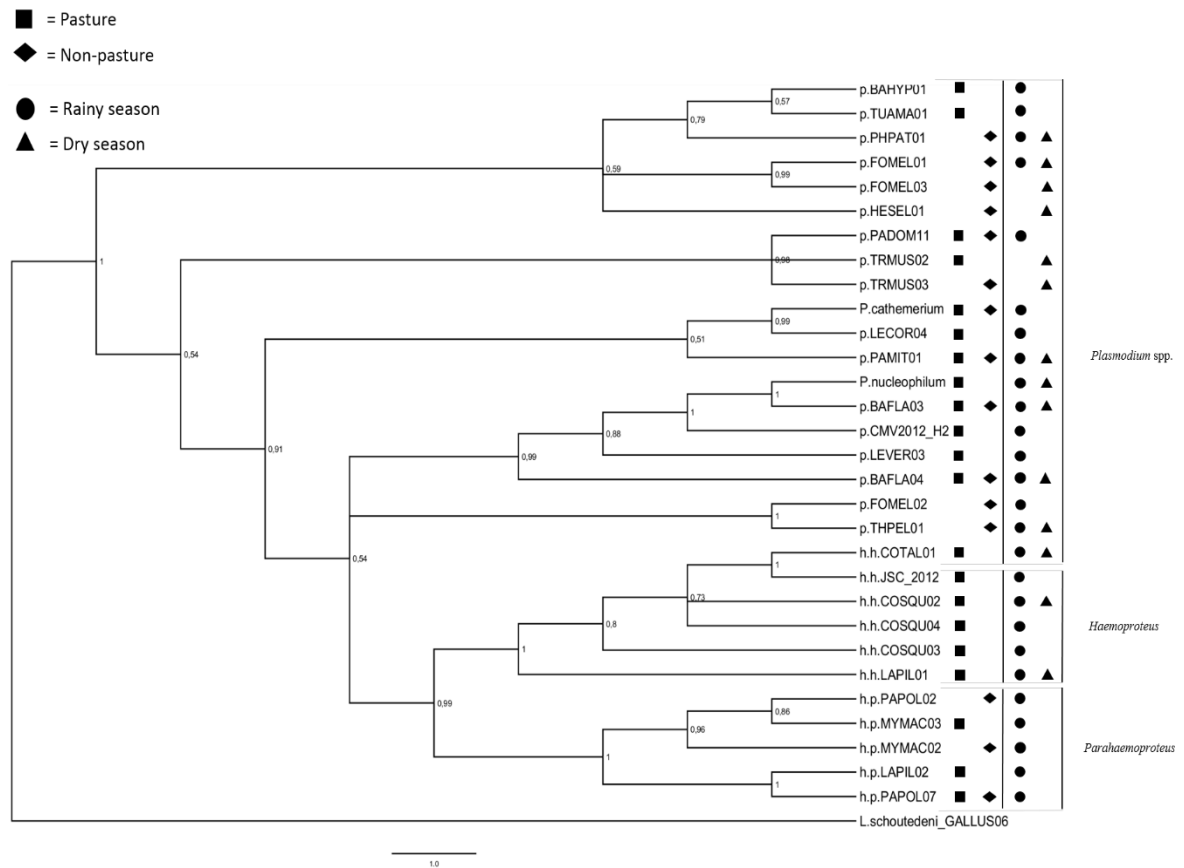
Generalist species: *Columbina squammata*, *Myiarchus tyrannulus*, *Myiodynastes maculatus*, *Nystalus maculatus*, *Turdus amaurochalinus*: chi-square = 4.318; d.f. = 1;  $P = 0.037$ . Specialists from pasture areas: *Ammodramus humeralis*, *Columbina picui*, *Volatinia jacarina*. Specialists from non-pasture areas: *Basileuterus flaveolus*, *Cnemotriccus fuscatus*, *Formicivora melanogaster*, *Hemitriccus margaritaceiventer*, *Lathrotriccus eulerei*, *Sittasomus griseicapillus*, *Thamnophilus pelzelni*, *Tolmomyias flaviventris*. chi-square = 7.898 d.f. = 1;  $P = 0.005$ .

**Figure 4: Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) showing parasite communities dissimilarity between successional stages**



There was no difference in dissimilarity between stages (One-way ANOSIM;  $p = 0,226$ ). Labels in the graph represent plots names: ES = early stage; IS = Intermediate stage; LS = late stage; PA = pasture.

**Figure 5: Phylogenetic tree showing detected lineages detected in the pasture and non-pasture areas, and in the rainy and dry seasons.**



Posterior probabilities and nucleotide change scale are shown. *Leucocytozoon schoutedeni* represents the outgroup.

**Table 1: Description of captured birds, habitat type, and haemosporidian prevalence per successional stage. Only species sampled seven or more times were included.**

Species	Family	Pasture (prev)		Early (prev)		Interm. (prev)		Late (prev)		Total (prev)	
<i>Nystalus maculatus</i> <sup>c</sup>	Buconidae (Galbuliformes)	9	22%	2	0%	3	0%	0	NA	14	14%
<i>Columbina squammata</i> <sup>c</sup>	Columbidae (Columbiformes)	9	77%	0	NA	2	50%	1	100%	12	75%
<i>Columbina picui</i> <sup>b</sup>	Columbidae (Columbiformes)	8	62%	0	NA	0	NA	0	NA	8	63%
<i>Leptotila verreauxi</i>	Columbidae (Columbiformes)	2	50%	1	0%	0	NA	1	100%	4	50%
<i>Sittasomus griseicapillus</i> <sup>a</sup>	Dendrocolaptidae	0	NA	4	50%	13	46%	7	28%	24	42%
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	Dendrocolaptidae	0	NA	1	0%	2	0%	1	0%	4	0%
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Dendrocolaptidae	1	0%	3	0%	0	NA	0	NA	4	0%
<i>Synallaxis scutata</i>	Furnariidae	0	NA	0	NA	2	50%	3	33%	5	40%
<i>Furnarius leucopus</i>	Furnariidae	0	NA	3	66%	1	0%	0	NA	4	50%
<i>Basileuterus flaveolus</i> <sup>a</sup>	Parulidae	0	NA	1	0%	3	33%	4	50%	8	38%
<i>Ammodramus humeralis</i> <sup>b</sup>	Passerelidae	8	62%	0	NA	0	NA	0	NA	8	63%
<i>Hemitriccus</i> <sup>a</sup> <i>margaritaceiventris</i>	Rhynchocyclidae	0	NA	3	0%	3	33%	1	0%	7	14%
<i>Tolmomyias flaviventris</i> <sup>a</sup>	Rhynchocyclidae	0	NA	1	0%	10	10%	10	20%	21	14%
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Rhynchocyclidae	0	NA	0	NA	1	0%	4	0%	5	0%

prev = haemosporidian prevalence. a = well-sampled species captured only in early, intermediate and late stages; b well-sampled species captured only in pasture areas; c = well-sampled species with three or more individuals captured in the pasture and three or more individuals captured in the remaining stages; d = well-sampled species that do not meet any of those criteria.

Cont. table 1

Species	Family	Pasture (prev)		Early (prev)		Interm. (prev)		Late (prev)		Total (prev)	
<i>Thamnophilus pelzelni</i> <sup>a</sup>	Thamnophilidae	0	NA	9	66%	18	27%	16	50%	43	44%
<i>Formicivora melanogaster</i> <sup>a</sup>	Thamnophilidae	0	NA	4	50%	7	42%	8	37%	19	42%
<i>Sakesphorus cristatus</i>	Thamnophilidae	0	NA	2	100%	2	50%	2	100%	6	83%
<i>Thamnophilus capistratus</i>	Thamnophilidae	0	NA	1	100%	3	33%	1	0%	5	40%
<i>Coryphospingus pileatus</i> <sup>c</sup>	Thraupidae	56	60%	8	62%	21	52%	5	60%	90	59%
<i>Volatinia jacarina</i> <sup>e</sup>	Thraupidae	27	55%	1	0%	0	NA	0	NA	28	54%
<i>Conirostrum speciosum</i> <sup>d</sup>	Thraupidae	1	0%	2	0%	1	0%	3	0%	7	0%
<i>Paroaria dominicana</i>	Thraupidae	2	0%	2	100%	0	NA	0	NA	4	50%
<i>Troglodytes musculus</i> <sup>d</sup>	Troglodytidae	2	50%	0	NA	2	50%	3	0%	7	29%
<i>Turdus amaurochalinus</i> <sup>c</sup>	Turdidae	3	33%	3	0%	1	0%	2	0%	9	11%
<i>Myiopagis viridicata</i> <sup>f</sup>	Tyrannidae	1	0%	5	40%	4	0%	9	11%	19	16%
<i>Myiarchus tyrannulus</i> <sup>c</sup>	Tyrannidae	5	60%	3	33%	1	0%	2	0%	11	36%
<i>Cnemotriccus fuscatus</i> <sup>a</sup>	Tyrannidae	0	NA	2	0%	4	50%	4	50%	10	40%
<i>Myiodynastes maculatus</i> <sup>c</sup>	Tyrannidae	6	66%	0	NA	1	100%	3	0%	10	50%
<i>Lathrotriccus euleri</i> <sup>a</sup>	Tyrannidae	0	NA	3	0%	1	0%	3	33%	7	14%
<i>Camptostoma obsoletum</i>	Tyrannidae	3	33%	1	0%	0	NA	1	0%	5	20%

prev = haemosporidian prevalence. a = well-sampled species captured only in early, intermediate and late stages; b well-sampled species captured only in pasture areas; c = well-sampled species with three or more individuals captured in the pasture and three or more individuals captured in the remaining stages; d = well-sampled species that do not meet any of those criteria.



**Table 2: Haemosporidian lineages detected according to successional stage and season of sampling.**

Lineage	Species	Successional stage	Season	n
<b>h.h.COSQU02</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pasture	End dry	1
<b>h.h.COSQU02</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pasture	Peak rainy	2
<b>h.h.COSQU03</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pasture	Peak rainy	1
<b>h.h.COSQU04</b>	<i>Columbina squammata</i>	Pasture	Peak rainy	1
h.h.COTAL01	<i>Columbina talpacoti</i>	Pasture	Peak rainy	1
h.h.COTAL01	<i>Columbina talpacoti</i>	Pasture	Middle dry	1
h.h.JSC-2012 isolate Soch3	<i>Columbina minuta</i>	Pasture	Peak rainy	1
<b>h.h.LAPIL01</b>	<i>Columbina picui</i>	Pasture	Peak rainy	1
<b>h.h.LAPIL01</b>	<i>Columbina picui</i>	Pasture	Middle dry	1
<b>h.h.LAPIL01</b>	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Middle dry	1
<b>h.p.LAPIL02</b>	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
<b>h.p.MYMAC02</b>	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Intermediate	Peak rainy	1
<b>h.p.MYMAC03</b>	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
h.p.PAPOL02	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Intermediate	Peak rainy	1
<b>h.p.PAPOL07</b>	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
<b>h.p.PAPOL07</b>	<i>Pachyramphus polychopterus</i>	Intermediate	End rainy	1
<b>h.p.PAPOL07</b>	<i>Thamnophilus pelzelni</i>	Intermediate	End rainy	1
P. nucleophilum	<i>Ammodramus humeralis</i>	Pasture	Peak rainy	1
P. nucleophilum	<i>Colaptes melanochloros</i>	Pasture	Peak rainy	1
P. nucleophilum	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Middle dry	1
P. nucleophilum	<i>Volatinia jacarina</i>	Pasture	End rainy	1
p.BAFLA03	<i>Basileuterus flaveolus</i>	Late	End dry	1
p.BAFLA03	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Late	End rainy	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediate	Peak rainy	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediate	Middle dry	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediate	End dry	1
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Middle dry	3
p.BAFLA03	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	End dry	5
p.BAFLA03	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Pasture	End dry	2
p.BAFLA03	<i>Myiopagis viridicata</i>	Early	Peak rainy	1
p.BAFLA03	<i>Sakesphorus cristatus</i>	Intermediate	Middle dry	1
p.BAFLA03	<i>Thlypopsis sordida</i>	Pasture	End rainy	1
p.BAFLA03	<i>Volatinia jacarina</i>	Pasture	End dry	2
p.BAFLA03	<i>Volatinia jacarina</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.BAFLA04	<i>Coereba flaveola</i>	Intermediate	Middle dry	1
p.BAFLA04	<i>Columbina squammata</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediate	Middle dry	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Late	Middle dry	1
p.BAFLA04	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Middle dry	1
p.BAHYP01	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	End rainy	1

Cont. table 2:

Lineage	Species	Successional stage	Season	n
p.CMV-2012 haplotype H2	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.FOMEL01	<i>Formicivora melanogaster</i>	Late	Peak rainy	1
p.FOMEL01	<i>Formicivora melanogaster</i>	Intermediate	Middle dry	1
<b>p.FOMEL02</b>	<i>Formicivora melanogaster</i>	Late	End rainy	1
<b>p.FOMEL03</b>	<i>Formicivora melanogaster</i>	Early	End dry	1
<b>p.HESEL01</b>	<i>Herpsilochmus sellowi</i>	Intermediate	End dry	1
<b>p.LEVER03</b>	<i>Leptotila verreauxi</i>	Pasture	End rainy	1
p.PADOM09	<i>Ammodramus humeralis</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.PADOM09	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Intermediate	End rainy	1
p.PADOM09	<i>Myiopagis viridicata</i>	Early	Peak rainy	1
p.PADOM09	<i>Synallaxis scutata</i>	Intermediate	Peak rainy	1
p.PADOM11	<i>Camptostoma obsoletum</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.PADOM11	<i>Campylorhamphus trochilirostris</i>	Intermediate	Peak rainy	1
p.PADOM11	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.PADOM11	<i>Volatinia jacarina</i>	Pasture	Peak rainy	3
p.PAMIT01	<i>Leptotila verreauxi</i>	Late	End dry	1
p.PAMIT01	<i>Myiodynastes maculatus</i>	Pasture	Peak rainy	1
p.PHPAT01	<i>Basileuterus flaveolus</i>	Late	Peak rainy	1
p.PHPAT01	<i>Coryphospingus pileatus</i>	Intermediate	End dry	1
p.PHPAT01	<i>Paroaria dominicana</i>	Early	End dry	1
p.P-T138	<i>Volatinia jacarina</i>	Pasture	End rainy	1
p.P-T138	<i>Volatinia jacarina</i>	Pasture	Peak rainy	3
<b>p.THPEL01</b>	<i>Thamnophilus pelzelni</i>	Early	End rainy	1
<b>p.THPEL01</b>	<i>Thamnophilus pelzelni</i>	Intermediate	End dry	1
<b>p.TRMUS02</b>	<i>Troglodytes musculus</i>	Pasture	Middle dry	1
<b>p.TRMUS03</b>	<i>Troglodytes musculus</i>	Intermediate	Middle dry	1
p.TUAMA01	<i>Turdus amaurochalinus</i>	Pasture	End rainy	1

n = Number of times that the association between lineage/species/season was found. h.h. = *H. (Haemoproteus) spp.*; h.p. = *H. (Parahaemoproteus) spp.*, p. = *Plasmodium*.

**Table 3: Description of the number of individuals captured and haemosporidian prevalence according to each season. Species sampled four or more times were included.**

Species	Family	End rainy (prev)		Middle dry (prev)		End dry (prev)		Peak rainy (prev)		Total (prev)	
<i>Nystalus maculatus</i>	Buconidae (Galbuliformes)	1	0%	5	20%	4	25%	4	0%	14	14%
<i>Columbina squammata</i>	Columbidae (Columbiformes)	1	0%	2	50%	3	100%	6	83%	12	75%
<i>Columbina picui</i>	Columbidae (Columbiformes)	1	0%	4	75%	1	100%	2	50%	8	63%
<i>Leptotila verreauxi</i>	Columbidae (Columbiformes)	2	50%	1	0%	1	100%	0	NA	4	50%
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	Dendrocolaptidae	12	50%	4	0%	2	50%	6	50%	24	42%
<i>Dendrocolaptes platyrostris</i>	Dendrocolaptidae	2	0%	0	NA	2	0%	0	NA	4	0%
<i>Lepidocolaptes angustirostris</i>	Dendrocolaptidae	2	0%	0	NA	1	0%	1	0%	4	0%
<i>Synallaxis scutata</i>	Furnariidae	0	NA	2	50%	0	NA	3	33%	5	40%
<i>Furnarius leucopus</i>	Furnariidae	0	NA	1	0%	3	66%	0	NA	4	50%
<i>Basileuterus flaveolus</i>	Parulidae	2	0%	1	0%	2	50%	3	66%	8	38%
<i>Ammodramus humeralis</i>	Passerelidae	1	0%	0	NA	1	100%	6	66%	8	63%
<i>Hemitriccus margaritaceiventer</i>	Pipromorphidae	3	0%	4	25%	0	NA	0	NA	7	14%
<i>Tolmomyias flaviventris</i>	Rhynchocyclidae	5	40%	6	100%	7	0%	3	33%	21	14%
<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Rhynchocyclidae	0	NA	1	0%	3	0%	1	0%	5	0%
<i>Thamnophilus pelzelni</i> <sup>a</sup>	Thamnophilidae	13	46%	10	20%	11	72%	9	33%	43	44%

Cont. table 3

Species	Family	End rainy (prev)		Middle dry (prev)		End dry (prev)		Peak rainy (prev)		Total (prev)	
<i>Formicivora melanogaster</i>	Thamnophilidae	4	25%	8	25%	3	100%	4	50%	19	42%
<i>Sakesphorus cristatus</i>	Thamnophilidae	0	NA	1	10%	4	75%	1	100%	6	83%
<i>Thamnophilus capistratus</i>	Thamnophilidae	0	NA	3	0%	2	100%	0	NA	5	40%
<i>Coryphospingus pileatus<sup>a</sup></i>	Thraupidae	13	53%	27	48%	31	67%	19	63%	90	59%
<i>Volatinia jacarina</i>	Thraupidae	4	75%	1	0%	8	37%	15	60%	28	54%
<i>Conirostrum speciosum</i>	Thraupidae	3	0%	2	0%	1	0%	1	0%	7	0%
<i>Paroaria dominicana</i>	Thraupidae	1	100%	0	NA	2	50%	1	0%	4	50%
<i>Troglodytes musculus</i>	Troglodytidae	1	0%	4	50%	2	0%	0	NA	7	29%
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Turdidae	5	20%	0	NA	1	0%	3	0%	9	11%
<i>Myiopagis viridicata<sup>b</sup></i>	Tyrannidae	14	7%	0	NA	0	NA	5	40%	19	16%
<i>Myiarchus tyrannulus</i>	Tyrannidae	1	0%	1	0%	9	44%	0	NA	11	36%
<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Tyrannidae	5	60%	3	0%	1	0%	1	100%	10	40%
<i>Myiodynastes maculatus</i>	Tyrannidae	2	50%	0	NA	1	0%	7	57%	10	50%
<i>Lathrotriccus euleri</i>	Tyrannidae	4	25%	1	0%	1	0%	1	0%	7	14%
<i>Camptostoma obsoletum</i>	Tyrannidae	1	0%	1	0%	1	0%	2	50%	5	20%

prev = haemosporidian prevalence. a = well-sampled species captured in all season; b = well-sampled species captured only in the rainy season.

## 11. Manuscrito em revisão na revista *Parasites & Vectors*

### Searching for putative avian malaria vectors in a Seasonally Dry Tropical Forest in Brazil

Francisco C. Ferreira Junior <sup>1\*</sup>, Raquel A. Rodrigues<sup>1</sup>, Yukita Sato<sup>2</sup>, Magno A. Z. Borges<sup>3</sup>, Érika M. Braga <sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Biomedical Science, Department of Veterinary Medicine, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan.

<sup>3</sup>Laboratório de Controle Biológico, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Montes Claros, Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro, Montes Claros, MG 39401-089, Brazil.

\*F.C.Ferreira Junior and E.M. Braga are co-corresponding authors.

E-mail: franciscocarlosfj@gmail.com (FCFJ), biologia.rar@gmail.com (RAR), sato.yukita@nihon-u.ac.jp (YS), diptera@gmail.com (MAZB), embraga@icb.ufmg.br (EMB).

## Abstract

### Background

Haemosporidian parasites in the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* can have detrimental effects on individual birds and populations. Despite recent investigations into the distribution and richness of these parasites and their

vertebrate hosts, little is known about their dipteran vectors. The Neotropics has the highest diversity of mosquitos in the world, but few studies have tried to identify vectors in this area, hampering the understanding of the ecology of avian malaria in such a highly diverse environment.

## Results

We used Shannon traps and active collection to capture 27,110 mosquitos in a Seasonally Dry Tropical Forest in southeastern Brazil, a highly endangered ecosystem. We screened 17,619 mosquito abdomens from 12 different mosquito species and several unidentified specimens in the genus *Culex*, grouped into 1,913 pools, for the presence of haemosporidians. Two pools (out of 459) of the mosquito *Mansonia titillans* and one pool (out of 29) of *Mansonia pseudotitillans* were positive for *Plasmodium* parasites, with the detection of a new parasite lineage in the former species. Detected *Plasmodium* lineages were distributed in three different clades within the phylogenetic tree revealing that *Mansonia* mosquitos are potential vectors of genetically distant parasites. Two pools of *Culex* sp. (out of 43) were positive for *Plasmodium gallinaceum* and closely related lineages. We found a higher abundance of these putative vectors in pasture areas, but they were distributed in the pasture and late stages. One pool of the mosquito *Psorophora discrucians* (out of 173) was positive for *Haemoproteus*.

## Conclusions

Although we have not found positive thoraces among the samples tested, the occurrence of *Plasmodium* in *Mansonia* mosquitos indicates that these genera are potential vectors of avian malaria parasites. Additional evidence is required

to assign the role of such mosquitos in avian malaria transmission and further studies will add information about evolutionary and ecological aspects of avian haemosporidian and untangle the diversity of their vectors in Brazil.

**Keywords:** *Plasmodium*; *Haemoproteus*; Haemosporidian; Parasites; Vectors; Culicidae; *Mansonia*; Ecological succession; habitat modification.

## Background

Avian haemosporidians are vector-transmitted parasites that can negatively impact natural bird populations by reducing host fitness [1,2], or by acting as primary or secondary etiological agents in mortality episodes [3]. Two widespread genera of these haemosporidians are *Plasmodium*, which infection is transmitted by mosquitos (Culicidae) and determined as avian malaria; and *Haemoproteus*, that is transmitted by biting midges (Ceratopogonidae) or louse flies from the Hippoboscidae family [4].

Transmission occurs globally, and host-parasite compatibility can determine the heterogeneous distribution of these parasites [5,6]. Vector-parasite compatibility [7] and mosquito feeding pattern [8] also play a role in parasite distribution. Nevertheless, haemosporidian vectors have received less attention than their vertebrate hosts, and this is especially true for tropical latitudes. The diversity of avian haemosporidian vectors is higher than previously thought [9–11], but despite having the higher diversity of mosquitos on the globe [12], the Neotropics still understudied [13,14].

Compared to other biogeographic regions, the Neotropics hosts a high richness of avian haemosporidian genetic lineages, and prevalence and richness of the genus *Plasmodium* are higher than that of *Haemoproteus* [15]. The high diversity

of vertebrate hosts in the region may explain parasite richness for both genera [16,17], but factors driving the higher proportions of *Plasmodium* relative to *Haemoproteus* lineages remain unclear. In this region, vector-parasite interactions could have exerted different selection pressures on each parasite genus, since they are transmitted by vectors belonging to different Diptera families. Hence, understanding the richness of haemosporidian vectors in various areas of the Neotropics is necessary to untangle this issue.

Several studies have revealed a heterogeneous distribution of avian haemosporidians across Brazilian biomes such as the Atlantic [16] and Amazonian rainforests [18,19], the Brazilian savannah [16,20,21], and Seasonally Dry Tropical Forests [16]. However, haemosporidian vectors have not been described in these areas, and their importance in determining parasite distributions has, therefore, not been assessed. In this study, we surveyed mosquito populations in Seasonally Dry Tropical Forest (SDTF) fragments at different successional stages aiming to identify putative avian malaria vectors in Brazil.

## Material and methods

### Study site

This study was conducted at Mata Seca State Park (MSSP), a conservation site encompassing an area of 15,466 ha, located in the São Francisco river valley in southeastern Brazil (14°48'36" – 14°56'59"S and 43°55'12" – 44°04'12"W). The region's climate is classified as tropical with dry summers ("As" category in Köppen's classification [22]), with an average temperature of 23.4°C. The dry season starts in May with an average rainfall of 6 mm and the four following



months typically receive less than 10 mm of rain. The rainy season starts in October and peaks between December and January, with monthly precipitation around 200 mm [22]. The area has a history of extensive cattle grazing, and approximately 1,525 ha of the MSSP consist of abandoned pasture fields at different successional stages, with the remaining areas considered as mosaics of secondary and primary patches of SDTF. These forests are dominated by deciduous trees that lose up to 95% of leaf area during the dry season [23,24].

We captured mosquitos in areas representing three different successional stages inside the park (Fig 1). The area defined here as “pasture” was used for extensive cattle grazing and was abandoned in 2008, five years before the beginning of the present study. This vegetation consisted of exotic grass species, herbs and shrubs, and sparse trees. We defined as “early stage”, a pasture field used for cattle grazing for over 20 years that was abandoned in the year 2000, 13 years before the study. This successional stage was dominated by a single stratum of young trees. Finally, the “late stage” had two tree strata, with tall deciduous trees forming a closed canopy at 18-20 m from ground level. The lower strata consisted of a sparse understory with a low density of young trees and lianas. This area has no record of human intervention for over 50 years. Many temporary lakes are scattered throughout the park, and there is a permanent lake situated at 2 km from the pasture areas.

Sampling was carried out at the end of the rainy season of 2013 (April), at the middle and at the end of the dry season of 2013 (June and September, respectively) and at the peak of the rainy season of 2014 (January). For data comparison, we established three plots within each successional stage, with the

same sampling effort for all plots and periods. Distances between plots within the same stage varied from 0.5 to 1.5 km.

### **Mosquito collection and processing**

We collected mosquitos using Shannon traps and by active collection. We set up LED lamps inside the Shannon traps, and all attracted insects were captured using automatic aspirators (made by adapting a fan from CDC-like traps to a PVC tube with 15 cm in diameter, sealed by a fine mesh at the bottom) during two hours starting at dusk. These samplings were conducted at the same place and period as bird trapping works, so we used automatic aspirators to collect mosquitos that were attracted by researchers while setting up mist-nets and while taking blood samples from trapped birds. These methods rely on the active capture of mosquitos by researchers, hence it is biased towards mosquito species that are attracted to humans and that are more active during the day and early night hours. Collected mosquitos were kept at 4-8°C at the field site for a maximum of five days, and afterwards were transferred to a -20°C freezer. Mosquitos were identified using reference keys [25,26] and separated by species, day, method, and place of collection. Mosquito genera were abbreviated according to Reinert [27]. Voucher species were deposited in the lab where mosquitos were identified (Laboratório de Controle Biológico, Universidade Estadual de Montes Claros). Samples were stored in absolute alcohol in 1.5 ml tubes at -20°C until processing. We removed legs, wings, and the anterior part of the head of unfed females using microscissors. Subsequently, we separated the thorax from the abdomens of all mosquitos and each segment was kept in pools of up to 15 individuals (average of nine). Engorged females were kept in individual tubes, without being dissected. The collection of mosquitos complied with local

regulations (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO license 29899).

### **DNA extraction**

Genomic DNA from abdomen and thorax pools was extracted using the QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit following the manufacturer's instructions with slight modifications. Samples were disrupted in 80 µl of 1X PBS using sterile pestles with a battery-operated grinder. After that, we added 100 µl of ATL buffer and 20 µl of proteinase K and incubated the samples at 56°C for a minimum of 1 hour. We then added 200 µl of AL buffer and incubated the samples at 70°C for 10 min. To minimize the amount of chitin, which can inhibit PCR reactions [28], we centrifuged the samples at 20,000 g for 5 min and transferred the clean supernatant to a new tube. From this step, we followed the manufacturer's protocol. Genomic DNA from engorged females was extracted using the REExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit (SIGMA) following the manufacturer's instructions.

### **Haemosporidian analysis**

We screened abdomen pools for the presence of haemosporidians, and we extracted and tested DNA from thorax pools corresponding to the positive samples. Engorged females were also tested for haemosporidians. We used a nested-PCR that detects *Plasmodium* and *Haemoproteus* in the same reaction and amplifies a segment of their cytochrome *b* gene (hereafter, "cyt *b*"). Primers in the first reaction, HaemNFI (5'-AGACATGAAATATTATGGITAAG-3') and HaemNR3 (5'-GAAATAAGATAAGAAATACCATTC-3') [29], were combined with 1 µl of genomic DNA and our master mix (described below). We then used a 1-

µl aliquot of this PCR product as a template for the second reaction with the primers HaemF (5'-CTTATGGTGTCTGA-TATATGCATG-3') and HaemR2 (5'-CGCTTATCTGGAGATTGTAATGGTT-3') [30]. Both reactions contained 1X buffer, 4 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM of each dNTP, 1 unit of Taq (TAKARA Ex Taq® DNA Polymerase, Japan), 0.4 mM of each primer, and nuclease-free water in 25 µl reaction volumes. DNA extracted from a *Plasmodium*-infected *Culex pipiens pallens* mosquito collected in Japan, and nuclease-free water were used as positive and negative controls, respectively. Cycle conditions followed descriptions from Hellgren et al. [29], and PCR products were visualized on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide. Positive samples were sequenced bi-directionally with dye-terminator fluorescent labeling through automated sequencing (ABI Prism 3100, Applied Biosystems). The obtained DNA sequences were edited using MEGA 6.0 [31] and compared to data available in public databases such as GenBank and MalAvi [32]. We considered sequences as different *cyt b* lineages when they differed by one or more nucleotides. Lineages with no records on public databases were considered novel and all obtained sequences were deposited in GenBank under accession numbers from KX068685 to KX068694.

Phylogenetic relationships were inferred using *Plasmodium* lineages found in our study together with lineages deposited in MalAvi that were assigned to morphospecies. A Bayesian phylogenetic tree was constructed using MrBayes 3.2.2 [33] with the GTR + I + G model of nucleotide evolution, as recommended by ModelTest [34]. We ran two Markov chains simultaneously for 5 million generations that were sampled every 1000 generations. The first 1250 trees (25%) were discarded as a burn-in step and the remaining trees were used to

calculate the posterior probabilities. We did not use an outgroup and the phylogenetic tree was midpoint rooted for presentation as described by Outlaw and Ricklefs [35].

### Blood meal analysis

To identify the blood meal origin of engorged females, we conducted semi-nested PCRs targeting segments of *cyt b* from both avian and mammalian DNA. We used primers and cycling conditions described in Sawabe et al. [36]: Avian-3 (f) (5'-GACTGTGAYAAAATYCCMTTCCA-3'), Avian-4 (r) (5'-GYCTTCAITYTTTGGYTTACAAGAC-3'), and Avian-8 (r) (5'-TCTTTGGTTTACAAGACCAATGTTT-3'); Mammalian-1 (f) (5'-TGAYATGAAAAAYCATCGTTG-3'), Mammalian-7 (f) (5'-AAAAACCATCGTTGTATTTCAACTA-3') and Mammalian-2 (r) (5'-TGTAGTTRTCWGGGTCKCCTA-3'). We used primers Avian-3 and Avian-4 in the first reaction to detect bird DNA, and the product was used as template in a second reaction containing primers Avian-3 and Avian-8. For the detection of mammalian derived DNA, we used primers Mammalian-1 and Mammalian-7 in the first reaction, and that product was used as template in a second reaction with primers Mammalian-7 and Mammalian-2. The PCR mixes had the same reagents and concentrations as described above for the haemosporidian PCRs. All reactions received 1 µl of either genomic DNA or amplicon. We used DNA extracted from a mosquito containing blood meal from Humboldt penguin as a positive control for the bird detection PCRs, and DNA extracted from a mosquito containing blood meal from a goat as a positive control for the mammalian PCRs. Nuclease-free water was used as a negative control.

To test if samples positive for haemosporidian DNA contained traces of host blood, positive abdomen pools were subjected to blood meal PCRs targeting bird and mammalian DNA.

PCR products were visualized and sequenced as described above, but here we used only forward primers to identify host species for the sequencing reaction. Sequences were checked for double peaks and the results were compared to sequences in the Genbank database using the basic local alignment search tool (BLAST). The vertebrate species with the highest match to our sequences were considered the mosquito's host.

### **Data analysis**

The relative abundance of the 12 most common mosquito species and *Culex* sp. across successional stages and different seasons were used to construct Bray-Curtis dissimilarity matrices and were ordinated by non-metric multidimensional scaling (NMDS). Differences between successional stages were tested statistically by one-way analysis of similarity (ANOSIM). ANOSIM compares average Bray-Curtis dissimilarities within and between groups (e.g. successional stages). It produces an "R" statistic which is positive when average dissimilarities between groups are greater than average dissimilarities within groups. R approaches zero when average dissimilarities between and within groups are similar. R is tested for significance by permuting the grouping variable. These multivariate analyses were conducted with the package *vegan* [37] in R v.3.3.1 [38].

We constructed rank-abundance plots to assess the dominance or evenness of mosquito communities across successional stages separated by season of

collection. We used ANCOVA to test for differences in curves slopes between different successional stages. We log<sub>10</sub> transformed abundance values for both analyses due to the small abundance of some mosquito species [39,40], and for this analysis we used the package BiodiversityR [41].

## Results

We collected 27,110 individual mosquitos and identified 21,997 to the species level, representing 36 species overall. The distributions of the 12 most common species as well as unidentified *Culex* mosquitos across successional stages and period of collection are represented in Table 1. Tribe Mansoniini (genera *Mansonia*, and *Coquillettidia*) and *Anopheles argyritarsis* were related to pasture areas and accounted for the community dissimilarity between successional stages, as revealed by the NMDS analysis (ANOSIM;  $R = 0,620$ ;  $P = 0,009$ ; Figure 2a). The exception was that *Ma. pseudotitillans* was related to both late and early stages. The tribe Aedini (*Aedes*, *Psorophora*, and *Haemagogus*) was related to early and late stages and the genus *Culex* was associated with late and pasture stages.

*Ae. scapularis*, *Cq. hermanoi*, and *Ps. discrucians* accounted for the dissimilarity in mosquito communities in the peak of the rainy season in relation to the other three sampling periods (ANOSIM;  $R = 0,624$ ;  $P = 0,0001$ ; Figure 2b). On the other hand, *An. argyritarsis* was not detected at the peak of the rainy season.

Mosquito abundance was higher in pasture areas, which can be attributed to the distribution of the tribe Mansoniini. *An. argyritarsis* was mainly found in pasture areas ( $n = 278$ ), with only a few specimens in early and late stages (one and three individuals, respectively). We observed a decrease in mosquito abundance

in the middle of the dry season, very few mosquitos captured at the end of the dry season, and an increase of capture rates at the peak of the rainy season. Species dominance shifted between the end and the peak of the rainy season, with *Ma. titillans* and *Ae. scapularis* representing the most abundant species in each period, respectively. The vast majority of *Ps. discruciens* and *Culex* sp. were captured at the peak of the rainy season, and they were not detected in the dry season. Despite this change in mosquito dominance across successional stages and between the period of sampling, there was no difference in the communities evenness, as indicated by the slopes of our rank-abundance curves (ANCOVA;  $F_{1,74} = 0,018$ ;  $P = 0,982$ , Figure 3).

We screened 1,913 mosquito pools comprising 17,619 abdomens for the presence of haemosporidians. Two pools of *Ma. titillans* were positive for *Plasmodium* out of 459 tested (total of 4,336 abdomens screened) and retrieved lineages were: PAMIT01, detected in two birds in the Mata Seca State Park (unpublished observations) and in a free-living bird in São Paulo Zoo [42]; and MaTIT1, a new lineage that has a 97% identity match with the closest related sequences deposited in Genbank. One pool of *Ma. pseudotitillans* (out of 29 samples comprising 224 abdomens) was positive for the *Plasmodium* lineage TUMIG03, which was described in two species of mosquitos in the United States [43] and in five species of birds across the American continent, including Brazil [16]. Two pools of *Culex* sp. were positive out of 43 tested (314 abdomens). In one of the *Culex* pools, we detected a single parasite lineage that matched 100% to *Plasmodium gallinaceum*. In the other pool of *Culex*, we found four different lineages in each of four separate PCRs, with haplotypes differing from 1 to 5 nucleotides when compared to *P. gallinaceum*. In a further sequencing from this



sample, we detected six double peaks in the electrochromatogram, an indication of multiple infections, one of which was a 100% match to *P. gallinaceum* after phasing (i.e., separating out haplotypes from the multiple peaks; [44]). A single pool, out of 173 tested pools (1,435 abdomens) of *Ps. discrucians* was found to have a mixed infection of *Haemoproteus* with four double peaks. Phasing the multiple infections enabled us to identify a lineage previously assigned to *Haemoproteus syrnii* found in a screech owl (*Megascops choliba*) from southeastern Brazil [45]. Details regarding detected parasite lineages can be found in Table 2. The remaining mosquito species were negative for haemosporidians; the number of tested pools and the corresponding number of tested abdomens for each species were: *An. argyritarsis* (29; 270); *Ae. scapularis* (673; 6680); *Ae. stigmaticus* (35; 267); *Hg. spegazzinii* (20; 89); *Cq. hermanni* (378; 3440); *Cq. nigricans* (18; 145); *Cq. venezuelensis* (11; 67); *Ma. humeralis* (37; 291); *Ma. indubitans* (7; 61). Overall, four of the positive pools were sampled in pasture areas, while early and late stage areas had one positive sample each. All of the thorax pools corresponding to pools of positive abdomens tested negative for haemosporidians. Furthermore, all positive abdomen pools tested negative for the presence of bird DNA, but we did detect DNA from *Homo sapiens* in two pools (*Ma. titillans* and *Ps. discrucians*). All engorged females were negative for haemosporidians (see tested species below).

Phylogenetic analysis revealed that the *Plasmodium* lineages from *Mansonia* mosquitos are distributed in three different clades (Fig 4). The genetic distance between the two lineages found in *Ma. titillans* was 2.9% and each sequence differed 7.5% from the lineage found in *Ma. pseudotitillans*. All *Plasmodium* lineages from *Culex* sp. mosquitoes grouped together with *P. gallinaceum*.

We tested 141 engorged females for the presence of both avian and mammalian DNA: *Ae. scapularis* (n = 47); *Hg. spegazzinii* (n = 2); *Ps. discruciens* (n = 35); *Cq. hermanoi* (n = 12); *Cq. nigricans* (n = 2); *Cq. venezuelensis* (n = 3); *Ma. humeralis* (n = 4); *Ma. pseudotitillans* (n = 5); *Ma. titillans* (n = 31). All samples showed negative results for avian DNA, and 126 samples were positive for the presence of mammalian DNA (89.3%). Two *Ae. scapularis* captured at the peak of the rainy season had blood meal from *Mazama gouazoubira*, a deer species widely distributed in Brazil [46] and reported in Mata Seca State Park [47]. One of the engorged individuals was actively collected during the day in the early successional stage, while the other individual was collected using a Shannon trap in the pasture area. The remaining samples matched DNA sequences from *Homo sapiens* in mosquitos captured by both collection methods in all seasons. We did not capture engorged females from *Ae. stigmaticus*, *An. argyritarsis*, *Ma. indubitans* and *Culex* sp., although we can consider these species as attracted to humans.

## Discussion

Our survey revealed *Plasmodium* lineages in the abdomens of the mosquito species *Ma. titillans* (haemosporidian lineages PAMIT01 and MaTIT01), and *Ma. pseudotitillans* (TUMIG01). This suggests that these species are potential vectors of avian malaria parasites in the Seasonally Dry Tropical Forests of Brazil. However, detection of *Plasmodium* DNA in mosquitos using molecular methods alone does not confirm transmission; one must also visualize sporozoites in the salivary glands of mosquitos using microscopy or should conduct experimental infections to confirm true vector identify [48,49]. Nevertheless, our study

represents an important step in identifying vectors of avian malaria parasites in species-rich areas of the Neotropics.

The higher abundance of mosquitos from the tribe Mansoniini in pasture areas, especially from the end of the rainy season to the end of the dry season, may be due to its closer position to the main lake of the Mata Seca State Park. Species from this tribe depend on aquatic macrophytes during their immature life stages to obtain oxygen [26,50], so this lake probably is the main breeding site for *Mansonia* and *Coquillettidia*. The severe dry season in this area drastically reduces breeding sites for the tribe Aedini (temporary and small water collections in the soil [25,26,51]), but at the peak of the rainy season these species are homogenously distributed across all successional stages. All the species analyzed in this study utilize the three successional stages to some extent, but several species disappeared during the dry season, showing that seasonality plays a more important role in limiting the dispersion of mosquitos at MSSP. The putative vectors *Ma. titillans* and *Ma. pseudotitillans* were more abundant in pasture areas, although we understand that other vector species are still do be identified. *Culex* sp. were similarly distributed in the pasture and late successional stages, with lower abundance in early stages.

The dependency of the tribe Mansoniini on macrophytes suggests that these species may feed upon aquatic birds that gather around those lakes [52], making them an important blood source for potential *Plasmodium* vectors in our area of study. Chagas et al. [42], working in São Paulo Zoo, detected the *Plasmodium* lineage PAMIT01 in a free ranging host *Nycticorax nycticorax*, an aquatic species that inhabits our study area [52]. The same lineage was detected in two bird species sampled at our study area, and one avian host was captured in the same

season as the positive mosquitos we sampled (unpublished observations). It is worth mentioning that we detected the lineage MaTIT01 for the first time. This lineage has a difference of 15 basepairs in comparison to its closest related *Plasmodium* described in Genbank, but we still do not know which bird species it infects.

The lineage TUMIG03 was detected in passerines from different families in a large extension of the American continent [53,54], including southeastern Brazil [16], making it a widely distributed parasite. Kimura et al. [43] found the same lineage in *Culex pipiens* and in *Culex restuans* mosquitos collected in the USA, showing that this lineage can have a wide vector-breadth in parallel with a broad host and geographic range.

The detection of *P. gallinaceum* and closely related lineages in *Culex* sp. is intriguing and should be interpreted with caution. This mosquito genus is the main vector of avian *Plasmodium* [55] and for this reason was included in our analysis despite the lack of specific identification. There are no confirmed cases of natural transmission of *Plasmodium gallinaceum* outside of the Asian continent [4], but lineages closely related to this parasite have been detected in wild birds from southeastern Brazil [16] and in captive *Aburria jacutinga*, a bird from the order Galliformes [56]. We mist-netted birds for haemosporidian studies at these same areas and periods, but no *P. gallinaceum*-like parasites were detected (unpublished observations). Future studies in this area should try to access haemosporidians of bird species that are not captured with mist nets, such as Galliformes and aquatic birds, to increase the likelihood of detecting those parasites in their vertebrate hosts.

Culicid mosquitos have not been confirmed as competent vectors for *Haemoproteus* parasites [57], although we did find one abdomen pool of the mosquito *Ps. discrucians* positive for *Haemoproteus*. From this result, we can deduce that this mosquito species uses birds as a blood source, at least occasionally. Experimental work [57,58] has demonstrated that *Plasmodium* and *Haemoproteus* DNA can be detected in non-vector insects even in the absence of vertebrate DNA, as a result of long-lasting, abortive infections. This scenario explains our finding, and we, therefore, do not include *Psorophora* mosquitos as putative vectors of *Haemoproteus*.

Sampling methods can influence the community of collected mosquitos and as a result, the prevalence of haemosporidian parasites [7]. Our trap system relied on LED lamps and human presence as baits, which may have attracted mostly anthropophilic mosquitos, a result supported by the blood meal analysis of our samples that revealed only human-derived DNA in most of the engorged females (98%). However, studies testing blood meal source in *Mansonia* genera and in *Ae. scapularis* in Brazil have shown that these mosquitos can have ornithophily rates ranging from 20% to 43% [59–61]. Moreover, Njabo et al. [11] described three species from the genus *Coquillettidia* as putative vectors of avian *Plasmodium* in Cameroon. As this mosquito genus, together with *Mansonia* spp. and *Ae. scapularis*, constituted 86% of our tested samples, we expected to encounter a higher prevalence of avian haemosporidians. On the other hand, Gager et al. [14] did not detect haemosporidian parasites in 2,760 *Mansonia* and *Coquillettidia* mosquitos captured in Panama, showing that these genera may not be important vectors of avian haemosporidian parasites in the Neotropics. These

contrasting findings show the importance of further researches aiming the identification of avian malaria vectors in South and Central America.

We did not detect avian haemosporidian DNA in thoraces corresponding to positive abdomen pools. Avian malaria vectors can have negative thoraces when corresponding abdomens are positive in experimental and natural conditions [58,62,49]. For example, detection of positive thoraces by PCR starts at nine days after experimental infections of competent vectors, with positivity rates varying from 22.2 to 60% afterwards [58]. This suggests that future studies should not disregard the possibility that *Ma. titillans* and *Ma. pseudotitillans* can be vectors of avian haemosporidian parasites just based on our results of negative thorax pools. The same is also true of the potential vectors of *P. gallinaceum* that we identified.

Assessing host-feeding patterns of mosquitos and other blood-feeding dipterans can reveal species that act as vectors of zoonotic pathogens [63,64]. Our blood meal analysis revealed that all tested mosquito species feed upon humans, and *Ma. titillans*, *Ma. pseudotitillans*, *Ps. discrucians*, and *Culex* sp. mosquitos also demonstrate ornithophilic behavior. Just recently, antibodies against West Nile Virus (WNV) were detected in equines [65–67] and in chickens [66] in Brazil, with the first detection of this virus in humans occurring in 2014 [68]. Other human encephalitis viruses that have birds as reservoirs are transmitted in Brazil, such as the Rocio virus [69,70], the Mayaro virus [71], the Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) [25], and the Saint Louis encephalitis virus [67,70]. Moreover, *Ma. titillans* has been detected with WNV in the United States [72,73] and VEEV in Mexico [74], addressing to this species a potential role in the transmission of viruses between humans and birds. These results show that

potential vectors of important zoonotic diseases use different habitat types in our area of study, and they have access to a high diversity of birds that may act as pathogen reservoirs.

In summary, *Mansonia* mosquitos can be considered putative vectors of avian *Plasmodium* lineages in Seasonally Dry Tropical Forests of Brazil. We did not detect highly prevalent lineages in our mosquito samples, showing that *M. titillans* and *M. pseudotitillans* are vector candidates of secondary parasite lineages. Indeed, a lineage (MaTIT01) was described here for the first time and the lineage PAMIT01 was detected in two birds out of 63 *Plasmodium* sequences found in captured birds at the same time and place as the mosquitos (unpublished observations). The lineage TUMIG03 was found in six birds in Brazil [16], but none of those were sampled in Seasonally Dry Tropical Forests. Lacorte et al [16] detected 33 unique *Plasmodium* lineages in 106 sequences in Seasonally Dry Tropical Forests in Brazil. This highlights the singularity of the haemosporidian community of this ecosystem and reveals the need to identify vectors of the most common *Plasmodium* lineages in Brazil and in South America.

## Conclusion

We expanded the list of putative vectors of avian malaria, with the first detections of *Plasmodium* parasites in *Mansonia titillans* and in *M. pseudotitillans*. These species are more related to pasture areas, although they were found in all the three different habitats in our area of study. The diversity of avian haemosporidian vectors remain understudied in the Neotropics, and future studies should use different traps to detect new putative vectors of common *Plasmodium* lineages. Furthermore, visual and molecular identification of sporozoites in salivary glands of South American mosquitos should be attempted in order to elucidate

evolutionary and ecological links between such highly diverse communities of both avian *Plasmodium* and their vectors.

## **List of abbreviations**

SDTF: Seasonally Dry Tropical Forest; MSSP: Mata Seca State Park; cyt *b*: cytochrome b gene.

## **Ethics approval and consent to participate (Ethics statement)**

Collection of mosquitos complied with local regulations (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO license 29899).

## **Consent for publication**

Not applicable.

## **Availability of data and material**

Genetic sequences from parasites obtained in this study are deposited in GenBank (accession numbers from KX068685 to KX068694).

## **Authors' contributions**

FCFJ helped to design the study, performed molecular analysis, analyzed data and drafted the manuscript; RAR designed the study, conducted field work, identified the mosquitos and helped draft the manuscript; YS coordinated the experiments, analyzed data and helped draft the manuscript; MAZB designed the study, coordinated the experiments, helped draft the manuscript; EMB helped to



design and coordinated the study, analyzed data and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Gabriel M. F. Felix for his help in the rank-abundance analysis, to Vincenzo A. Ellis for his valuable contributions to the final version of this paper, and to Newton P. U. Barbosa for designing the map of our sampling area. This manuscript was greatly improved by the insightful comments from two anonymous reviewers.

## **Funding**

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 26450484) from the Japan Society for the Promotion of Science, and by The Strategic Research Base Development Program for Private Universities from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (S1491007). CAPES granted a Sandwich Doctorate Scholarship to Francisco C. Ferreira Junior, process number 99999.010535/2014-04. The founders had no role in the in the design of the study and in the collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Ortego J, Cordero PJ, Aparicio JM, Calabuig G. Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). *J. Ornithol.* 2008;149:337–43.
2. Knowles SCL, Palinauskas V, Sheldon BC. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *J. Evol. Biol.* 2010;23:557–69.
3. Dinhopf N, Nedorost N, Mostegl MM, Weissenbacher-Lang C, Weissenböck H. In situ hybridization and sequence analysis reveal an association of *Plasmodium* spp. with mortalities in wild passerine birds in Austria. *Parasitol. Res.* 2015;114:1455–62.
4. Valkiūnas G. *Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia*. 1st edition. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2005.
5. Ricklefs RE. Host-pathogen coevolution, secondary sympatry and species diversification. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2010;365:1139–47.
6. Medeiros MCI, Hamer GL, Ricklefs RE. Host compatibility rather than vector-host-encounter rate determines the host range of avian *Plasmodium* parasites. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2013;280:20122947–20122947.
7. Carlson JS, Walther E, TroutFryxell R, Staley S, Tell LA, Sehgal RNM, et al. Identifying avian malaria vectors: sampling methods influence outcomes. *Parasit. Vectors.* 2015;8: 365.
8. Medeiros MC, Ricklefs RE, Brawn JD, Hamer GL. *Plasmodium* prevalence across avian host species is positively associated with exposure to mosquito vectors. *Parasitology.* 2015;142:1612.
9. Ishtiaq F, Guillaumot L, Clegg SM, Phillimore AB, Black RA, Owens IPF, et al. Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. *Mol. Ecol.* 2008;17:4545–55.
10. Njabo KY, Cornel AJ, Sehgal RN, Loiseau C, Buermann W, Harrigan RJ, et al. *Coquillettidia* (Culicidae, Diptera) mosquitoes are natural vectors of avian malaria in Africa. *Malar. J.* 2009;8:193.
11. Njabo KY, Cornel AJ, Bonneaud C, Toffelmier E, Sehgal RNM, Valkiūnas G, et al. Nonspecific patterns of vector, host and avian malaria parasite associations in a central African rainforest. *Mol. Ecol.* 2011;20:1049–61.
12. Rueda LM. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia.* 2008;595:477–87.
13. Gabaldon A, Ulloa G, Pulido J. Distribucion geografica, ecologia y etologia de *Aedeomyia squamipennis*, importante vector natural de malaria aviaria en Venezuela. *Bol Dir Malariol Saneam Ambient.* 1981;21:103–13.

14. Gager AB, Del Rosario Loaiza J, Dearborn DC, Bermingham E. Do mosquitoes filter the access of *Plasmodium* cytochrome *b* lineages to an avian host? *Mol. Ecol.* 2008;17:2552–61.
15. Clark NJ, Clegg SM, Lima MR. A review of global diversity in avian haemosporidians (*Plasmodium* and *Haemoproteus*: Haemosporida): new insights from molecular data. *Int. J. Parasitol.* 2014;44:329–38.
16. Lacorte GA, Félix GMF, Pinheiro RRB, Chaves AV, Almeida-Neto G, Neves FS, et al. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. Snounou G, editor. *PLoS ONE.* 2013;8:e57770.
17. Svensson-Coelho M, Ellis VA, Loiselle BA, Blake JG, Ricklefs RE. Reciprocal Specialization in Multihost Malaria Parasite Communities of Birds: A Temperate-Tropical Comparison. *Am. Nat.* 2014;184:624–35.
18. Villar CM, Bryan AL, Lance SL, Braga EM, Congrains C, Del Lama SN. Blood parasites in nestlings of wood stork populations from three regions of the American continent. *J. Parasitol.* 2013;99:522–7.
19. Roos FL, Belo NO, Silveira P, Braga EM. Prevalence and diversity of avian malaria parasites in migratory Black Skimmers (*Rynchops niger*, Laridae, Charadriiformes) from the Brazilian Amazon Basin. *Parasitol. Res.* 2015;114:3903–11.
20. Belo NO, Pinheiro RT, Reis ES, Ricklefs RE, Braga EM. Prevalence and Lineage Diversity of Avian Haemosporidians from Three Distinct Cerrado Habitats in Brazil. *PLoS ONE.* 2011;6:e17654.
21. Fecchio A, Lima MR, Svensson-Coelho M, Marini MÁ, Ricklefs RE. Structure and organization of an avian haemosporidian assemblage in a Neotropical savanna in Brazil. *Parasitology.* 2013;140:181–92.
22. Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, de Moraes G, Leonardo J, Sparovek G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 2013;22:711–728.
23. Madeira BG, Espírito-Santo MM, Neto SD, Nunes YRF, Arturo Sánchez Azofeifa G, Fernandes GW, et al. Changes in tree and liana communities along a successional gradient in a tropical dry forest in south-eastern Brazil. *Plant Ecol.* 2009;201:291–304.
24. Pezzini FF, Ranieri BD, Brandão DO, Fernandes GW, Quesada M, Espírito-Santo MM, et al. Changes in tree phenology along natural regeneration in a seasonally dry tropical forest. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 2014;148:965–74.
25. Consoli RAGB, Oliveira RL de. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ; 1994.
26. Forratini OP. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia, Epidemiologia Vol. 2. São Paulo, SP: EdUSP; 2002.
27. Reinert JF. Mosquito Generic and Subgeneric Abbreviations (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 1975;7:105–10.

28. Arez AP, Lopes D, Pinto J, Franco AS, Snounou G, do Rosário VE. *Plasmodium* sp.: Optimal Protocols for PCR Detection of Low Parasite Numbers from Mosquito (*Anopheles* sp.) Samples. *Exp. Parasitol.* 2000;94:269–72.
29. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. A New Pcr Assay for Simultaneous Studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from Avian Blood. *J. Parasitol.* 2004;90:797–802.
30. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2000;267:1583–9.
31. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2725–9.
32. 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.* 2009;9:1353–8.
33. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003;19:1572–4.
34. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817–8.
35. Outlaw DC, Ricklefs RE. Rerooting the evolutionary tree of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108:13183–7.
36. Sawabe K, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Roychoudhury S, Higa Y, et al. Host-Feeding Habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Collected at the Urban and Suburban Residential Areas of Japan. *J. Med. Entomol.* 2010;47:442–50.
37. Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, et al. vegan: Community Ecology Package [Internet]. 2016. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>
38. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016. Available from: <http://www.R-project.org>
39. Magurran AE. *Measuring Biological Diversity*. 1 edition. Malden, Ma: Wiley-Blackwell; 2003.
40. Abella-Medrano CA, Ibáñez-Bernal S, MacGregor-Fors I, Santiago-Alarcon D. Spatiotemporal variation of mosquito diversity (Diptera: Culicidae) at places with different land-use types within a neotropical montane cloud forest matrix. *Parasit. Vectors* [Internet]. 2015;8. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/487>
41. Kindt R. BiodiversityR: Package for Community Ecology and Suitability Analysis [Internet]. 2016. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/BiodiversityR/index.html>

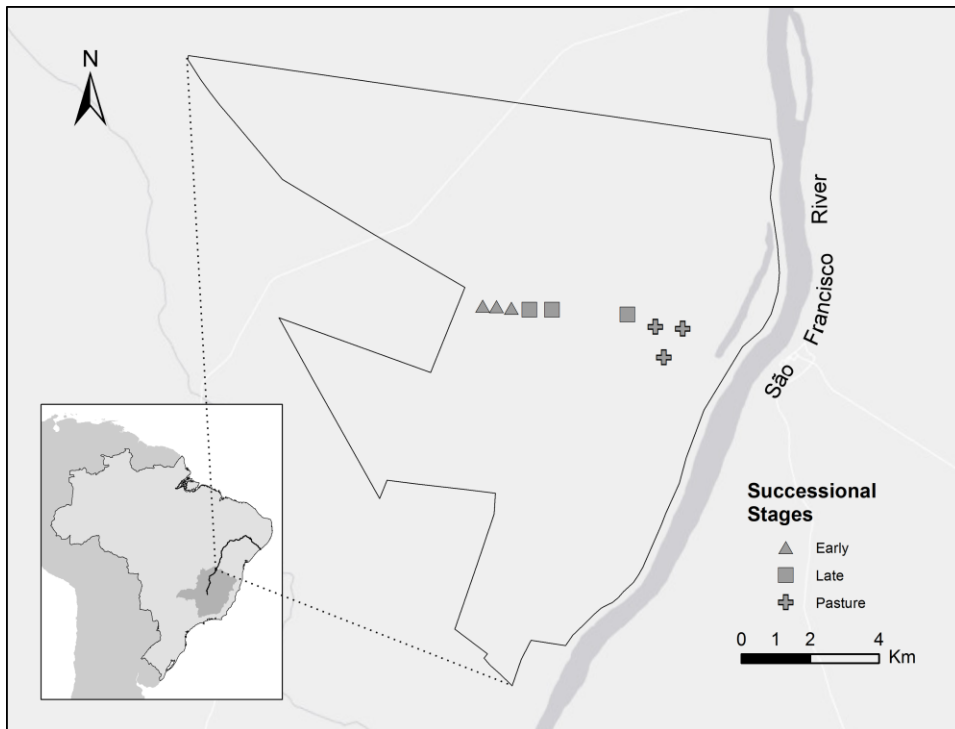
42. Chagas CRF, Guimarães L de O, Monteiro EF, Valkiūnas G, Katayama MV, Santos SV, et al. Hemosporidian parasites of free-living birds in the São Paulo Zoo, Brazil. *Parasitol. Res.* 2015;115:1443–52.
43. Kimura M, Darbro JM, Harrington LC. Avian Malaria Parasites Share Congeneric Mosquito Vectors. *J. Parasitol.* 2010;96:144–51.
44. Matthews AE, Ellis VA, Hanson AA, Roberts JR, Ricklefs RE, Collins MD. Avian haemosporidian prevalence and its relationship to host life histories in eastern Tennessee. *J. Ornithol.* 2016;157:533–48.
45. Vanstreels RET, Kolesnikovas CKM, Sandri S, Silveira P, Belo NO, Ferreira Junior FC, et al. Outbreak of Avian Malaria Associated to Multiple Species of *Plasmodium* in Magellanic Penguins Undergoing Rehabilitation in Southern Brazil. Spielmann T, editor. *PLoS ONE.* 2014;9:e94994.
46. Duarte JMB, Vogliotti A, dos Santos Zanetti E, de Oliveira ML, Tiepolo LM, Rodrigues LF, et al. Avaliação do risco de extinção do veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* G. Fischer [von Waldhein], 1814, no Brasil. *Biodiversidade Bras.* 2012;50–58.
47. Instituto Estadual de Florestas. Atlas da Fauna em Unidades de Conservação do Estado de Minas Gerais – volume I Mastofauna. Belo Horizonte: IEF; 2011.
48. Valkiūnas G. Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Mol. Ecol.* 2011;20:3084–3086.
49. Kim K, Tsuda Y. Sporogony and sporozoite rates of avian malaria parasites in wild *Culex pipiens pallens* and *C. inatomii* in Japan. *Parasit. Vectors.* 2015;8: 633.
50. Paula MB, Gomes A de C, Natal D, Duarte AMR de C, Mucci LF. Effects of Artificial Flooding for Hydroelectric Development on the Population of *Mansonia humeralis* (Diptera: Culicidae) in the Paraná River, São Paulo, Brazil. *J. Trop. Med.* 2012;2012:1–6.
51. Lourenço-de-Oliveira R, Heyden R, Silva TF da. Some aspects of the ecology of mosquitoes (Diptera, Culicidae) of an area of plains (granjas Calábria), in Jacarepaguá, Rio de Janeiro: V. Breeding places. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1986;81:265–71.
52. Dornelas AAF, de Paula DC, Santo MME, Azofeifa GS, Leite LO. Avifauna of the Mata Seca State Park, north of Minas Gerais. *Rev. Bras. Ornitol.-Braz. J. Ornithol.* 2012;20:14.
53. Ricklefs RE, Fallon SM. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2002;269:885–92.
54. Dodge M, Guers SL, Sekercioglu ÇH, Sehgal RNM. North American transmission of hemosporidian parasites in the Swainson's thrush (*Catharus ustulatus*), a migratory songbird. *J. Parasitol.* 2013;99:548–53.

55. Santiago-Alarcon D, Palinauskas V, Schaefer HM. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biol. Rev.* 2012;87:928–64.
56. Motta ROC, Romero Marques MV, Ferreira Junior FC, Andery D de A, Horta RS, Peixoto RB, et al. Does haemosporidian infection affect hematological and biochemical profiles of the endangered Black-fronted piping-guan (*Aburria jacutinga*)? *PeerJ.* 2013;1:e45.
57. Valkiūnas G, Kazlauskienė R, Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova TA. Abortive long-lasting sporogony of two *Haemoproteus* species (Haemosporida, Haemoproteidae) in the mosquito *Ochlerotatus cantans*, with perspectives on haemosporidian vector research. *Parasitol. Res.* 2013;112:2159–69.
58. Kim KS, Tsuda Y, Sasaki T, Kobayashi M, Hirota Y. Mosquito blood-meal analysis for avian malaria study in wild bird communities: laboratory verification and application to *Culex sasai* (Diptera: Culicidae) collected in Tokyo, Japan. *Parasitol. Res.* 2009;105:1351–7.
59. Alencar J, Lorosa ES, Silva J dos S, Lopes CM, Guimarães AE. Observações sobre padrões alimentares de mosquitos (Diptera: Culicidae) no Pantanal Mato-Grossense. *Neotrop Entomol.* 2005;34:681–687.
60. Lorosa ES, Faria MS, De Oliveira LCM, Alencar J, Marcondes CB. Blood Meal Identification of Selected Mosquitoes in Rio De Janeiro, Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2010;26:18–23.
61. dos Santos Silva J, Alencar J, Costa JM, Seixas-Lorosa E, Guimarães AÉ. Feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in six Brazilian environmental preservation areas. *J. Vector Ecol.* 2012;37:342–50.
62. Kazlauskienė R, Bernotienė R, Palinauskas V, Iezhova TA, Valkiūnas G. *Plasmodium relictum* (lineages pSGS1 and pGRW11): Complete synchronous sporogony in mosquitoes *Culex pipiens pipiens*. *Exp. Parasitol.* 2013;133:454–61.
63. Jansen CC, Webb CE, Graham GC, Craig SB, Zborowski P, Ritchie SA, et al. Blood Sources of Mosquitoes Collected from Urban and Peri-Urban Environments in Eastern Australia with Species-Specific Molecular Analysis of Avian Blood Meals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009;81:849–57.
64. Santiago-Alarcon D, Havelka P, Pineda E, Segelbacher G, Schaefer HM. Urban forests as hubs for novel zoonosis: blood meal analysis, seasonal variation in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors, and avian haemosporidians. *Parasitology.* 2013;140:1799–810.
65. Pauvolid-Corrêa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LTM, Couto-Lima D, Campos Z, et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011;106:467–74.
66. Melandri V, Guimarães AÉ, Komar N, Nogueira ML, Mondini A, Fernandez-Sesma A, et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012;107:1073–5.

67. Pauvolid-Corrêa A, Campos Z, Juliano R, Velez J, Nogueira RMR, Komar N. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8.
68. Vieira MACS, Romano APM, Borba AS, Silva EVP, Chiang JO, Eulálio KD, et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015;93:377–9.
69. Straatmann A, Santos-Torres S, Vasconcelos PFC, Rosa T da, P.a A, Rodrigues SG, et al. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (Flaviviridae) na Bahia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1997;30:511–5.
70. Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, de Souza LT, Iversson LB. Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest Region, State of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 1994;36:265–74.
71. Figueiredo LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007;40:224–9.
72. Florida Health. Florida 2005 arbovirus activity by county [Internet]. Tallahass. FL Fla. Dep. Health. 2006. Available from: [http://www.floridahealth.gov/diseases-and-conditions/mosquito-borne-diseases/\\_documents/2005annual-report.pdf](http://www.floridahealth.gov/diseases-and-conditions/mosquito-borne-diseases/_documents/2005annual-report.pdf)
73. Unlu I, Kramer WL, Roy AF, Foil LD. Detection of West Nile virus RNA in mosquitoes and identification of mosquito blood meals collected at alligator farms in Louisiana. *J. Med. Entomol.* 2010;47:625–33.
74. Adams AP, Navarro-Lopez R, Ramirez-Aguilar FJ, Lopez-Gonzalez I, Leal G, Flores-Mayorga JM, et al. Venezuelan Equine Encephalitis Virus Activity in the Gulf Coast Region of Mexico, 2003–2010. *PLOS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1875.

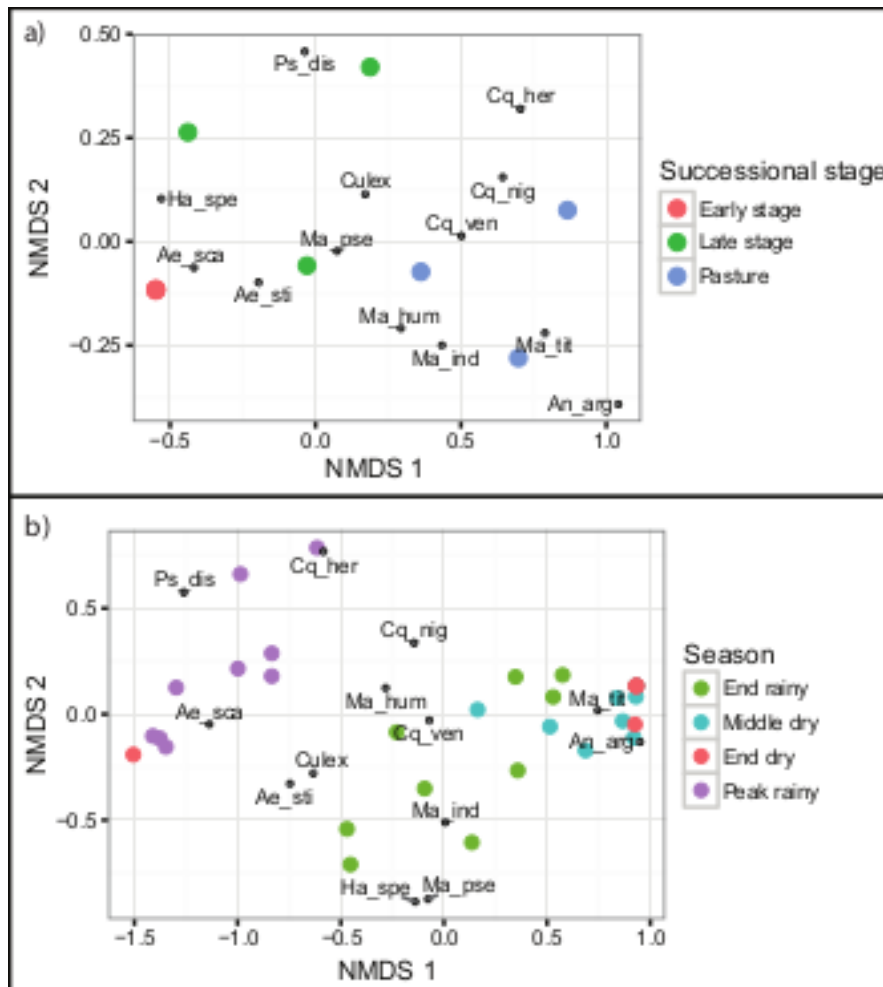
Figures

**Fig 1. Mata Seca State Park in Minas Gerais, Brazil, showing the mosquitos sampling areas.**



**Fig 2. Non-dimensional metric scaling (NMDS) ordination showing mosquito community dissimilarity between successional stages (a) and season (b).**

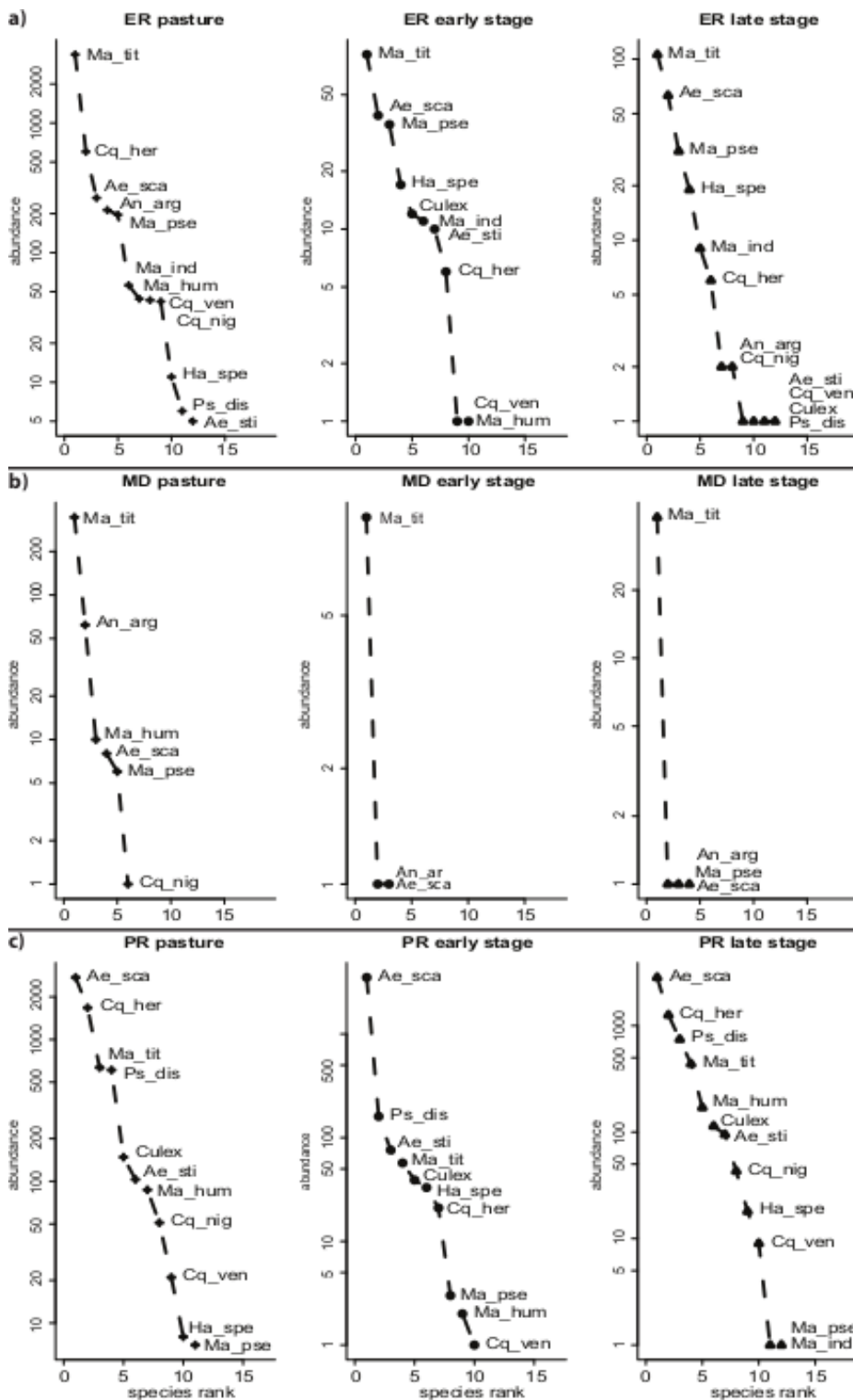




The mosquito community was significantly dissimilar through all successional stages (ANOSIM;  $R = 0,620$ ;  $P = 0,009$ ) and between the peak of the rainy season and the remaining periods of collection (ANOSIM;  $R = 0,624$ ;  $P = 0,0001$ ). All sampling points from the early stage coalesced in a single point in the graph.

An\_arg = *An. argyritarsis*; Ae\_sca = *Ae. scapularis*; Ae\_sti = *Ae. stigmaticus*; Ha\_spe = *Ha. spegazzinii*; Ps\_dis = *Ps. discrucians*; Cq\_her = *Cq. hermanoi*; Cq\_nig = *Cq. nigricans*; Cq\_ven = *Cq. venezuelensis*; Ma\_hum = *Ma. humeralis*; Ma\_ind = *Ma. indubitans*; Ma\_pse = *Ma. pseudotitillans*; Ma\_tit = *Ma. titillans*.  
Culex = *Culex* sp.

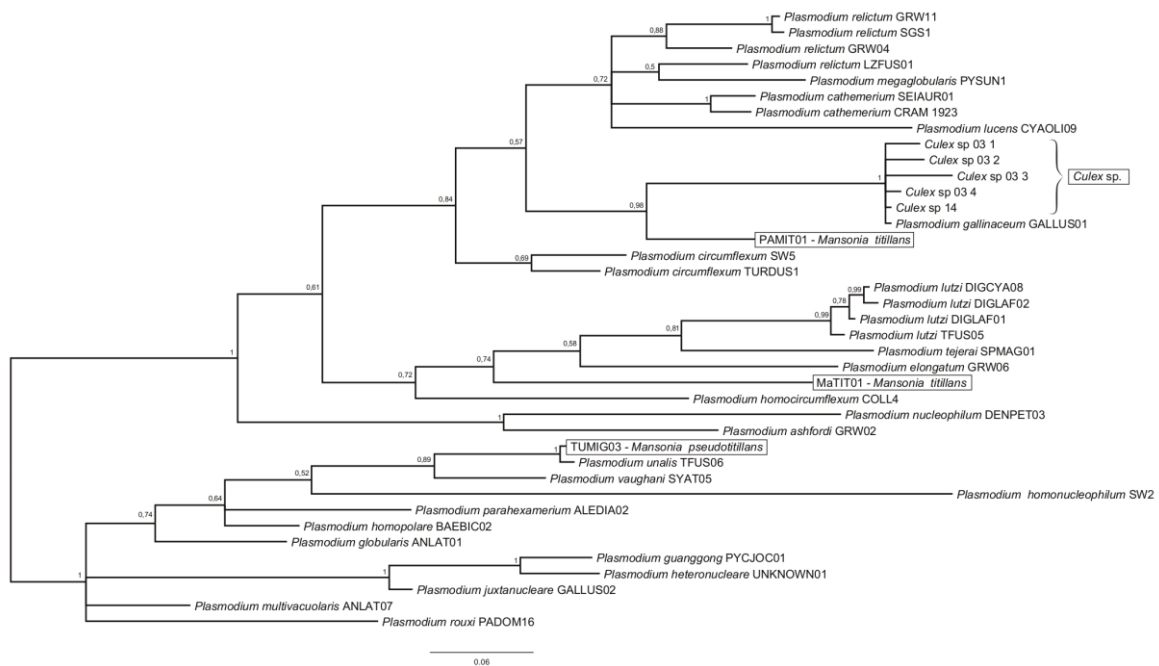
**Fig 3. Rank-abundance curves of mosquito species according to successional stages.**



We did not analyze the end of the dry season due to its small sample size. There was no difference in the community evenness between successional stages for

all seasons analyzed (ANCOVA;  $F_{1,74} = 0,018$ ;  $P = 0,982$ ). **a)** end of the rainy season ( $F_{1,28} = 0,615$ ;  $P = 0,548$ ), **b)** middle of the dry season ( $F_{1,7} = 0,015$ ;  $P = 0,985$ ), **c)** peak of the rainy season ( $F_{1,28} = 1,733$ ;  $P = 0,196$ ). Species abbreviation are shown in the legend of figure 2.

**Fig 4. Phylogenetic tree showing the relationships between haplotypes from this study and parasites with described morphospecies.**



Mosquito species together with their associated parasite lineages are inside the boxes. Branch lengths are drawn proportionally to the amount of changes (a scale bar is shown).

Table 1: Abundance of the 12 most common mosquito species and *Culex* sp. sampled in this study.

Species	End rainy season			Middle dry season			End dry season			Peak rainy season			Total per stage			Total
	Pasture	Early	Late	Pasture	Early	Late	Pasture	Early	Late	Pasture	Early	Late	Pasture	Early	Late	
<i>Anopheles argyritarsis</i>	213	0	2	62	1	1	3	0	0	0	0	0	278	1	3	282
<i>Aedes scapularis</i>	264	39	63	8	1	1	0	1	0	2739	3507	2836	3011	3548	2900	9459
<i>Aedes stigmaticus</i>	5	10	1	0	0	0	0	0	0	103	76	95	108	86	96	290
<i>Haemagogus spegazzinii</i>	11	17	19	0	0	0	0	0	0	8	33	18	19	50	37	106
<i>Psorophora discrucians</i>	6	0	1	0	0	0	0	0	0	609	160	744	615	160	745	1520
<i>Coquilleidia hermanoi</i>	600	6	6	0	0	0	0	0	0	1674	21	1258	2274	27	1264	3565
<i>Cq. nigricans</i>	42	0	2	1	0	0	0	0	0	51	0	43	94	0	45	139
<i>Cq. venezuelensis</i>	43	1	1	0	0	0	0	0	0	21	1	9	64	2	10	76
<i>Mansonia humeralis</i>	44	1	0	10	0	0	0	0	0	87	2	170	141	3	170	314
<i>Ma. indubitans</i>	56	11	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	56	11	10	77
<i>Ma. pseudotitillans</i>	196	35	31	6	0	1	0	0	0	7	3	1	209	38	33	280
<i>Ma. titillans</i>	3375	81	106	345	9	42	49	0	1	635	57	437	4404	147	586	5137
<i>Culex</i> sp.	0	12	1	0	0	0	0	0	0	148	39	114	148	51	115	314
Total stage/season	4855	213	242	432	11	45	52	1	1	6082	3899	5726	11421	4124	6014	21559
Total	5310			488			54			15707						

Table 2: Parasite lineages detected in mosquitoes captured at Mata Seca State Park (MSSP), Brazil.

	Successional stage of collection	Season	Lineage name (GenBank accession numbers)	Vertebrate hosts of previous detections (bird order)	Locations of previous detections (GenBank accession numbers)
<b><i>Mansonia titillans</i></b>	Late stage	Peak rainy	PAMIT01 (KX068686)	<i>Leptotila verreauxi</i> (Columb.), <i>Myiodynastes maculatus</i> (Pas.); <i>Nycticorax nycticorax</i> (Pelec.)	MSSP (unpublished observations); São Paulo Zoo (KU057967)
<b><i>Mansonia titillans</i></b>	Pasture	End rainy	MaTIT01 (KX068685)	New lineage	
<b><i>Mansonia pseudotitillans</i></b>	Pasture	End rainy	TUMIG03 (KX068687)	<i>Catharus ustulatus</i> ; <i>Turdus migratorius</i> ; <i>Tangara icterocephala</i> , <i>Turdus assimilis</i> ; <i>Turdus amaurochalinus</i> (Pas.)	Alaska, USA (JN792135); Missouri, USA (AF465548); Costa Rica (JN819328); Southeastern Brazil (JX021462)
<b><i>Psorophora discrucians</i></b>	Early stage	Peak rainy	<i>Haemoproteus syrnii</i> -PsDIS01 (KX068688)	<i>Megascops choliba</i> (Strigiformes)	São Paulo State, Brazil (KJ575554)
<b><i>Psorophora discrucians</i></b>	Early stage	Peak rainy	PsDIS02 (KX068689)	New lineage	
<b><i>Culex</i> sp.</b>	Pasture	Peak rainy	<i>P. gallinaceum</i> (KX068694)	<i>Gallus gallus domesticus</i> (Gallif.)	
<b><i>Culex</i> sp.</b>	Pasture	Peak rainy	<i>P. gallinaceum</i> -like (KX068690-93)	New lineages	

Bird order abbreviations in parenthesis: Columb. = Columbiformes; Gallif. = Galliformes; Pas. = Passeriformes; Pelec. =

Pelecaniformes. MSSP = Mata Seca State Park, unpublished observations.