

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

FERNANDA LOPES ROOS

**Ocorrência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves aquáticas
migratórias (*Rynchops niger* e *Phaetusa simplex*) na Reserva de Desenvolvimento
Sustentável Mamirauá, Médio Solimões, Amazonas, Brasil**

Belo Horizonte

2014

FERNANDA LOPES ROOS

Ocorrência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves aquáticas migratórias (*Rynchops niger* e *Phaetusa simplex*) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Médio Solimões, Amazonas, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientação: Érika Martins Braga

Coorientação: Nayara de Oliveira Belo

Belo Horizonte

2014

RESUMO

Muitas pesquisas em diferentes regiões do mundo vêm demonstrando a prevalência e a ocorrência de hemoparasitos aviários em diversos hospedeiros vertebrados. No entanto, pouco é conhecido sobre a ocorrência de hemoparasitos como *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. na região amazônica brasileira. A região do Médio Solimões, no Estado do Amazonas, é uma área de reprodução e nidificação de algumas espécies de aves aquáticas migratórias, como *Rynchops niger*, *Sternula supercilialis* e *Phaetusa simplex*, que formam colônias reprodutivas mistas e com altas densidades. Essas aves migratórias uma vez parasitadas por hemoparasitos podem representar uma fonte potencial de infecção para demais aves suscetíveis, em diferentes regiões do Brasil e das Américas, devido à grande abrangência das rotas de migração desses animais. Nessa direção, o objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência e a diversidade de espécies e/ou linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus* em *R. niger* e *P. simplex* na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Médio Solimões, Amazonas, Brasil a partir da observação microscópica de esfregaços sanguíneos e amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b. Um total de 173 aves foram capturadas. A partir da análise dos esfregaços sanguíneos foi observada uma ocorrência de 17,34% de aves infectadas por *Plasmodium*/*Haemoproteus*. Na análise molecular 6,36% das aves foram positivas. A associação de microscopia com PCR identificou 30 amostras positivas (17,34%). Foram obtidas seis sequências sendo identificadas três linhagens distintas, duas de *Plasmodium* e uma de *Haemoproteus*. A linhagem de *Haemoproteus* sp., encontrada em quatro indivíduos adultos da espécie *R. niger* em Mamirauá, possui sequência 100% compatível com *Haemoproteus macrovacuolatus* descrito em um anseriforme na Colômbia. Considerando-se que doenças parasitárias, como a malária aviária podem ser responsáveis por um número considerável de extinções de espécies silvestres, a avaliação desses parâmetros torna-se uma importante ferramenta para o diagnóstico de saúde ambiental e para a elaboração de programas de manejo de recursos naturais e de conservação da biodiversidade em áreas tropicais.

Palavras-chave: Malária aviária. *Plasmodium* spp. *Haemoproteus* spp. Amazônia brasileira. Charadriiformes. Aves migratórias.

ABSTRACT

Many studies conducted worldwide have demonstrated both prevalence and occurrence of avian hemoparasites in several vertebrate hosts. However, little is known about the occurrence of hemoparasites such as *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. in the Brazilian Amazon. The region of the Medium Solimões river, in the Amazonas state, is an area of reproduction and nesting of a variety of species of migratory aquatic birds such as *Rynchops niger*, *Sternula superciliaris* and *Phaetusa simplex*, which form reproductive mixed colonies with high population densities. These migratory birds parasitized by hemoparasites may represent a potential source of infection to other susceptible birds of the different regions of Brazil and America due to the large range of the migration routes of these animals. This study aimed to determine the prevalence and diversity of species and/or lineages of *Plasmodium* and *Haemoproteus* in the *R. niger* and *P. simplex* species in the Reserve of Sustainable Development Mamirauá, Médio Solimões, Amazon, Brazil based on the microscopic observation of blood smears and sequencing of the cytochrome b mitochondrial gene. A total of 173 birds were captured. From the blood smears analysis was observed an occurrence of 17,34% of infected birds by *Plasmodium*/*Haemoproteus*. In the molecular analysis 6,36% of birds were positives. The combination of microscopy with PCR identified 30 positive samples (17,34%). Six sequences were obtained being three different lineages identified, two of *Plasmodium* and one of *Haemoproteus*. The *Haemoproteus* lineage described and detected in four adults of species *R. niger* in Mamirauá has 100% sequence compatible with *Haemoproteus macrovacuolatus* described in a anseriforme in Colombia. Considering that parasites diseases, such as the avian malaria, could be responsible for a significant number of extinctions of wild species, so the evaluation of these parameters becomes an important tool in the diagnosis of environmental health and for the development of programs for the management of natural resources and biodiversity conservation in tropical areas.

Keywords: Avian malaria. *Plasmodium* spp. *Haemoproteus* spp. Brazilian Amazon. Charadriiformes. Migratory birds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de animais capturados por espécie e faixa-etária no período entre outubro e novembro de 2012 na RDSM.....	40
Tabela 2	Número de indivíduos de <i>P. simplex</i> e <i>R. niger</i> amostrados e número de indivíduos positivos detectados pela observação microscópica de esfregaços sanguíneos conforme a faixa-etária.....	41
Tabela 3	Linhagens encontradas em sete adultos de <i>R. niger</i>	45
Tabela 4	Linhagens de <i>Haemoproteus</i> descritas em Charadriiformes da família Laridae.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação genérica do ciclo de espécies de <i>Plasmodium</i> de aves.....	17
Figura 2	Representação genérica do ciclo de espécies de <i>Haemoproteus</i> de aves.....	19
Figura 3	Representação das áreas focal e subsidiária da RDSM.....	22
Figura 4	<i>P. simplex</i>	24
Figura 5	Mapa de distribuição e ocorrência de <i>P. simplex</i>	25
Figura 6	<i>R. niger</i>	26
Figura 7	Adultos de <i>R. niger</i> durante o período de repouso na ponta da Praia do Meio.....	27
Figura 8	Mapa de distribuição e ocorrência de <i>R. niger</i>	28
Figura 9	Mapa da RDSM.....	31
Figura 10	Coleta de sangue na veia braquial de um filhote de <i>R. niger</i>	32
Figura 11	Captura noturna.....	33
Figura 12	Punção da veia braquial em adulto de <i>R. niger</i>	34
Figura 13	Desenho esquemático da região do gene mitocondrial <i>cyt b</i> de <i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i> amplificada na <i>nested</i> PCR.....	37
Figura 14	Esfregaço de sangue de um indivíduo adulto de <i>R. niger</i>	41
Figura 15	Micofilária encontrada em esfregaço sanguíneo de uma ave adulta da espécie <i>R. niger</i>	42
Figura 16	Cladograma das linhagens encontradas nesse estudo.....	44
Figura 17	Mapas de ocorrência de <i>P. simplex</i> e de <i>R. niger</i>	46

LISTA DE ABREVIACÕES

bp	Base pair
IDS	Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
IUCN	International Union for the Conservation of Nature
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDS	Reserva de Desenvolvimento Sustentável
RDSM	Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
SDS	Secretaria de Desenvolvimento Sustentável
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SNUC	Sistema Nacional de Unidades de Conservação
SSU	Small subunit
TBE	Tris-borato EDTA
UC	Unidade de Conservação
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Doenças infecciosas e saúde ambiental.....	11
1.2.	Hemoparasitos de aves.....	13
1.2.1	<i>Plasmodium</i> spp. (Marchiafava & Celli, 1885).....	15
1.2.2.	<i>Haemoproteus</i> spp. (Kruse, 1890).....	18
1.3.	Importância das infecções por <i>Plasmodium</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp. na conservação da biodiversidade.....	20
1.4.	A Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.....	21
1.5.	Aves migratórias da ordem Charadriiformes na RDSM.....	24
1.5.1.	<i>P. simplex</i> (Gmelin, 1789).....	24
1.5.2.	<i>R. niger</i> (Linnaeus, 1758).....	26
2.	JUSTIFICATIVA.....	29
3.	OBJETIVOS.....	30
3.1.	Objetivo geral.....	30
3.2.	Objetivos específicos.....	30
4.	AMOSTRAGEM.....	31
4.1.	Local.....	31
4.2.	Aves e esforço amostral.....	32
4.3.	Coleta de material biológico e análise das amostras.....	34
4.3.1.	Esfregaços sanguíneos.....	34
4.3.2.	Extração de DNA a partir do sangue total.....	35
4.3.3.	Diagnóstico molecular: triagem de infecção.....	35
4.3.4.	PCR para sequenciamento.....	36
4.3.4.1.	<i>nested</i> PCR	36
4.3.5.	Sequenciamento da região do gene mitocondrial citocromo b.....	38
4.3.6.	Análises estatísticas.....	39
5.	RESULTADOS.....	40
5.1.	Deteção de hemoparasitos por microscopia óptica.....	40
5.2.	Diversidade de linhagens de <i>Plasmodium</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp.....	43
6.	DISCUSSÃO.....	47
6.1.	Ocorrência de infecção e características das aves parasitadas.....	47

6.2.	Diversidade de hemoparasitos.....	52
7.	CONCLUSÕES.....	56
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXO 1.....	71
	ANEXO 2.....	72

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

À Érika Braga, pela oportunidade de realizar o mestrado junto ao laboratório de Malária e pela orientação nesse trabalho.

À Nayara Belo, por toda orientação técnica e teórica imprescindíveis para a execução de todas as etapas da pesquisa.

À Patrícia Silveira pela ajuda na análise dos esfregaços.

Ao Francisco Ferreira (Chiquinho), pela orientação para os trabalhos em laboratório durante a ausência da Nayara e por “me resgatar”, algumas vezes, dos microtubos e microlitros me levando para suas coletas de campo.

Ao Gabriel Félix, figura muito peculiar! Agradeço pela ajuda na rotina do laboratório e pelas conversas muito doidas.

Às colegas de laboratório: Adriana Fernandes, Alcina Zita, Daniela Dutra, Lidia Vilela, Luiza Mourão Natália Crispim, Zélia Almeida. Obrigada pela convivência maravilhosa.

Às queridas companheiras de apartamento, Naylene Carvalho e Denise Martins. Obrigada pela convivência sempre agradável, pela amizade e carinho. Vocês são minhas grandes amigas!

Aos colegas do Instituto Mamirauá, principalmente ao João Valsecchi e à Bianca Bernardon. Agradeço pelo apoio e por me acolherem novamente no ECOVERT, no projeto de captura de aves. À Camila Pires e Caroline Gomes pela ajuda no trabalho de campo e pela companhia maravilhosa. Ao Jonas Gonçalves, obrigada também pela parceria excelente desde a época dos Macacos Urbanos. Foi bom te reencontrar!

Ao Emerson e ao Zé por “correrem atrás das gaivotinhas”. A todo o pessoal da comunidade Santa Luzia e aos que conviveram comigo no Flutuante Horizonte.

À Michele Araujo e ao Emilio Higashikawa, pela amizade e por me acolherem novamente na velha morada em Tefé. Foi muito bom ter a companhia de vocês!

Aos meus queridos colegas e amigos da turma Parasito Lado B: Adalberto, Ana Carolina, Breno, Caroline, Cleydlene, Dimitri, Eliseu, Fernando, Ingrid, Kell, Larissa, Luciano, Luísa, Mariana, Matheus, Naylene e Sebastião. Vocês são demais!

Dedico esse trabalho ao meu amor, meu grande amigo e companheiro, Mateus Avila. Obrigada pelo carinho, pela compreensão, por me acompanhar durante a fase mais tensa e intensa da minha saga-mestrado. Tua presença e teu apoio são fundamentais para mim!

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças infecciosas e saúde ambiental

Há décadas as ações antrópicas, como poluição, desmatamento e sobre-exploração de recursos naturais, têm causado mudanças ambientais e climáticas. Essas alterações globais estão sendo apontadas como as maiores ameaças à conservação da biodiversidade, pois exercem influência negativa no balanço ecológico ao afetar diretamente as interações biológicas entre hospedeiros vertebrados, vetores e parasitos, possibilitando a transmissão e disseminação de doenças (McCALLUM & DOBSON 1995; PATZ, 2002; CUNNINGHAM *et al.*, 2003).

A saúde ambiental tem sido discutida com base em conceitos da Medicina da Conservação, termo introduzido por Kock (1996) para descrever a saúde em um contexto ecológico. Esse tipo de abordagem procura conectar a saúde animal à saúde humana e de ecossistemas, relacionando-as às mudanças ambientais que se caracterizam pelas influências de ações antrópicas. Contudo, mesmo antes da denominação proposta por Kock, esse tipo de abordagem já caracterizava a linha de pesquisa de diversos trabalhos e ainda é ponto de discussão em trabalhos mais recentes que avaliam o impacto das doenças infecciosas em populações de animais silvestres, de vida livre ou cativeiro, buscando um melhor entendimento sobre as interações parasito-hospedeiro e suas consequências em nível de ecossistemas (GRENFELL & DOBSON, 1995; ANDERSON & MAY, 1978; VAN RIPER III *et al.*, 1986; VAN RENSBURG *et al.*, 1987; SCOTT, 1988; HOCHACHKA & DHONDT, 2000; HUDSON *et al.*, 2002). As discussões levantadas questionam o quanto e como as doenças infecciosas podem interferir nas dinâmicas populacionais de seus hospedeiros, gerando impactos na sobrevivência, reprodução e mobilidade dos animais (PULLIN & KNIGHT, 2001).

Sabe-se que as infecções são definidas pela presença de microparasitos (protozoários, bactérias, vírus) e de macroparasitos (helminthos). No entanto, somente a presença de um agente infeccioso não determina um estado de doença. As condições que determinarão diferentes desfechos em uma infecção (cura, doença aguda e morte, infecção crônica, doença subclínica ou assintomática) possuem influências multifatoriais muito complexas relacionadas ao hospedeiro (imunidade individual e da

população, exposição ao parasito, estresse, sexo, genética, densidade populacional), ao parasito (cepa, virulência), ao ambiente onde ocorre essa interação e todos esses fatores em relação ao tempo (STALLONES, 1972; YORKE *et al.*, 1979; OMS, 1998; HIRSH & ZEE, 2003).

Uma infecção pode determinar uma doença clínica, que afeta diretamente a sobrevivência do hospedeiro, como por exemplo, mamíferos infectados pelo vírus rábico (*Lyssavirus*), que apresentam doença grave do sistema nervoso central, sendo geralmente fatal, atingindo uma taxa de letalidade próxima de 100% em alguns hospedeiros (HIRSH & ZEE, 2003). No entanto, alguns parasitos podem infectar seus hospedeiros sem lhes causar um dano direto, imediato ou aparente. Algumas infecções apresentam-se de forma subclínica, com sinais praticamente ou totalmente imperceptíveis em uma observação *in situ*. Algumas dessas infecções silenciosas podem comprometer, em longo prazo, o sucesso reprodutivo e de sobrevivência das espécies hospedeiras, interferindo na estabilidade estrutural de populações ou metapopulações acometidas (ANDERSON & MAY, 1978; VAN RENSBURG *et al.*, 1987; SCOTT, 1988; SANTA CRUZ *et al.*, 2000a). Por isso, doenças infecciosas em populações silvestres são apontadas como responsáveis por perdas importantes da biodiversidade em diferentes regiões, levando a extinções locais e globais (HUGHES, 1991; CUNNINGHAM & DASZAK, 1998; DASZAK & CUNNINGHAM, 1999; GILLESPIE & CHAPMAN, 2004). Essa perda de biodiversidade causada por doenças infecciosas pode levar a grandes impactos em ecossistemas (KEESING *et al.*, 2010).

A partir da hipótese de que doenças infecciosas podem ser responsáveis por um número considerável de extinções de espécies silvestres (McCALLUM & DOBSON, 1995) e pela manutenção de distúrbios fisiológicos subclínicos recorrentes nessas populações, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, a avaliação da ocorrência de infecções torna-se uma importante ferramenta para o diagnóstico de saúde ambiental e para a elaboração de programas de manejo de recursos naturais e de conservação da biodiversidade (SCOTT 1988; MELTZER, 1993; OSOVSKY *et al.*, 2000; NEVES, 2010). Nesse contexto, torna-se de grande importância o estudo sobre os parasitos sanguíneos de aves domésticas e silvestres, por serem considerados excelentes modelos teóricos e empíricos de estudos sobre a interação parasito-hospedeiro, por apresentarem ampla distribuição e por exercerem grande impacto no *fitness* dos hospedeiros, alterando as dinâmicas populacionais ao longo do tempo (BENNETT *et*

al., 1982a; HAMILTON & ZUK, 1982; LOYE & ZUK, 1991; CLAYTON & MOORE, 1997).

1.2. Hemoparasitos de aves

Entre os parasitos sanguíneos de aves estão descritos alguns filarídeos, nematódeos que parasitam tecidos e cavidade peritoneal de seus hospedeiros, liberando suas larvas, as microfilárias, na circulação periférica; protozoários flagelados (*Trypanosoma* spp.); e hemosporídeos intracelulares do filo Apicomplexa (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005).

Entre os hemoparasitos frequentemente encontrados em aves silvestres, de vida livre e de cativeiro, estão os hemosporídeos. Esses parasitos compõem a subordem Haemosporina, sendo mais prevalentes os gêneros *Haemoproteus*, *Plasmodium* e *Leucocytozoon* (JULIAN & GALT, 1980; DANILEWSKY, 1885; HOPINKS *et al.*, 1990; VALKIŪNAS, 2005), encontrados em diferentes hospedeiros que, além das aves, incluem répteis e mamíferos. Os protozoários do filo Apicomplexa caracterizam-se pela presença de um complexo apical formado por diversas organelas relacionadas à adesão e invasão às células hospedeiras: micronemas, roptrias, anéis polares, conoide e microtúbulos subpeliculares (PERKINS, 1990).

Entre esses três gêneros de hemosporídeos, destacam-se *Plasmodium* e *Haemoproteus*, por incluírem espécies de importância global devido às suas distribuições cosmopolitas e aos altos índices de morbidade e de mortalidade expressados em populações de aves silvestres (ATKINSON *et al.*, 1995; FRIEND & FRANSON, 1999; ATKINSON *et al.*, 2000; WALDENSTRÖM *et al.*, 2002). As espécies de *Haemoproteus* e de *Plasmodium* são geograficamente mais distribuídas, com registros em diferentes lugares do mundo, com exceção da Antártica, onde as baixas temperaturas limitam a presença dos vetores (FRIEND & FRANSON, 1999). No entanto, as constantes mudanças climáticas têm possibilitado o aumento da área de ocorrência desses parasitos e de seus vetores mesmo em regiões com temperaturas negativas. De fato, a ocorrência de transmissão de *Plasmodium* spp. entre espécies de aves residentes e migratórias em duas regiões do Alaska já foi evidenciada. Nesse estudo, foram feitas predições que estimam a expansão da zona de risco para o limite norte do Círculo Polar Ártico até o ano de 2080 (LOISEAU *et al.*, 2012).

Dados sobre infecções por espécies de *Leucocytozoon* (BERESTNEFF, 1904) são esparsos e esse gênero de hemosporídeos é pouco reportado nas regiões neotropicais, quando comparado aos gêneros *Haemoproteus* e *Plasmodium* (VALKIŪNAS, 2005). Um dos poucos estudos sobre a ocorrência em região neotropical foi realizado na região andina da Colômbia, no Parque Natural Chingaza (LOTTA *et al.*, 2013). No Brasil, não existem dados publicados sobre a transmissão desse hemoparasito.

A deposição de hemozoína ou pigmento malárico (produto da degradação da hemoglobina pelo parasito) em órgãos como baço e fígado, e a anemia são duas características envolvidas na patologia da infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp., o que classifica as espécies de ambos os gêneros como agentes etiológicos da malária aviária (SCHRENZEL *et al.*, 2003; VALKIŪNAS, 2005).

Segundo Valkiūnas (2005), o termo malária deveria ser utilizado somente para a doença causada por espécies de *Plasmodium*, por serem os únicos parasitos a realizar reprodução assexuada (esquizogonia) dentro de eritrócitos na circulação periférica, característica perdida durante a evolução dos demais hemosporídeos (PERKINS & SCHALL, 2002; MARTINSEN *et al.*, 2008). Atualmente, pesquisadores têm discutido criticamente a definição baseada em características morfológicas, biológicas e evolutivas na classificação dos hemosporídeos aviários. Novas informações sobre as sequências genéticas desses parasitos contrapõem-se à sistemática clássica e às relações entre os gêneros reconhecidos atualmente. Análises filogenéticas baseadas no DNA mitocondrial e nuclear demonstraram que as características morfológicas e a história de vida não indicam necessariamente parentesco entre os parasitos hemosporídeos (PERKINS & SCHALL, 2002; RICKLEFS *et al.*, 2004; BENSCH *et al.*, 2004; PEREZ-TRIS *et al.*, 2005). No entanto, recentemente Martissen *et al.* (2008) propuseram que o clado monofilético que inclui *Hepatocystis*, *Plasmodium* e *Haemoproteus* fosse incluído na categoria de parasitos da malária aviária.

Por existirem divergências conceituais, não há uma definição consolidada sobre quais parasitos podem ser considerados, realmente, causadores da doença, e cada autor aborda o assunto de maneira diferente. Nesse trabalho, tanto *Plasmodium* spp. quanto *Haemoproteus* spp. será considerado agente causador da malária aviária.

1.2.1. *Plasmodium* spp. (Marchiafava & Celli, 1885)

O gênero *Plasmodium* pertencente à família Plasmodiidae do filo Apicomplexa, sendo o mais estudado entre os parasitos sanguíneos de aves. As espécies de *Plasmodium* descritas são agrupadas em 15 subgêneros, distribuídos em sete subgêneros que ocorrem em répteis (TELFORD, 1988); três subgêneros que ocorrem em mamíferos (GARNHAM, 1966); e cinco subgêneros em aves (VALKIŪNAS, 1997). Os plasmódios aviários possuem uma ampla distribuição mundial e estão associados à presença de vetores dípteros da família Culicidae (VAN RIPER III *et al.*, 1994; VALKIŪNAS, 2005).

Nos vetores suscetíveis, a infecção ocorre após o repasto nas aves hospedeiras e a ingestão de eritrócitos contendo gametócitos. Os gametócitos masculinos sofrem exflagelação e fusionam-se aos gametas femininos, no intestino médio do inseto, formando oocistos entre o epitélio e a lâmina basal. Há multiplicação por esporogonia e formação de esporozoítos que, após o rompimento do oocisto maduro, caem na hemocele. Os esporozoítos que penetram nas glândulas salivares dão continuidade ao ciclo a partir de um novo repasto em um hospedeiro vertebrado suscetível (VALKIŪNAS, 2005).

A ave é infectada após a picada do mosquito, momento em que ocorre a inoculação de esporozoítos que penetram nas células do hospedeiro vertebrado. Nas aves, o ciclo dos plasmódios pode ser dividido em merogonia exo-eritrocítica, merogonia eritrocítica e gametogonia. A merogonia exo-eritrocítica é dividida em merogonia primária (pré-eritrocítica) e secundária (pós-eritrocítica). A merogonia exo-eritrocítica secundária inclui várias gerações de merontes, chamados de fanerozoítos (VALKIŪNAS, 2005).

Os esporozoítos injetados pelo mosquito vetor formam a primeira geração de esquizontes exo-eritrocíticos (criptozoítos), que se multiplicam por esquizogonia nas células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) da camada endotelial dos capilares cerebrais, hepáticos, esplênicos, renais e demais tecidos. Os criptozoítos induzem a segunda geração de esquizontes exo-eritrocíticos primários (metacriptozoítos) nas células do SFM dos tecidos. Os metacriptozoítos são semelhantes aos criptozoítos, mas geralmente possuem um número maior de merozoítos (VALKIŪNAS, 2005).

Alguns merozoítos são liberados dos metacriptozoítos e invadem os eritrócitos da circulação periférica transformando-se em trofozoítos, que se diferenciam em

gametócitos. Outra parcela desses merozoítos inicia a geração seguinte de metacriptozoítos nos tecidos, com a formação de fanerozoítos, constituindo a merogonia exo-eritrocítica secundária. A maturação da primeira geração de fanerozoítos geralmente coincide com o pico de parasitemia e a parasitemia é mantida na fase crônica da infecção através da manutenção dos fanerozoítos nos tecidos e dos merozoítos nos esquizontes eritrocíticos. Os esquizontes eritrocíticos contêm pigmentos granulares de coloração dourada, marrom ou preta, que se agrupam nos esquizontes maduros. Esse pigmento é um produto insolúvel resultante do processo de degradação da hemoglobina pelo *Plasmodium*, conhecido como hemozoína (figura 1) (VALKIŪNAS, 2005). Hepatomegalia e esplenomegalia devido à deposição de hemozoína acumulada em macrófagos nesses órgãos e anemia são duas características envolvidas na patologia das infecções causadas por *Plasmodium* spp. No entanto, o desfecho da infecção pode ser variável de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro, a presença de infecções concomitantes, deficiências imunológicas ou estresse (ATKINSON *et al.*, 1995). Além disso, sabe-se que cepas distintas da mesma espécie do parasito determinarão diferentes graus de virulência. A infecção por *Plasmodium juxtannucleare* em galinhas, por exemplo, já foi caracterizada por diferentes autores como uma doença branda, subclínica e com baixas parasitemias (KRETTLI, 1972; SILVEIRA *et al.*, 2009b). No entanto, essa mesma espécie de *Plasmodium* foi responsável por surtos de alta mortalidade e doença grave em pinguins (*Spheniscus demersus*) em um cativeiro na África do Sul (GRIM *et al.*, 2003) e em faisões (*Crossoptilon comprises*) em um zoológico japonês (MURATA *et al.*, 2008). Essa variação na patogenicidade tem sido alvo de estudos que avaliam experimentalmente as relações entre parasito e hospedeiro. Contudo, a dificuldade de obtenção e manutenção de aves doadoras e de aves receptoras suscetíveis restringe a execução desse tipo de estudo a plasmódios de aves domésticas, como *P. gallinaceum*, *P. durae*, *P. lophurae*, *P. hermani* e *P. juxtannucleari* (AL DABAGH, 1961; BENNETT *et al.*, 1966; GARNHAM, 1966; KRETTLI, 1972; PERMIM & JUHL, 2002; WILLIAMS, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2009a,b; MACCHI *et al.*, 2011). Os estudos que abordam a malária aviária em populações silvestres, principalmente em animais de vida livre, não elucidam claramente a patogenia das infecções por *Plasmodium* spp. Isso porque geralmente as aves naturalmente infectadas encontram-se na fase crônica da infecção, em que a parasitemia é baixa e o quadro patológico raramente é grave (VALKIŪNAS, 2005).

Com isso, a patogenia da malária aviária nas populações silvestres, principalmente na fase aguda da infecção, ainda é pouco conhecida.

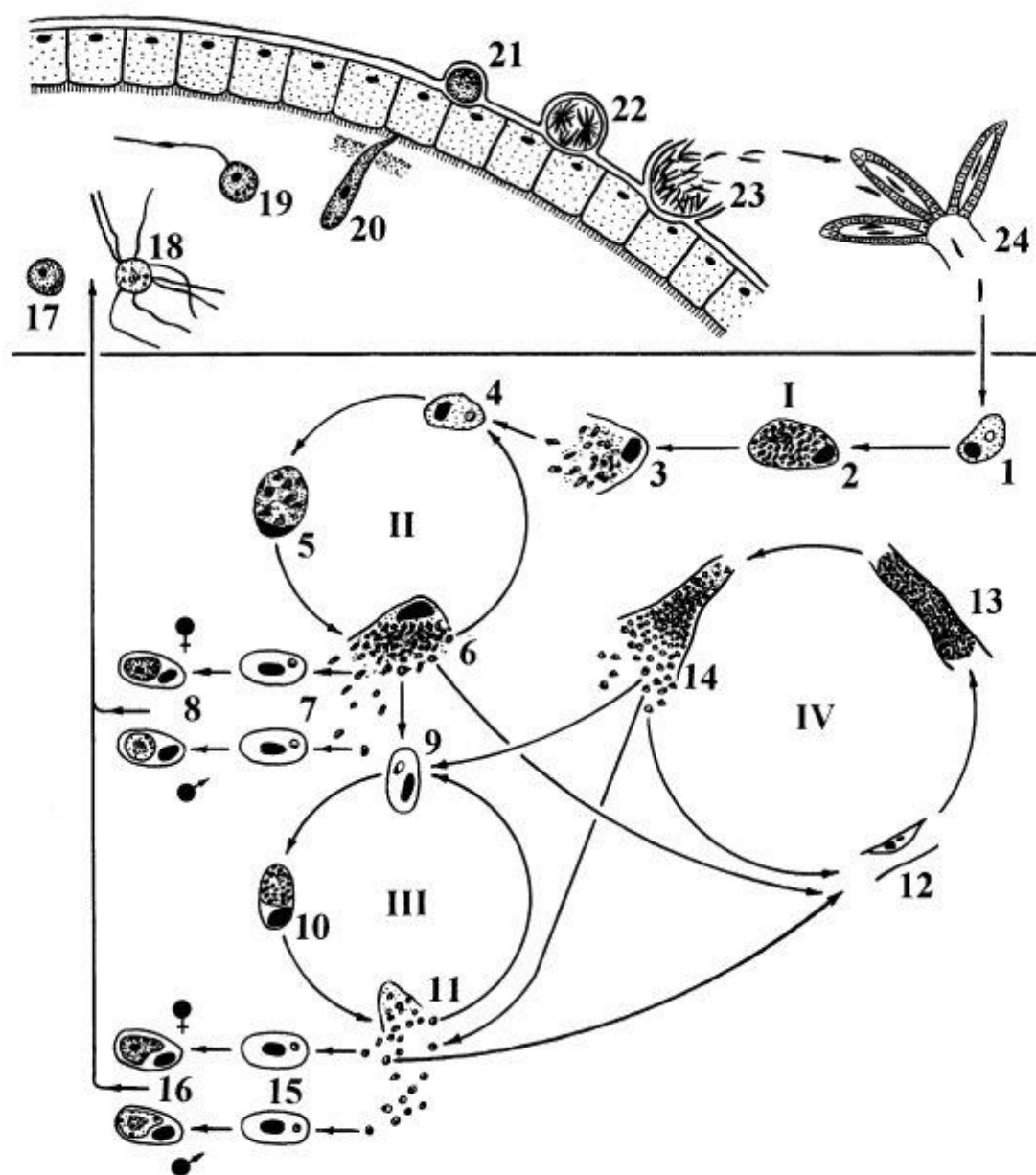


Figura 1. Representação genérica do ciclo de espécies de *Plasmodium* de aves (*P. relictum* como exemplo): acima no vetor e abaixo na ave; I, II – merogonia exo-eritrocítica; III – merogonia eritrocítica; IV – merogonia exo-eritrocítica secundária; 1 – esporozoíto em célula reticuloendotelial; 2, 3 – 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 peritrófica; 21 – oocisto jovem; 22, 23 – esporogonia; 24 – esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. (VALKIŪNAS, 2005).

1.2.2. *Haemoproteus* spp. (Kruse, 1890)

Os parasitos do gênero *Haemoproteus* pertencem à família Haemoproteidae. As características dessa família compreendem o desenvolvimento de gametócitos em eritrócitos. A reprodução sexuada ocorre em insetos hematófagos das famílias Ceratopogonidae e Hippoboscidae (VALKIŪNAS, 2005). O ciclo no inseto vetor é semelhante ao descrito para *Plasmodium* spp. Os esporozoítos resultantes da reprodução sexuada e da esporogonia nos hospedeiros invertebrados são as formas infectantes para as aves.

Após o repasto, os esporozoítos contidos na glândula salivar do inseto vetor entram em contato com a circulação do hospedeiro vertebrado, multiplicam-se por merogonia e formam merontes (ou esquizontes) exo-eritrocíticos repletos de merozoítos. Os merontes são, geralmente, encontrados nos tecidos pulmonares, esplênicos, hepáticos, renais (ATKINSON *et al.*, 1986; VALKIŪNAS, 2005). Em algumas espécies de *Haemoproteus* ocorre uma esquizogonia secundária, com o desenvolvimento de megalomerontes nas células endoteliais de capilares e nos miofibroblastos das musculaturas esquelética e cardíaca. Os megalomerontes das células musculares são relativamente maiores do que os esquizontes das células hepáticas. Os merozoítos, após a segunda geração de esquizogonia exo-eritrocítica, rompem os megalomerontes e invadem os eritrócitos, onde se diferenciam em gametócitos. Geralmente ocorrem pelo menos duas gerações de esquizontes teciduais antes do aparecimento de gametócitos nos eritrócitos da circulação periférica. (VALKIŪNAS, 2005). No ciclo eritrocítico são visualizadas apenas gametócitos, com produção de pigmentos de hemozoína (VALKIŪNAS, 1997; ATKINSON & VAN RIPER III, 1991) (figura 2).

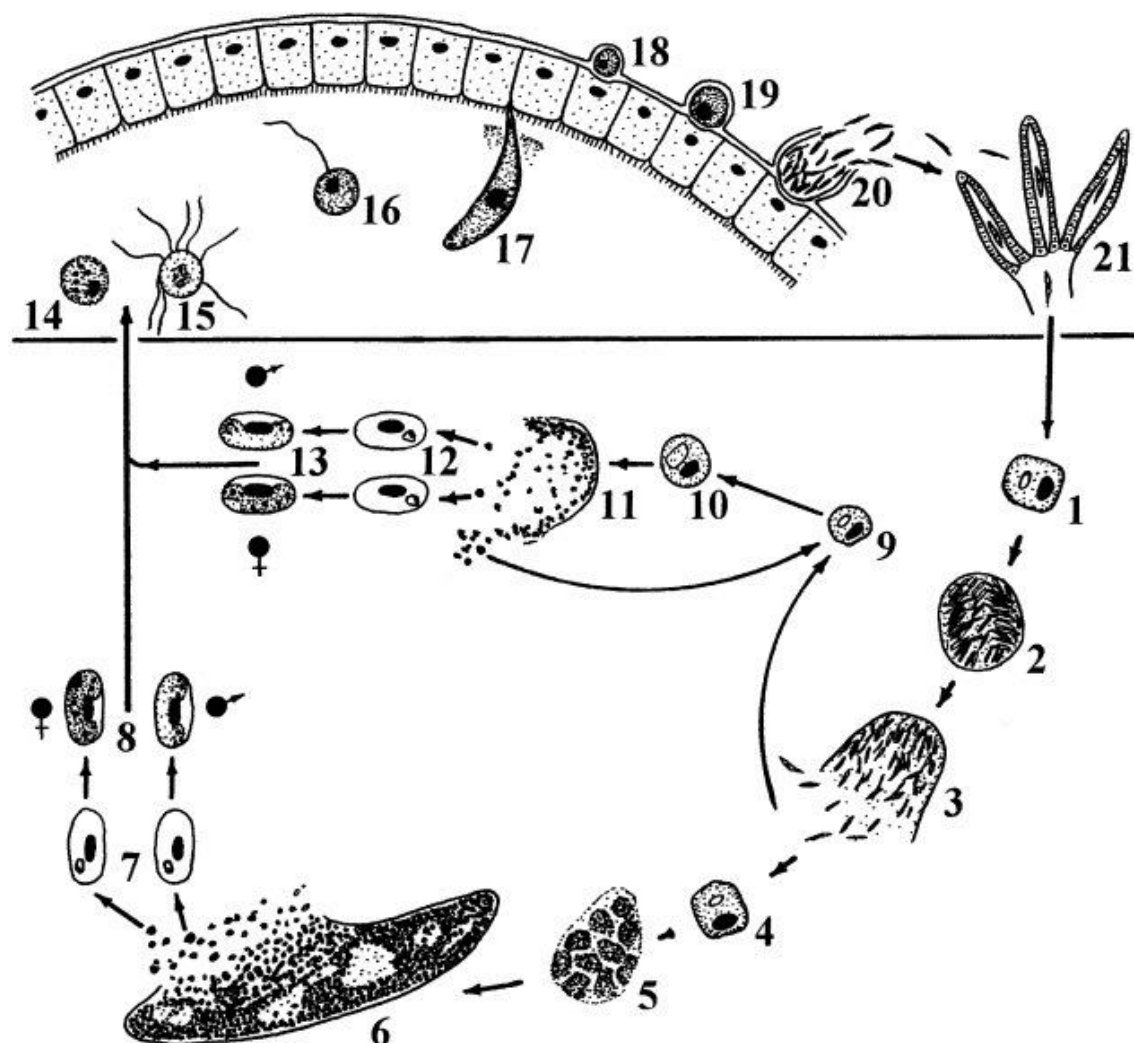


Figura 2. Representação genérica do ciclo de espécies de *Haemoproteus* de aves (*H. mansonii* como exemplo): acima no vetor, abaixo na ave: 1 – esporozoíto em célula endotelial; 2, 3 – merontes exo-eritrocíticos de primeira geração, com merozoítos alongados; 4 – merozoítos em célula endotelial; 5, 6 – 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 – esporozoíto nas glândulas salivares do vetor. (VALKIŪNAS, 2005).

Alguns autores consideram as espécies de *Haemoproteus* mais específicas em relação a seus hospedeiros vertebrados (BENNETT & CAMPBELL 1972; PEIRCE & ADLARD 2005; SAVAGE & GREINER 2004) quando comparadas às demais espécies de hemosporídeos, como os do gênero *Plasmodium*.

A gravidade e a presença de sinais clínicos em animais com infecções por *Haemoproteus* spp. frequentemente são associadas a altos níveis de parasitemia (GARNHAM 1966; ATIKINSON & VAN RIPER III 1991). Já foi encontrada a ocorrência de surtos com doença grave e morte de pombos (*Columba livia*) decorrentes da infecção por *Haemoproteus columbae* (RESENDE *et al.*, 2001; SOL *et al.*, 2003). No entanto, *H. columbae* geralmente é reportado como um hemoparasito comumente encontrado em pombos, apresentando uma infecção de curso crônico e sem sinais clínicos debilitantes ou fatais (AHMED & MOHAMMED, 1978a; VALKŪNAS, 2005). Assim como ocorre com os plasmódios aviários, o conhecimento sobre a patogenia das infecções por *Haemoproteus* ainda apresenta diversas lacunas (BRAGA *et al.*, 2011).

1.3. Importância das infecções por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. na conservação da biodiversidade

O Brasil abriga uma das maiores riquezas de aves do planeta (SICK, 1997), e os registros mais recentes estimam a ocorrência de mais de 1.800 espécies (CBRO, 2011). Contudo, há expectativa de uma diversidade maior, com alguns endemismos e, eventualmente, espécies ainda não descritas. Os inventários ornitológicos no Brasil estão sendo construídos e estão longe de refletir a real diversidade de aves do país, pois ainda sabe-se muito pouco sobre a riqueza de espécies em alguns biomas, como Cerrado, Amazônia e Pampa (SILVEIRA & OLMOS, 2007; PILLAR *et al.*, 2009). Os inventários mais completos são do bioma Mata Atlântica (SICK, 1997; SILVEIRA & OLMOS, 2007).

Assim como a riqueza ornitológica, a diversidade e a riqueza dos hemoparasitos em aves desses biomas pouco explorados também não são muito conhecidas. Considerando que a prevalência de hemoparasitos varia de acordo com a distribuição de seus hospedeiros, investigar a ocorrência desses parasitos nas aves silvestres em diferentes biomas torna-se uma etapa importante dentro de programas de monitoramento e conservação da biodiversidade (BRAGA *et al.*, 2011). Pesquisas sobre biologia e ecologia de aves silvestres, com o maior entendimento sobre a ocorrência e distribuição geográfica de hemoparasitos e das interações parasito-hospedeiro também são fundamentais. Além disso, tais estudos podem elucidar alguns eventos ecológicos, uma vez que esses parasitos são apontados como fator importante na extinção local de

algumas espécies (VAN RIPER III *et al.*, 1986; FALLON *et al.*, 2005; FELDMAN *et al.*, 1995). A extinção de espécies hospedeiras pode ser o resultado do efeito direto de espoliação que os parasitos exercem e da influência indireta através de alterações nas dinâmicas populacionais de seus hospedeiros como, por exemplo, o aumento da suscetibilidade à predação (ENDLER, 1986; FRANK, 1996; BELL, 1997; DAY, 2001; MOLLER & NIELSEN, 2007).

O efeito do parasitismo na relação presa-predador foi demonstrado por Temple (1986) em um estudo clássico, em que foi utilizado um único falcão-de-cauda-vermelha (*Buteo jamaicensis*) como predador e um grupo de pequenos roedores como presas. Nesse estudo Temple foi demonstrado que as presas possuíam uma taxa de parasitismo significativamente maior do que os indivíduos não predados. Isso pode ocorrer porque altos níveis de parasitismo reduzem consideravelmente o *fitness* e o reflexo de fuga do hospedeiro, deixando-o mais suscetível à predação (DIECKMANN, 2002; ARRIERO & MOLLER, 2008). O parasitismo pode também influenciar negativamente nos eventos de recolonização periódica e de dispersão, afetar a seleção sexual, a coloração de plumagem e a reprodução (RICKLEFS, 1992; DEVICHE *et al.*, 2001).

Diversas pesquisas em diferentes regiões do mundo têm demonstrado a prevalência e a ocorrência de hemoparasitos aviários (GREINER *et al.*, 1975; BENNETT & SOUZA, 1980; YOUNG *et al.*, 1993; MURATTA *et al.*, 2002; VALKIUNAS *et al.*, 2004; LOBATO, 2007; FECCHIO, 2011), incluindo estudos conduzidos por nosso grupo no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2005; BELO *et al.*, 2009; BRAGA *et al.*, 2011; BELO *et al.*, 2011; MOTTA, 2011; LACORTE *et al.*, 2013). Mas, apesar da importância de estudos de hemoparasitos em aves, pouco é conhecido sobre sua ocorrência em determinadas regiões brasileiras como na região amazônica do Médio Solimões (Rio Amazonas, Brasil). Essa região é considerada de grande importância, por ser local de nidificação de algumas espécies de aves aquáticas migratórias, como *Rynchops niger* e *Phaetusa simplex*.

1.4. A Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM)

A RDSM foi a primeira unidade de conservação desta categoria implantada no Brasil. Segundo o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), a RDS é

uma categoria que contempla a permanência de moradores dentro dos limites da Unidade de Conservação (UC).

Para que fosse possível a implantação da RDSM, foi elaborado um Plano de Manejo com base no resultado de pesquisas sociais e biológicas pelo período de cinco anos (1991-1996). Nele constam as normas para uso sustentável dos recursos naturais, definidas com base nos resultados das pesquisas e das negociações realizadas com as populações de moradores e usuários da Reserva e com as principais organizações sociais atuantes na área.

A RDSM é delimitada pelos rios Solimões e Japurá, e pelo Auati-Paraná, um braço do Solimões que deságua no curso médio do Japurá. Para a execução do projeto, essa grande área foi subdividida em duas partes: uma Área Focal, com cerca de um sexto da área total (260.000 ha), e uma Área Subsidiária complementar. A Área Focal está separada da Área Subsidiária pelo Paraná do Aranapu, outro braço do rio Solimões que deságua no Japurá (figura 3) (SCM, 1996).

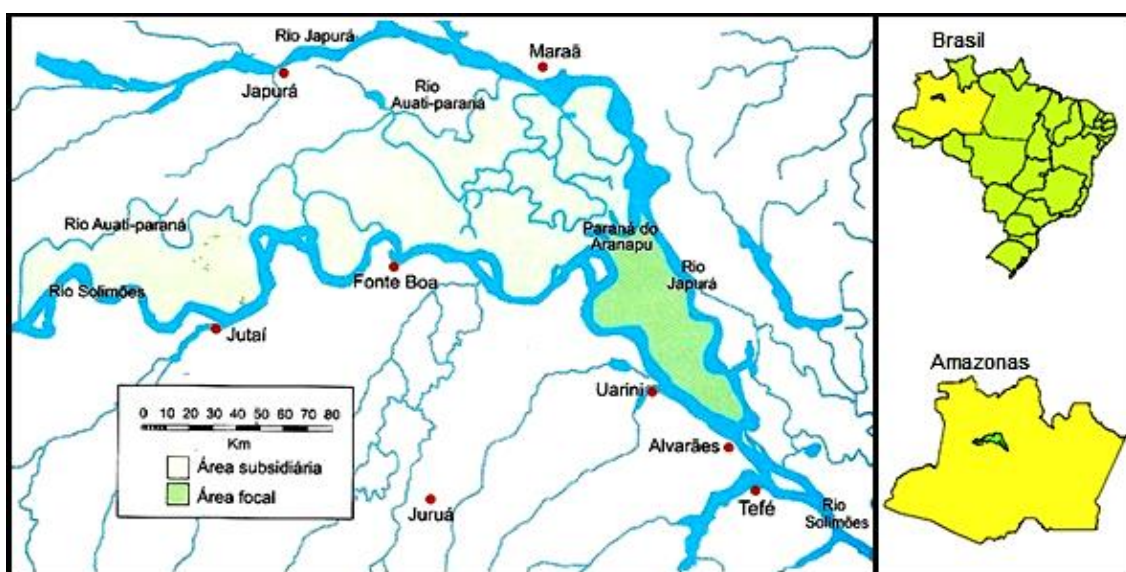


Figura 3. Representação das áreas focal e subsidiária da RDSM. (SCM, 1996).

A maioria das pesquisas realizadas é desenvolvida somente na Área Focal da RDSM. Nessa região, a densidade humana é menor do que em muitas outras áreas da Amazônia: uma família, em média, para cada 950 hectares (AYRES, 1993). A RDSM junto com a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã e com o Parque Nacional do Jaú forma o maior corredor contíguo de floresta tropical de 6,5 milhões de hectares, oficialmente protegido, compondo um Sítio Natural do Patrimônio Mundial, (UNESCO/IUCN).

A ocupação humana moderna de Mamirauá data do início do século passado. Antes dessa ocupação, a região era habitada por diversos grupos indígenas, dentre os quais os Omágua predominavam. A população ameríndia foi, em sua maioria, dizimada pelas guerras e doenças introduzidas com a colonização e os indígenas remanescentes foram incorporados à sociedade colonial pelo processo de miscigenação induzido pelo governo português. Atualmente, mesmo as poucas comunidades indígenas existentes na região, duas delas localizadas na área focal, têm forte grau de miscigenação, tanto cultural quanto biológica (SCM, 1996).

No início do século XX, a queda da borracha promoveu o crescimento do número de assentamentos modernos na região do médio Solimões, fundados principalmente por comerciantes e trabalhadores que tinham abandonado as regiões de extração de seringa localizadas a oeste da região. A partir dos anos setenta, iniciou-se um processo de estruturação social dos assentamentos da região, promovido pela igreja católica e seguindo o modelo de comunidades de base. O termo "comunidade", adotado pela maioria dos assentamentos da região, refere-se às localidades que adotaram a proposta da igreja, posteriormente apoiada por diversas instituições de extensão rural, e que possuem uma liderança política eleita pelos moradores. Atualmente, a área da RDSM está dividida em nove setores políticos: Ingá, Liberdade, Tijuca, Mamirauá, Horizonte, Boa União, Aranapu, Barroso e Jarauá. O centro urbano mais próximo é Tefé (3°20'57'' S; 64°54'37'' W), a cerca de 50 km de distância (SCM 1996).

O Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSMM), vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), criado em maio de 1999, através de convênios com o Governo do Estado do Amazonas e da intervenção da Secretaria de Desenvolvimento Sustentável (SDS), faz a co-gestão da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (1,12 milhão de hectares) e da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã (2,31 milhões de hectares). A sede do IDSMM está localizada no município de Tefé (674 km de Manaus), Amazonas. A Praia do Meio, no Setor Horizonte (S 2° 44', W 65° 14'), da RDSM, é um banco de areia que surge no Rio Solimões na época da vazante (julho-agosto) e seca (setembro-outubro). Algumas características fazem com que essa praia seja um ponto importante de conservação de aves aquáticas e quelônios dentro da RDSM. Por ser uma das praias mais altas da reserva, possui um dos maiores tempos de exposição durante a seca e essa característica pode ser o aspecto que favoreça a ocorrência de uma das maiores densidades de

colônias reprodutivas de aves nessa região específica, quando comparada a outros pontos da RDSM (RAEDER, 2003).

1.5. Aves migratórias da ordem Charadriiformes na RDSM

As duas espécies de aves amostradas nesse estudo, *P. simplex* e *R. niger*, pertencem à ordem Charadriiformes, subordem Lari, família Laridae. A ordem Charadriiformes é subdividida em três subordens, Charadrii, Alcae e Lari, e 18 famílias, reunindo a maioria das aves marinhas, com mais de 350 espécies de aves que habitam regiões costeiras e continentais (PETERS, 1934; DEL HOYO *et al.*, 1996; SICK, 1997). O desenvolvimento pós-embrionário dessas aves é considerado precocial (nidífugo), pois os filhotes dessa ordem nascem com os olhos abertos e são cobertos de penugem natal (neossoptiles), possuindo habilidade para correr logo que saem do ovo. São aves aquáticas que geralmente nidificam no solo, em praias e locais abertos, em colônias mistas com aves de diferentes espécies e com quelônios (SICK, 1997; RAEDER, 2003).

1.5.1. *Phaetusa simplex* (Gmelin, 1789)

Conhecida popularmente como gaivota-trinta-réis ou trinta-réis-grande, pertence à família Laridae (figura 4).



Figura 4. *P. simplex*: à esquerda, ninhegos; à direita, indivíduo adulto. (Foto: Bianca Bernardon).

Espécie migratória, considerada residente no Brasil, é encontrada ao longo das margens de grandes rios da região amazônica, como o Rio Amazonas (denominado Solimões, no estado do Amazonas) e tributários (SICK, 1997; CEMAVE, 2013).

Nidificam em colônias numerosas, em locais abertos, como praias de rios e lagos, e em bancos de areia, junto com *R. niger*. A nidificação ocorre na época de vazante e seca, quando há diminuição do nível das águas, entre setembro e novembro ou dezembro. Sua área de ocorrência abrange a região meridional da Argentina até o Uruguai e, fora da época reprodutiva, as áreas costeiras e de estuários (SICK, 1997). A distribuição geográfica dessa espécie está representada na figura 5.

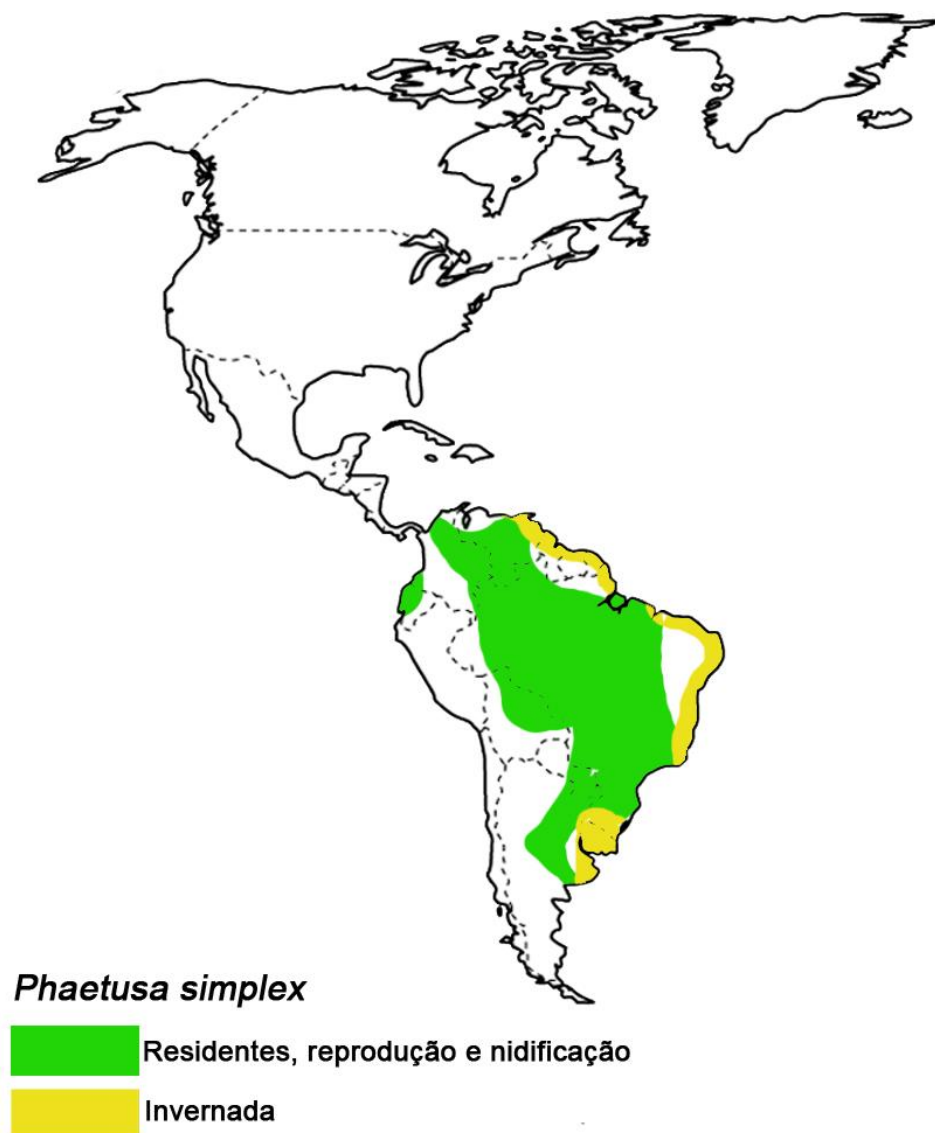


Figura 5. Mapa de distribuição e ocorrência de *P. simplex*: as áreas marcadas de verde representam regiões de reprodução e nidificação, e também sinaliza a distribuição de uma parcela de aves que não realiza migração anual, sendo considerada residente. As regiões marcadas de amarelo foram indicadas, por diferentes autores, como zona de descanso e invernada da espécie. Esse mapa foi elaborado conforme as informações contidas nas diferentes fontes bibliográficas que foram referidas no texto.

1.5.2. *Rynchops niger* (Linnaeus, 1758)

Ave migratória conhecida popularmente por talha-mar ou corta-água, pertence, assim como *P. simplex*, à família Laridae (figura 6) (AVIBASE, 2013).



Figura 6. *R. niger*: acima, ninhegos; abaixo, indivíduo adulto durante a coleta de dados biométricos. (Foto: Bianca Bernardon).

Tipicamente, a migração das aves dessa espécie ocorre entre setembro e novembro, do norte da América do Norte até o sul dos Estados Unidos, América do Sul e Caribe (BURGER & GOCHFELD, 1990; HAMMERSON & CANNINGS, 2006). Espécie bastante ativa durante os períodos noturnos, que durante o período diurno repousa em praias, mangues e bancos de areia de grandes rios e lagos (figura 7).



Figura 7. Adultos de *R. niger* durante o período de repouso na ponta da Praia do Meio. (Foto: Bianca Bernardon).

Apresenta um comportamento peculiar de alimentação, em que posiciona seu bico rente à água, constantemente aberto enquanto voa, mergulhando apenas a mandíbula, até capturar os peixes, que são a base de sua alimentação. Seu nome popular, corta-água ou talha-mar, deriva desse comportamento. A nidificação dessa espécie ocorre, principalmente, na areia, em praias marinhas e de água doce, entre abril e outubro. Formam colônias de reprodução numerosas e mistas, próximo a colônias de gaivotas, incluindo *Phaetusa simplex*. Machos e fêmeas cuidam dos ovos, até o momento da eclosão, que ocorre entre 21 a 31 dias de incubação (BURGER & GOCHFELD, 1990; HAMMERSON & CANNINGS, 2006).

Sua área de ocorrência abrange estuários da região norte até o Rio Grande do Sul, bem como na Argentina, Uruguai, Peru, Venezuela, Guiana. (BELTON, 1984; ROSÁRIO 1996; SICK, 1997; BRANCO, 2000; BRANCO & FRACASSO, 2005; MASCARELLO *et al.*, 2005; BARBIERI, 2007). Na América do Norte, *R. niger* pode ser encontrada nas costas do Atlântico e do Pacífico (figura 8).

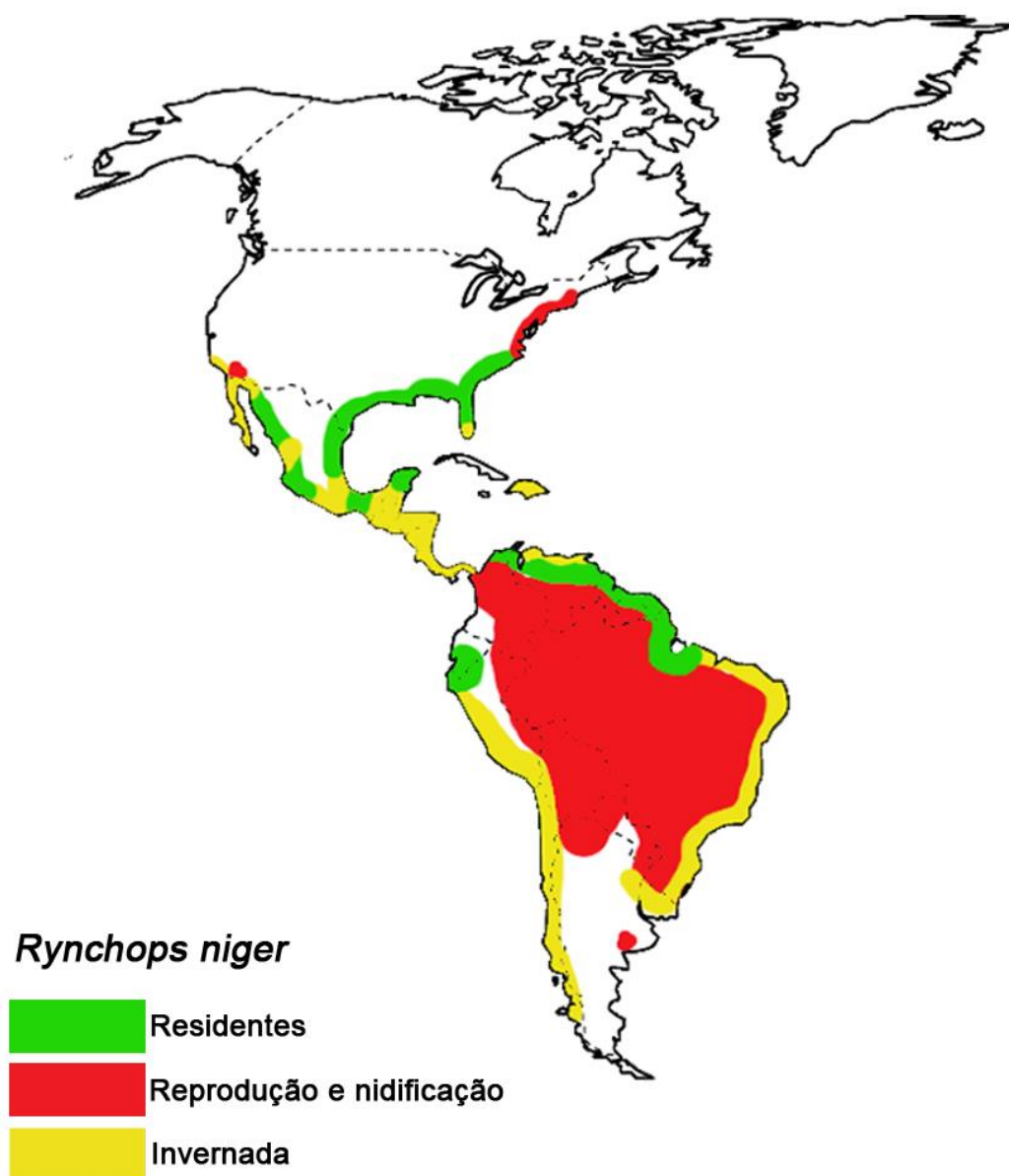


Figura 8. Mapa de distribuição e ocorrência de *R. niger*: as áreas marcadas de verde representam regiões onde foram registradas a ocorrência de populações residentes. A área em vermelho representa os locais de reprodução e nidificação, e a amarela as regiões de invernada e descanso. Esse mapa foi elaborado conforme as informações contidas nas diferentes fontes bibliográficas que foram referidas no texto.

Tanto *R. niger* quanto *P. simplex* possuem alto valor cinegético na região do médio Solimões, na Amazônia brasileira, sofrendo grandes perturbações antrópicas, principalmente através da predação dos ninhos para consumo dos ovos. Esse aspecto é um ponto crítico que torna as duas espécies bastante vulneráveis durante o período reprodutivo (RAEDER, 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O monitoramento das aves aquáticas nas praias no Rio Solimões na região da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSDM) foi proposto em 2011 e desde então investiga os padrões de migração das espécies-alvo, através do levantamento anual dos parâmetros populacionais e informações indiretas sobre mortalidade. Portanto, a incorporação de informações sobre a ocorrência de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. nessas aves pode ser um importante indicador de variações nas dinâmicas populacionais, reforçando os dados de monitoramento.

A geração de dados acerca da ocorrência de hemosporídeos em *P. simplex* e em *R. niger* poderá fornecer informações inéditas para subsidiar programas de monitoramento para aves na região do médio Rio Solimões. Além disso, a característica migratória dessas aves justifica a relevância do conhecimento sobre a diversidade de *Plasmodium* e de *Haemoproteus* que circula entre as populações avaliadas, tema ainda não explorado. As aves migratórias aqui avaliadas, uma vez parasitadas, podem representar uma fonte potencial para a dispersão de infecções para demais aves suscetíveis, em diferentes regiões do mundo, devido à grande abrangência de suas rotas de migração, que incluem toda a costa litorânea e regiões continentais da América do Sul e parte da América do Norte, e à simpatria com outras espécies de aves, sendo algumas também migratórias. Essa abordagem poderá possibilitar ainda a identificação de espécies novas, assim como de outros gêneros de hemoparasitos aviários menos prevalentes, como *Trypanosoma* spp. e filarídeos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar a ocorrência e a diversidade de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em aves silvestres migratórias, *R. niger* e *P. simplex*, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Médio Solimões, Estado do Amazonas.

3.2. Objetivos específicos:

- i. Diagnosticar a infecção por *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. em *R. niger* e *P. simplex* a partir da análise microscópica de esfregaços sanguíneos e da análise molecular por PCR simples que amplifica o gene SSU mitocondrial.
- ii. Caracterizar a diversidade genética dos isolados a partir da análise morfológica (microscopia) e do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b.
- iii. Comparar a diversidade de parasitos encontrada nas aves amostradas à diversidade e à distribuição encontrada em outras espécies de aves migratórias bem como em aves silvestres no Brasil e das Américas.

4. AMOSTRAGEM

4.1. Local

O projeto foi desenvolvido em praias no Setor Horizonte da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM) ($01^{\circ}49'00''\text{S}$ e $65^{\circ}42'00''\text{W}$), no Estado do Amazonas, Brasil, através da parceria entre o Laboratório de Malária da Universidade Federal de Minas Gerais e o Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM) (figura 9).

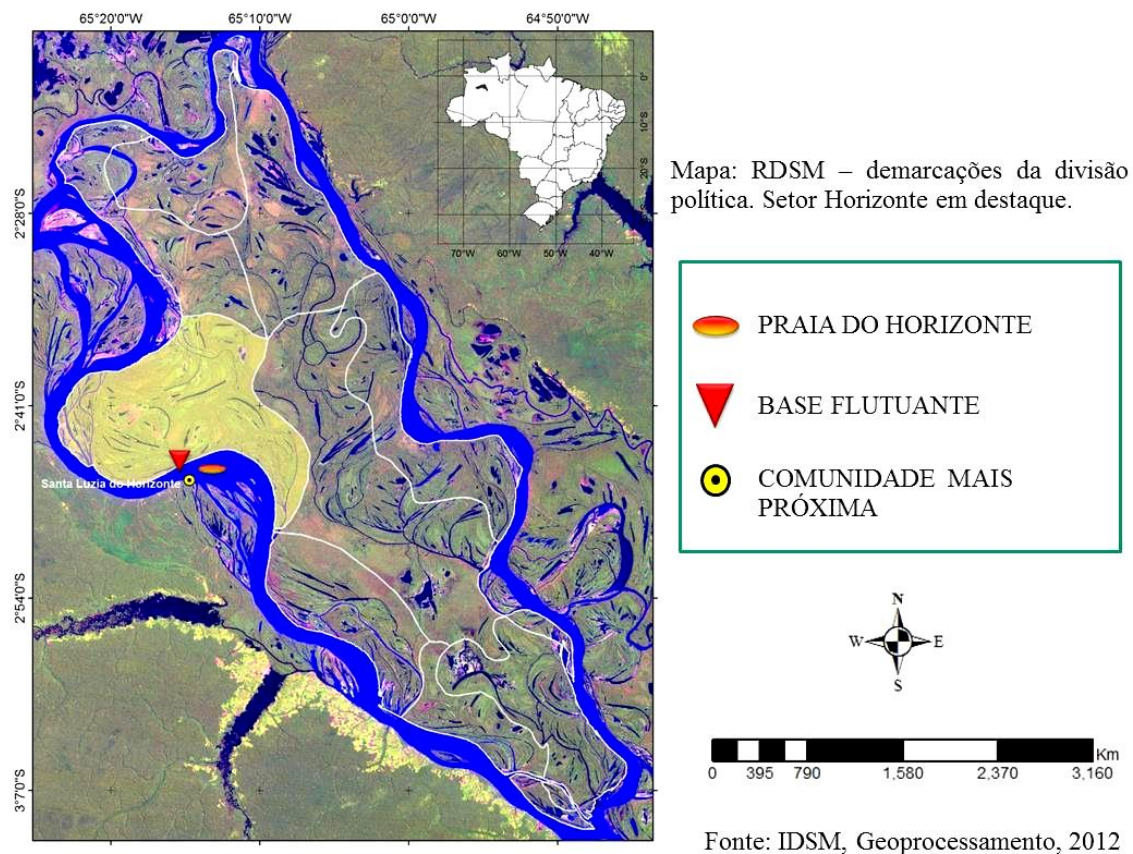


Figura 9. Mapa da RDSM. A área em amarelo representa a delimitação do setor Horizonte. A elipse representa a Praia do Meio.

4.2. Aves e esforço amostral

As aves foram amostradas entre os meses de outubro e novembro de 2012, cumprindo-se as etapas previstas no projeto intitulado “Aves em praias e plantações: aspectos migratórios, reprodutivos e pressão de caça nas Reservas de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e Amanã, Amazonas”, proposto por Bianca Bernardon, bióloga do Instituto de Desenvolvimento Mamirauá. Para incluir as coletas de sangue das aves nesse projeto, foi submetido um plano de trabalho ao Instituto Mamirauá, em Tefé, Amazonas, intitulado “Ocorrência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – Amazonas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do referido Instituto, sob o protocolo CEP IDSM 005/2012 (Anexos 1 e 2).

Indivíduos adultos e filhotes de *R. niger* e de *P. simplex* foram capturados e marcados com uma anilha metálica, conforme manual de anilhamento de aves silvestres do CEMAVE (CEMAVE/ICMBio). Os filhotes foram capturados manualmente nos ninhos para obtenção dos dados biométricos e coleta de material biológico (figura 10).



Figura 10. Coleta de sangue da veia braquial de um filhote de *R. niger* (Foto: Caroline Lima).

Para a captura das aves adultas foram utilizadas redes de neblina de 12 m de comprimento por 2,75 m de altura, com malhas de 61 mm. Cada rede era montada ao anoitecer para evitar a visualização da armadilha pelas aves (figura 11).



Figura 11. Captura noturna: retirada de indivíduo adulto de *R. niger* preso em rede de neblina. (Foto: Bianca Bernardon).

As redes eram verificadas a cada 20 minutos, no máximo, conforme sugerido por Gaunt & Oring (2010).

As capturas foram realizadas diariamente, durante 15 dias por mês, exceto nos dias de chuva, entre outubro e novembro de 2012. A amostragem foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, de 16 a 30 de outubro, foram capturados 105 indivíduos jovens, de diferentes faixas etárias (entre dias a semanas pós-eclosão) e um indivíduo adulto. Na segunda etapa, foram realizadas as capturas de 67 indivíduos adultos, entre 10 e 26 de novembro de 2012. Como os adultos de *P. simplex* possuem hábitos diurnos, apresentando baixa atividade noturna, nenhum indivíduo caiu na rede de neblina montada à noite. Uma alternativa para a captura de adultos de *P. simplex* seria o uso de redes de canhão. No entanto, a utilização desse método não é recomendada em áreas

onde existem ninhos, como é o caso da Praia do Meio. Por esses motivos, os adultos dessa espécie não foram amostrados.

4.3. Coleta de material biológico e análise das amostras

Cerca de 10 μ L de sangue foram coletados a partir de uma pequena punção na veia braquial para a confecção de dois esfregaços sanguíneos por ave capturada (figura 12). Também foram coletados aproximadamente 20 μ L de sangue para posterior extração de DNA, sendo armazenados em papel filtro e em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 300 μ L de solução de lise celular (Promega®, EUA). As amostras foram mantidas sob refrigeração até o processamento no laboratório.



Figura 12. Punção da veia braquial em adulto de *R. niger*. (Foto: Caroline Lima).

4.3.1. Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços sanguíneos foram secos ao ar, fixados em metanol absoluto e corados com solução de Giemsa 10%, pH 4. Um total de duzentos campos microscópicos (aumento de 1000X, objetiva de imersão) foi examinado em cada lâmina para verificação da presença de *Plasmodium* ou *Haemoproteus* no sangue das aves infectadas conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2005).

4.3.2. Extração de DNA a partir do sangue total

A extração de DNA a partir do sangue de amostras coletadas em campo e as análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte.

A extração de DNA a partir de sangue armazenado em solução de lise foi realizada de acordo com o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®, EUA). Os 20 µL de sangue, armazenados em microtubos contendo 300 µL de solução de lise celular (Promega®, EUA), foram homogeneizados e centrifugados. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 300 µL de solução de lise celular. O mesmo processo foi repetido até que o sobrenadante ficasse translúcido. Após o último descarte do sobrenadante, foram adicionados 1,5 µL de solução de RNase A (Promega®, EUA) e, em seguida, incubados a 37°C em banho-maria por 15 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 100µL de solução de precipitação de proteína de acordo com o kit de extração Wizard Genomic da Promega® sendo as amostras homogeneizadas por 20 segundos e centrifugadas a 13.000g por três minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 300µL de isopropanol.

Os tubos foram invertidos até a visualização do DNA e centrifugados por um minuto a 13.000 -16.000 g à temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, foram adicionados 300 µL de etanol 70% para a lavagem do sedimento e remoção de traços de sal. Os tubos novamente foram centrifugados por um minuto, a 13.000, e o líquido presente no tubo desprezado e escorrido em papel absorvente. Um volume de 50 µl de solução de reidratação de DNA foi adicionado em cada tubo para ressuspensão do DNA. O DNA permaneceu armazenado a 4°C até o momento da amplificação.

A extração do DNA a partir de sangue coletado em papel filtro foi realizada segundo o protocolo descrito por Scopel *et al.* (2004) utilizando proteinase K seguida de extração por fenol-clorofórmio.

4.3.3. Diagnóstico molecular: triagem de infecção

Em uma primeira etapa das análises, foi realizada uma triagem, em que as amostras do DNA foram processadas através da técnica de PCR (*Polymerase Chain*

Reaction) simples, com amplificação da região altamente conservada do gene mitocondrial SSU, comum entre os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. O protocolo foi executado conforme descrito por Fallon *et al.* (2003a), utilizando os seguintes iniciadores:

343 F: 5'GCTCACGCATCGCTTCT3'

496 R: 5'GACCGGTCATTTTCTTTG3'

Na reação de amplificação, cada tubo recebeu 2 µl do DNA-molde e 13 µl de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, e 50 mM KCl (PHONEUTRIA®); 2.5 mM MgCl²; 200 µM dNTP's; 0.5 U Taq DNA polimerase (PHONEUTRIA®); 0.4mM de cada iniciador e água ultra pura estéril. O programa da amplificação consistiu de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguida de anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 10 segundos. A desnaturação inicial ocorre a 94°C por 2 minutos. Seguiu-se a extensão final a 72°C por três minutos e manutenção da temperatura de 4°C, definindo, assim, a finalização da reação.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, não desnaturante, em tampão TBE 1X. Os géis de poliacrilamida foram fixados em solução de álcool etílico 10% e ácido acético 0,5%, corados em solução de nitrato de prata e os fragmentos de DNA de 154 pares de base evidenciados quando em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (SANGUINETTI *et al.*, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2005).

As amostras também foram submetidas a dois protocolos de *nested* PCR para a amplificação de regiões distintas do gene mitocondrial citocromo b (*cyt b*) de *Plasmodium* e *Haemoproteus* e realização do sequenciamento. Os protocolos de *nested* PCR são descritos abaixo.

4.3.4. PCR para sequenciamento

4.3.4.1. *nested* PCR (HELLGREN *et al.*, 2004)

Um fragmento de 480 pb do gene *cyt b* foi amplificado sob as condições descritas a seguir. A primeira reação foi realizada utilizando-se os iniciadores HaemNFI (5'AGACATGAAATATTATGGITAAG3') e HaemNR3 (5'GAAATAAGATAA GAAATACCATTC3') (HELLGREN *et al.*, 2004). 1 µl de DNA genômico submetido a uma desnaturação inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, e uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Cerca de 1µl deste produto foi utilizado em uma segunda reação, utilizando os iniciadores HaemF (5'CTTATGGTGTGCGATATATGCATG3') e HaemR2 (5'CGCTTATCTGGAGATTGTAATGGTT3') (BENSCH *et al.*, 2000), sob desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos e 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos e, em seguida 72 °C durante 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em géis de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2005). As regiões amplificadas pelos dois pares de iniciadores utilizados nesse protocolo estão ilustradas na figura 13.

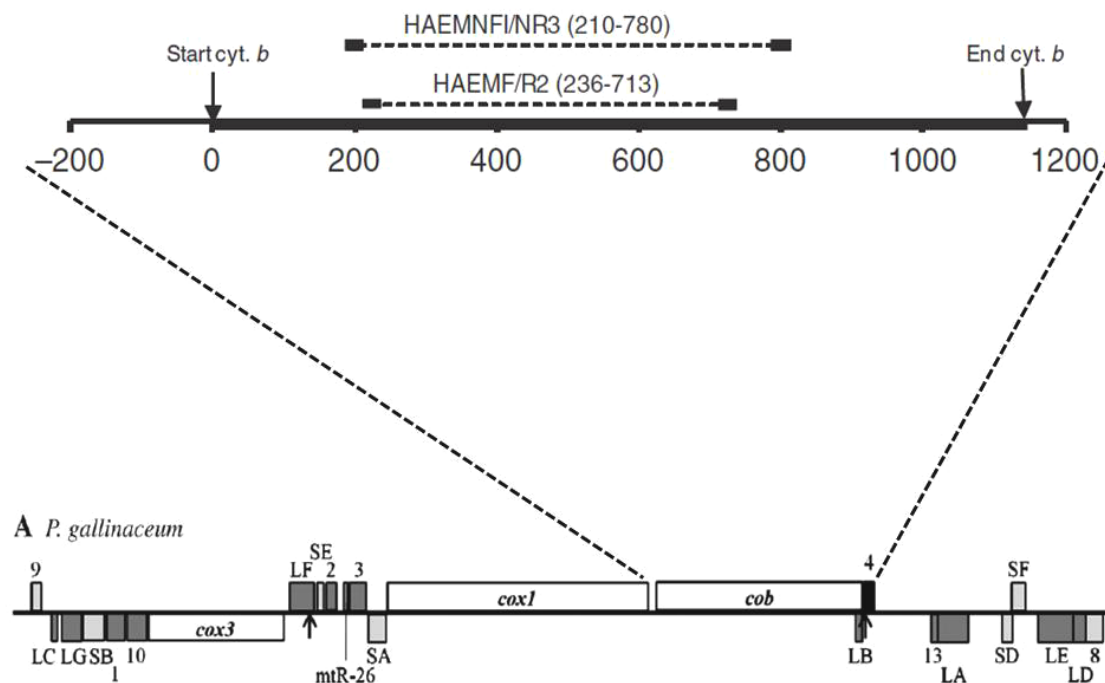


Figura 13. Desenho esquemático da região do gene mitocondrial *cyt b* de *Plasmodium/Haemoproteus* amplificada na *nested PCR*. (Adaptado de Bensch *et al.*, 2009).

Em todas as reações de PCR foi utilizado pelo menos um controle positivo, a partir de amostras extraídas de sangue de pintinhos infectados experimentalmente, com *Plasmodium gallinaceum*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou de Belo Horizonte. Um controle negativo

também foi usado, e consistia em uma mistura dos reagentes utilizados em cada reação. O uso dos reagentes como controle negativo também serviu para descartar possíveis contaminações e resultados falso-positivos. Os produtos de PCR amplificados foram selecionados para o sequenciamento dos genes *cyt b* de *Plasmodium* e *Haemoproteus*.

4.3.5. Sequenciamento da região do gene mitocondrial citocromo b

Os produtos de PCR positivos foram purificados utilizando polietileno glicol (PEG) descrito por Sambrook *et al.* (2001). Fragmentos de DNA purificados foram sequenciados usando o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems®).

As amostras foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL com um volume final de 10 µL contendo 0,2 µM do iniciador HaemF (5'CTTATGGTGTCTGATATATGCATG3') e 0,2 µM do iniciador HaemR2 (5'CGCTTATCTGGAGATTGTAATGGTT3'), a 1 µM, 50 a 100 ng de DNA, usando para sequenciamento o BigDye Terminator® v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) e água ultra pura suficiente para completar o volume. As sequências de DNA obtidas foram alinhadas usando o algoritmo CLUSTAL W executado no programa MEGA versão 5 (TAMURA *et al.*, 2011) e editadas usando o programa DNA Baser Sequence Assembler versão 4.7.0 (<http://www.dnabaser.com>). As sequências editadas foram submetidas à busca por similaridade de bases com sequências já publicadas e depositadas no GenBank (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov>) e no banco genético website MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/>) que contém dados do *cyt b* da maioria das linhagens dos haemosporídeos aviários publicados.

Foram executadas análises filogenética usando o método de máxima verossimilhança (*Maximum-likelihood estimation*) implementado pelo programa RaxML (STAMATAKIS, 2006) com o modelo GTR + gamma de evolução de nucleotídeos e 1000 réplicas para *bootstrap*. O Cladograma foi visualizado e editado usando o programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Cada sequência, única ou obtida da sequência consenso entre *Forward* e *Reverse* alinhadas (contig), editadas no programa DNA Baser Sequence Assembler 3.5., foram comparadas com sequências publicadas no GenBank (2013 e 2014) e no banco de dados MalAvi (BENSCH *et al.*, 2009). O agrupamento das linhagens encontradas com as publicadas no GenBank foi realizado através do método de Máxima Verossimilhança, e

a confiança dos dados para a montagem do cladograma foi estabelecida com 1.000 réplicas de *bootstrap*, usando o programa Fig Tree 1.4.0. (<http://tree.bio.ed.ac.uk>). O grupo externo de referência foi *Leucocytozoon schoutedeni* (GALLUS06).

4.3.6. Análises estatísticas

Para as análises foi utilizado o programa Dag Stat (<http://www.biostats.com.au>), utilizando a planilha do Excel 2010 (Microsoft Office®). O teste do Qui-quadrado foi realizado para análise e comparação da frequência de infecção entre espécies e entre filhotes e adultos de *R. niger*, utilizando o programa Graph Pad Prism 6 (www.graphpad.com). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

O tamanho médio da população de aves da Praia do Meio está estimado em 600 indivíduos de cada espécie (*P. simplex* e *R. niger*). Essa informação tem como base os dados de captura obtidos em dois anos de monitoramento na Praia do Meio. Em 2012 a captura das aves de praia nesse local resultou em 1.145 indivíduos marcados com anilhas do CEMAVE/ICMBio, sendo 10 adultos e 540 filhotes de *Phaetusa simplex*, e 269 adultos e 326 filhotes de *Rynchops niger*. Em 2013, 47 adultos e 586 filhotes de *Phaetusa simplex*, e 197 adultos e 596 filhotes de *Rynchops niger* foram capturados e anilhados¹. No entanto, a amostragem realizada para a pesquisa de hemoparasitos ocorreu apenas nos últimos dois meses da temporada de captura e, com isso, contemplou uma parcela menor da população de cada uma das duas espécies. Assim, entre outubro e novembro de 2012 foram capturadas 173 aves na Praia do Meio, na RDSM. Dessas 173 aves, foram colhidas amostras de sangue para a confecção dos esfregaços e para a análise através de PCR. As características da amostragem estão demonstradas na tabela abaixo.

Tabela 1. Quantidade de animais capturados por espécie e faixa-etária no período entre outubro e novembro de 2012 na RDSM.

ESPÉCIE	TOTAL CAPTURADO	FILHOTES	ADULTOS
<i>Rynchops niger</i>	99	Juvenis: 31	68
<i>Phaetusa simplex</i>	74	Juvenis: 72 Ninhegos: 02	0

5.1. Detecção de hemoparasitos por microscopia óptica

Foram analisados esfregaços sanguíneos de 173 aves amostradas na RDSM. Dessas 173 amostras, 22 esfregaços possuíam apenas trofozoítos e esquizontes indicando a presença de *Plasmodium* spp. e 10 possuíam apenas gametócitos jovens e maduros indicando infecção por *Haemoproteus* spp., totalizando 32 amostras positivas

¹ Comunicação pessoal de Bianca Bernardon, IDSM, em 06 de fevereiro de 2014.

(18,5%). A figura 15 ilustra um esfregaço corado por Giemsa, evidenciando diferentes formas dos parasitos observados.

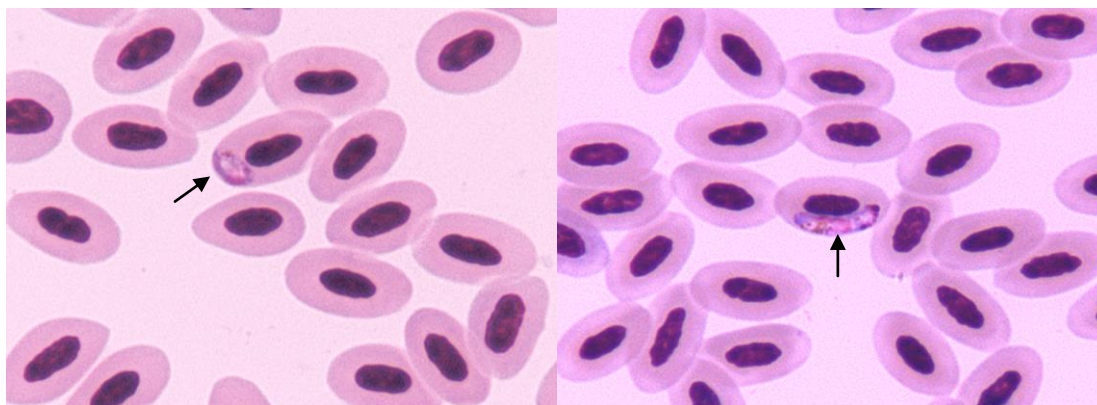


Figura 14. Esfregaço de sangue de um indivíduo adulto de *R. niger*. As setas indicam dois estágios distintos de desenvolvimento do parasito.

A comparação entre ocorrência de infecção detectada por observação microscópica para as duas espécies avaliadas foi realizada apenas entre os filhotes e ninhegos, pois não foram amostrados indivíduos adultos de *P. simplex*. Nesse caso, a frequência relativa de parasitismo ligeiramente maior em *P. simplex*, com 16,2% dos indivíduos infectados, comparado aos 16,1% da outra espécie. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,87$). A distribuição dos animais positivos na microscopia, conforme espécie e faixa-etária, e a frequência relativa de filhotes positivos por espécie, incluindo ninhegos, está apresentada na tabela 2. A diferença na frequência entre adultos e filhotes de *R. niger* infectados também não apresentou diferença significativa ($p = 0,59$).

Tabela 2. Número de indivíduos de *P. simplex* e *R. niger* amostrados e número de indivíduos positivos detectados pela observação microscópica de esfregaços sanguíneos conforme a faixa-etária.

Espécie e faixa-etária	Total capturado	Positivos	Frequência relativa de filhotes positivos por espécie (%)
<i>P. simplex</i>			
Ninhego	02	01	16,2
Filhotes	72	11	
Adultos	0	0	
<i>R. niger</i>			
Ninhego	0	0	16,1
Filhotes	31	05	
Adultos	68	15	

A parasitemia não foi calculada, pois foram visualizadas poucas formas dos parasitos nas lâminas. Em amostras de algumas aves, apenas um trofozoíto, um esquizonte ou um gametócito foi encontrado. Por isso, cada esfregaço foi explorado em sua totalidade. Entre as poucas formas de *Haemoproteus* spp. encontradas, muitas ainda estavam imaturas e não apresentavam características que possibilitassem a identificação específica dos parasitos. Em outras amostras foram encontrados apenas trofozoítos e poucos esquizontes. Merontes e gametócitos não foram visualizados, impossibilitando a caracterização específica de *Plasmodium* sp. Como muitas características morfológicas se sobrepõem em várias espécies de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, principalmente entre formas imaturas, e como podem ocorrer alterações morfológicas sutis na mesma espécie de parasito, conforme o hospedeiro vertebrado, não podemos utilizar como parâmetro um número limitado de formas para estabelecer uma identidade específica.

Foi identificado um exemplar de microfilária em um esfregaço de um indivíduo adulto de *R. niger* (figura 15). Nesse mesmo indivíduo não foi encontrado parasitismo por hemosporídeos. A microfilária foi o único parasito, além dos hemosporídeos, encontrado em todas as 173 aves.



Figura 15. Microfilária encontrada em esfregaço sanguíneo de uma ave adulta da espécie *R. niger*.

5.2. Diversidade de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.

Para avaliar a riqueza de linhagens de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. as 11 amostras positivas na PCR de triagem foram submetidas a *nested* PCR, que amplificam região do *cyt b* dos parasitos. Dessas 11 amostras, seis foram positivas pela. Para verificar possíveis falhas na detecção pela PCR de triagem, apenas as reações de *nested* PCR foram repetidas com todas as 173 amostras, a partir do DNA extraído do sangue colhido em papel filtro. Após a repetição, mais amostras foram amplificadas por *nested* PCR, e os resultados obtidos com evidenciaram 10 amostras positivas (5,78%).

Assim, a partir de 10 amostras positivas pela *nested* PCR, foram obtidas sequências de sete amostras, e três linhagens distintas foram identificadas: duas de *Plasmodium* e uma de *Haemoproteus*.

A sequência encontrada para *Haemoproteus*, depositada no GenBank como Ryni_RDSDM03 (locus KJ469133), em cinco adultos da espécie *R. niger* possui 100% de similaridade com a espécie *Haemoproteus macrovacuolaris* descrita pela primeira vez em *Dendrocygna autumnalis* na região do Departamento Casanare, Colômbia (MATTA *et al.*, 2014). As duas linhagens de *Plasmodium*, Ryni_RDSDM01 (KJ469131) e Ryni_RDSDM02 (KJ469132), encontradas nesse trabalho já foram descritas anteriormente em diferentes regiões das Américas (ISHAK *et al.*, 2008; LEVIN *et al.*, 2013; LACORTE *et al.*, 2013; MERINO *et al.*, 2008; PAGENKNOPP *et al.*, 2008).

O cladograma das sequências de *Plasmodium* e *Haemoproteus* revelou 2 clados altamente suportados, o que demonstra claramente que *Plasmodium* e *Haemoproteus* pertencem a clados diferentes. Observamos que as linhagens de *Plasmodium* infectam diferentes famílias de aves silvestres (figura 16).

A sequência Ryni_RDSDM02, encontrada em um indivíduo adulto de *R. niger* apresentou 100% de identidade com linhagens já descritas: *Plasmodium nucleophilum* (JX467689²); *Plasmodium* sp. HMA-2012 (JN819335); *Plasmodium* sp. DENPET03 (JX021474). Uma segunda linhagem de *Plasmodium*, Ryni_RDSDM01, encontrada em um indivíduo adulto da espécie *R. niger* apresentou 100% de identidade com as linhagens PHPAT01 (JX025077); *Plasmodium* sp. GHOW3489 (EU627831); *Plasmodium* sp. ChP5 (EF153642).

² As letras e números entre parênteses correspondem ao código de acesso das linhagens no GenBank.

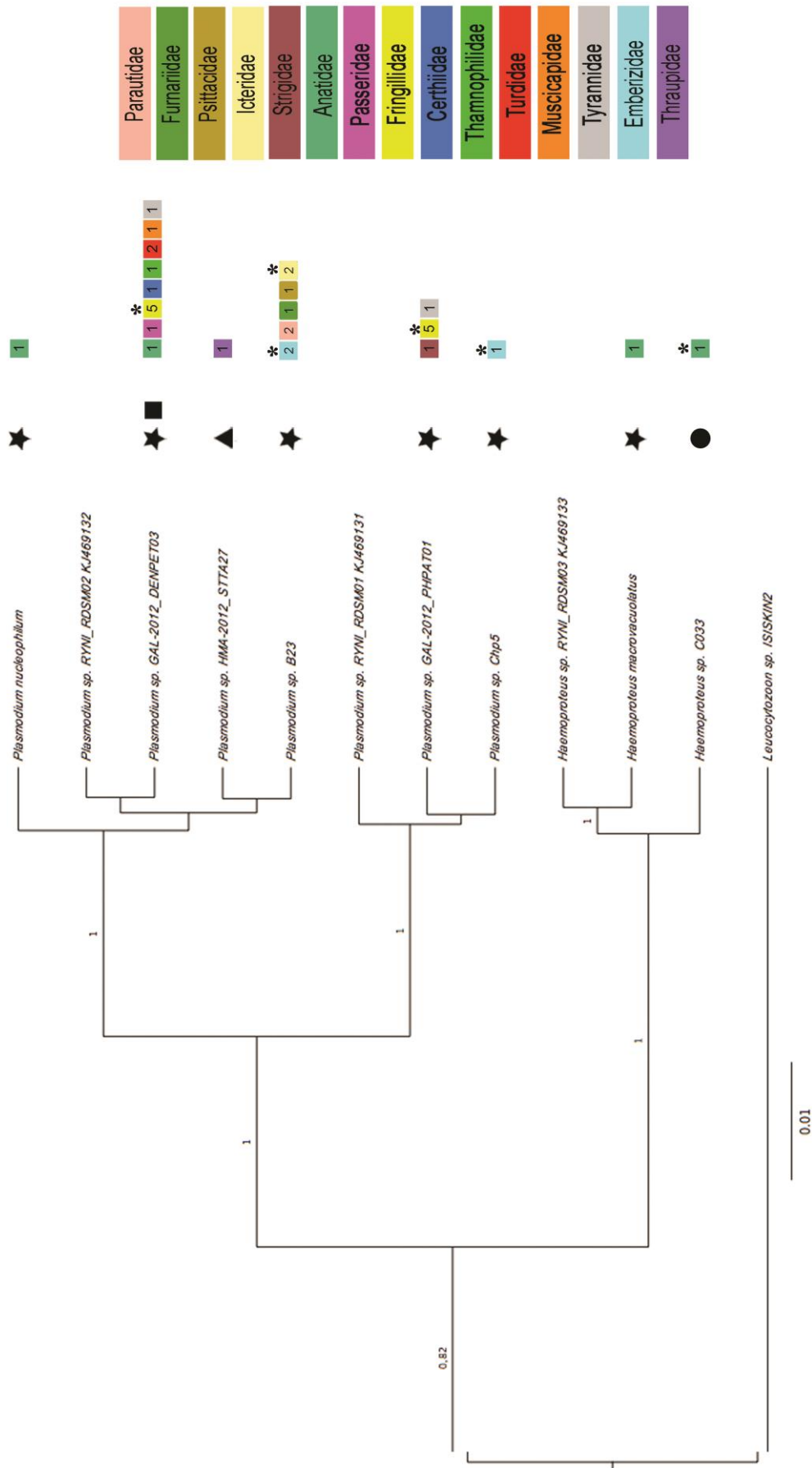


Figura 16. Cladograma das linhagens encontradas nesse estudo, identificadas com o código RDSDM seguido de uma sequência numérica, referente à ordem de captura dos animais. As formas geométricas em preto representam o continente onde cada linhagem já foi descrita (GenBank): círculo – Ásia; estrela – América o Sul; triângulo – América Central; quadrado – América do norte. Cada cor representa uma família, conforme a lista à direita, e os números contidos em cada quadrado colorido indica o número de espécies, por família, em que determinada linhagem foi encontrada. Os asteriscos indicam a ocorrência em ave migratória.

A distribuição das linhagens conforme os hospedeiros e distribuição geográfica são apresentados na tabela 4. A figura 17 aponta as áreas de ocorrência de *P. simplex* e de *R. niger* sobrepostas pelas demais regiões onde já foram descritas as duas linhagens de *Plasmodium* encontradas nas aves da RDSM.

Tabela 3. Linhagens encontradas em sete adultos de *R. niger*. A tabela mostra o grau de compatibilidade (ID = identidade) entre as sequências obtidas das amostras do presente estudo com outras sequências registradas no GenBank, bem como a localização geográficas e as espécies de aves onde essas linhagens já foram descritas.

AMOSTRA	LINHAGENS	ID (GenBank)	LOCAIS DE OCORRÊNCIA	HOSPEDEIROS
RDSM 119	<i>Haemoproteus macrovacuolaris</i>	100%	Colômbia	<i>Dendrocygna autumnalis</i>
RDSM 126				
RDSM 141				
RDSM 147				
RDSM 161				
RDSM 157	<i>Plasmodium nucleophilum</i> HMA-2012 DENPET03	100%	Brasil Costa Rica Estados Unidos Galápagos Guiana Uruguai	<i>Alopochen aegypticus</i> <i>Brasileuterus flaveolus</i> <i>Coereba flaveola</i> <i>Dendroica petrechia</i> <i>Dolichonyx oryzivorus</i> <i>Formicivora melanogaster</i> <i>Panchyramphus polychopterus</i> <i>Parula pitiayumi</i> <i>Passer domesticus</i> <i>Ramphastos dicolorus</i> <i>Ramphastos toco</i> <i>Ramphastos vitellinus</i> <i>Tangara icterocephala</i> <i>Thryothorus longirostris</i> <i>Trichothraupis melanopsis</i> <i>Turdus leucomelas</i> <i>Turdus rufiventris</i> <i>Zonotrichia capensis</i>
RDSM 118	<i>Plasmodium</i> sp. PHPAT01 (GAL-2012) GHOW3489 ChP5	100%	Brasil Chile Estados Unidos	<i>Ammodramus humeralis</i> <i>Brasileuterus flaveolus</i> <i>Bubo virginianus</i> <i>Dolichonyx oryzivorus</i> <i>Geothlypis trinchas</i> <i>Phaeomyas murina</i> <i>Phrygilus patagonicus</i>

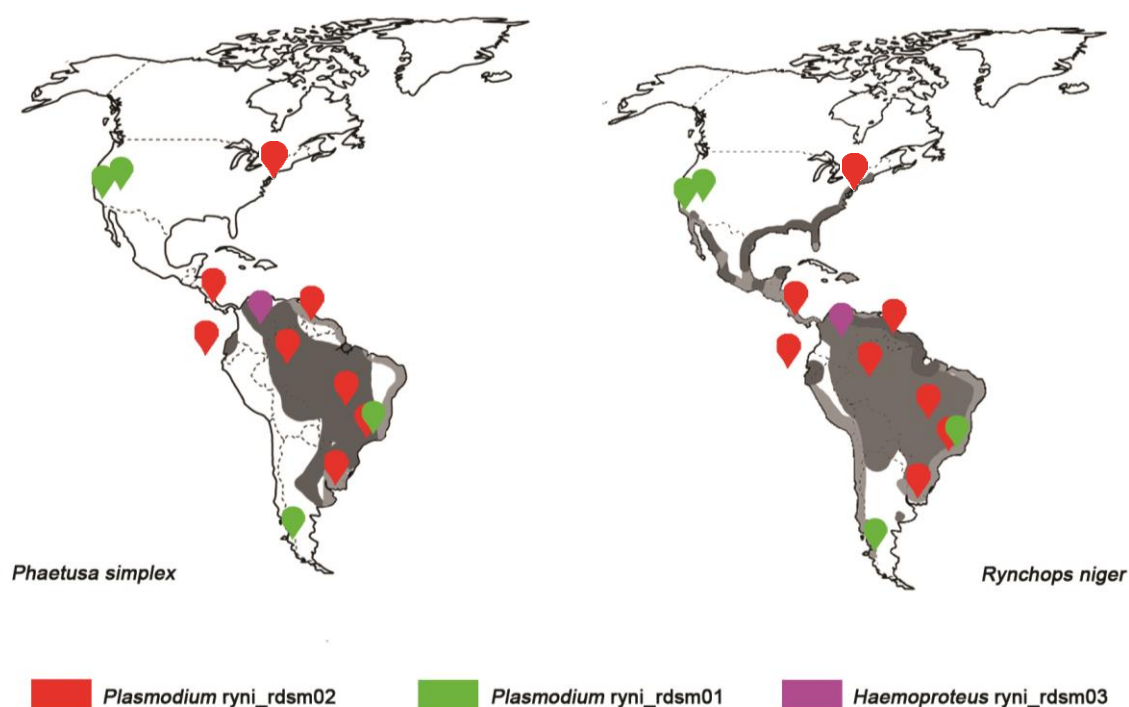


Figura 17. Mapas de ocorrência de *P. simplex* e de *R. niger* (áreas em tons de cinza). Os balões coloridos apontam as regiões onde foram encontradas as mesmas linhagens de *Plasmodium* e a de *Haemoproteus* encontradas em nosso trabalho. Os balões vermelhos indicam os pontos onde foram encontradas a linhagem RYNI_RDSM02. Os balões verdes indicam as áreas onde a linhagem RYNI_RDSM01 já foi descrita. O balão roxo indica a região do Departamento Casanare na Colômbia, local da única descrição de ocorrência de uma linhagem com 100% de similaridade genética com RYNI_RDSM03, encontrada nas cinco aves em Mamirauá.

Ainda existem poucos trabalhos sobre hemoparasitos em larídeos. Apenas oito linhagens de *Haemoproteus* já foram descritas em Charadriiformes, sendo cinco na família Laridae (tabela 4). Cinco espécies de *Haemoproteus* já foram encontradas em Charadriiformes, sendo *H. lae* a única descrita na família Laridae (VALKIŪNAS, 2005). Nessa mesma ordem também foram descritas 11 linhagens de *Plasmodium*. Duas dessas 11 linhagens foram encontradas na espécie *Larostema inca* (família Laridae), na América do Norte: LARINC01 e LARINC02. Nenhuma linhagem de *Plasmodium* foi identificada ao nível de espécie em Charadriiformes (VALKIŪNAS, 2005).

Tabela 4. Linhagens de *Haemoproteus* descritas em Charadriiformes da família Laridae.

LINHAGENS (<i>Haemoproteus</i> sp.)	OCORRÊNCIA	ESPÉCIES DE AVES	REFERÊNCIAS
CREFUR01	América do Sul	<i>Creagrus furcatus</i>	Levin <i>et al.</i> , 2011
LARCAC01	Europa	<i>Larus cachinnans</i>	Ricklefs & Fallon, 2002
LARCRA01	Ásia	<i>Larus cassirostris</i>	Ishtiaq <i>et al.</i> , 2007
LARSCO01	América do Sul	<i>Leucophaeus scoresbii</i>	Quillfeldt <i>et al.</i> , 2010
MICRO01	América do Sul	<i>Creagrus furcatus</i>	Levin <i>et al.</i> , 2011

6. DISCUSSÃO

Informações sobre aspectos ecológicos e biológicos associados às espécies *R. niger* e *P. simplex* são escassas. Estudos sobre a biologia existem apenas para a espécie *R. niger* na América do Norte (ERWIN, 1977, 1979; BURGER, 1981, 1982; BURGER & GOCHFELD, 1990; GOCHFELD & BURGER, 1994; HAMMERSON & CANNINGS, 2006; OWEN & PIERCE, 2013). As informações publicadas sobre essas duas aves na América do Sul, particularmente no Brasil, restringem-se a inventários ornitológicos locais ou registros de avistamento (BRANCO & FRACASSO, 2005; MASCARELLO *et al.*, 2005; BARBIERI, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; GIRÃO *et al.*, 2008; SOARES & RODRIGUES, 2008; PEREIRA & POERSCHKE, 2010; BERNARDON & NASSAR 2012; LUQUE & TEJADA, 2013; MÜLLER & BARROS, 2013), com alguns poucos dados sobre comportamento e biologia reprodutiva (KRANNITZ, 1989; MARIANO-JELICICH *et al.*, 2003). Nessa mesma direção, também não estão disponíveis informações sobre a ocorrência de parasitos, incluindo os hemosporídeos, em *P. simplex* nem em *R. niger*. O presente trabalho foi o primeiro a avaliar a ocorrência de hemoparasitos nestas duas espécies. Assim, a discussão aqui apresentada será embasada no cruzamento dos resultados obtidos sobre a ocorrência e diversidade dos hemosporídeos nas duas espécies de aves amostradas, com a diversidade de parasitos encontrada em outras aves simpátricas ou com rotas migratórias comuns. A ocorrência e a característica da infecção também serão relacionadas às informações existentes acerca da biologia de *R. niger* e *P. simplex*.

6.1. Ocorrência de infecção e características das aves parasitadas

A ocorrência de hemosporídeos em aves silvestres tem sido tema de estudo em diferentes regiões do mundo e os métodos de detecção desses parasitos envolvem desde observações microscópicas até a detecção molecular e sequenciamento de genes alvos específicos. Entretanto, esse diagnóstico pode ser bastante complicado, principalmente porque os animais capturados apresentam-se, geralmente, em uma fase crônica de infecção e com baixos níveis de parasitemia (BRAGA *et al.*, 2011). Nesse estudo, a ocorrência de infecção foi determinada através da combinação das técnicas de PCR e microscopia óptica. Foram constadas 30 aves parasitadas por hemosporídeos. *R. niger*

foi a espécie que apresentou maior frequência de animais positivos e, entre esses, a maioria era de animais adultos.

A análise de esfregaços de sangue através da microscopia óptica é considerada o teste padrão-ouro para o diagnóstico de hemoparasitos (SEGHAL *et al.*, 2005). Os problemas mais frequentes apontados por estudos baseados nesse diagnóstico são o tempo gasto com a análise de cada esfregaço e as estimativas muito baixas de prevalência quando comparadas às obtidas por métodos moleculares. No entanto, a microscopia é um método importante para a caracterização específica dos parasitos e para a detecção de infecção mista (VALKIŪNAS *et al.*, 2006).

Devido às limitações da detecção por microscopia, principalmente em estudos de prevalência, a PCR tem sido usada como método complementar para a identificação dos parasitos e para a detecção de infecção (BENSCH *et al.*, 2000; PERKINS & SCHALL 2002; WALDENSTRÖM *et al.* 2004). Diversos autores demonstraram que as técnicas moleculares podem ser mais sensíveis para a detecção de hemosporídeos, mesmo em baixas parasitemias e infecções crônicas (JARVI *et al.*, 2002; RICHARD *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005; VARDO *et al.*, 2005; DURRANT *et al.*, 2006; FALLON & RICKLEFS, 2008). Além disso, é um método mais prático para ser usado em estudos de prevalência, por demandar menos tempo para o processamento de grandes quantidades de amostras, o que significa uma vantagem quando comparada à microscopia.

Apesar da alta sensibilidade associada às técnicas moleculares, o presente trabalho demonstrou uma baixa sensibilidade de detecção pela PCR e uma maior positividade de infecção a partir da observação de esfregaços. Essa divergência de resultados observada pode ter sido reflexo da baixa parasitemia apresentada pelas aves amostradas, caracterizada pelo pequeno número de formas dos parasitos encontrado nos esfregaços. Além de influenciar na concordância entre os métodos, essa característica impossibilitou a identificação específica através da análise morfológica dos parasitos encontrados em esfregaços sanguíneos. Esses resultados corroboram estudos prévios já realizados em diferentes regiões, inclusive por nosso grupo (JAVRI *et al.*, 2002; VALKIŪNAS *et al.*, 2008; BELO *et al.*, 2011). Outros fatores que poderiam influenciar na baixa sensibilidade da PCR são as condições de armazenamento a que foram submetidas as amostras desse estudo, que não foram ideais devido às altas temperaturas durante o período de coleta na RDSM. A presença de falso-negativos pela PCR pode,

também, estar associada à presença de linhagens de hemoparasitos não amplificáveis pelos iniciadores utilizados (FALLON & RICKLEFS, 2008; GARAMSZEGI, 2010).

Considerando as limitações, vantagens e desvantagens das técnicas demonstradas nesse e nos demais estudos citados, podemos reforçar que a combinação entre PCR e microscopia ainda é a melhor forma para otimizar a detecção de hemosporídeos, principalmente quando as amostras são provenientes de aves silvestres, com origens distintas, histórico de vida desconhecido e que não estão sob condições de infecção experimental controlada (BARKER JR. *et al.*, 1992; MARTINSEN *et al.*, 2006; VALKIŪNAS *et al.*, 2006, 2008; GARAMSZEGI, 2010).

Neste trabalho foi possível estudar a ocorrência de hemosporídeos em filhotes das espécies aquáticas estudadas. Sabe-se que a inclusão de filhotes em estudos desta natureza não é frequente. Em *R. niger* a ocorrência de infecção variou entre filhotes e adultos. Foram capturados 32 filhotes e desses, apenas cinco (15,6%) apresentaram infecção por hemosporídeos. Com relação aos adultos da mesma espécie, 68 indivíduos foram capturados e desses, 15 foram positivos (22%).

Como havia filhotes infectados, deve-se considerar que a transmissão de hemosporídeos estava ocorrendo no local de amostragem, pois todos esses filhotes nasceram e permaneceram na Praia do Meio durante o período de reprodução. No entanto, é possível que essas aves apresentem algum tipo de resistência, visto que a parasitemia encontrada foi baixa e não havia sinais de infecção, como fraqueza, anemia ou anorexia, nos filhotes. Essa resistência pode ser proveniente de imunidade passiva, que limitou por algumas semanas a multiplicação dos parasitos e a persistência do desafio de infecção pode ter contribuído para a ativação da imunidade adaptativa (KAISER, 2010). No entanto, como esses filhotes foram acompanhados durante três meses apenas, não podemos afirmar se alguma ave apresentou sinais clínicos ou aumento da parasitemia após esse período.

A existência de menos filhotes parasitados em relação aos adultos poderia ser explicado pelo fato de animais adultos estarem a mais tempo expostos a vetores e com isso mais infectados (ARRIERO & MOLLER, 2008; QUILLFELDT *et al.*, 2011). Outros elementos podem ser considerados na tentativa de explicar a maior ocorrência em adultos. Uma possibilidade seria a reincidência de hemoparasitos relacionada a fatores intrínsecos do ciclo reprodutivo das aves, principalmente alterações hormonais que acarretam oscilações na resposta imune dos hospedeiros, podendo reagudizar infecções previamente estabelecidas ou favorecer a instalação de novas infecções

(BEAUDOIN *et al.*, 1971; DEVICHE *et al.*, 2001; GARVIN & GREINER, 2003). Além desses fatores intrínsecos, o desgaste físico, por aumento de demanda energética para a incubação dos ovos e cuidados com a prole, causa um estresse fisiológico por ação endócrina, que junto aos hormônios reprodutivos levam a alterações no *status* imunológico. Outro ponto importante, é que a nidificação resulta em uma diminuição da atividade, pois os animais permanecem mais tempo parados chocando os ovos no ninho, tornando-os mais suscetíveis aos vetores (VALKIŪNAS, 2005).

Essa característica de infecção encontrada poderia ser explicada pelo comportamento apresentado por *R. niger*. Essa espécie de ave possui maior atividade durante a noite, ficando em repouso no solo, próximo à água, a maior parte do tempo durante o dia. Esse tempo de repouso coincide com o período de maior atividade dos possíveis vetores de *Haemoproteus* spp., Segundo dados encontrados na literatura, incluindo trabalhos já realizados no bioma Amazônia, as diferentes espécies de ceratopogonídeos apresentam comportamentos zoofílicos distintos entre elas, com maior atividade durante o crepúsculo para algumas espécies, e durante as horas mais quentes do dia (LINLEY *et al.*, 1983; TRINDADE & GORAYEB, 2005). Provavelmente ocorre atividade intermitente desses insetos vetores durante todo o dia. Por outro lado, a exposição à transmissão de *Plasmodium* spp. seria relativamente menor. Isso porque os insetos culicídeos, vetores dos plasmódios aviários, possuem maior atividade de repasto durante o crepúsculo (FORATTINI *et al.*, 1986), período que coincide com maior atividade de indivíduos adultos de *R. niger*. Assim, os indivíduos adultos seriam mais suscetíveis a infecções por *Hamoproteus* spp, por estarem sob exposição mais intensa a ceratopogonídeos do que a culicídeos.

Seguindo essa mesma lógica, poderíamos levantar a hipótese de que a dinâmica de infecção é diferente para os indivíduos adultos de *P. simplex*. Esta espécie possui períodos de menor atividade durante o crepúsculo e de maior atividade durante o dia, e assim, estariam mais suscetíveis a infecções por *Plasmodium* spp. do que por *Haemoproteus* spp. Infelizmente, a captura de adultos de *P. simplex* de vida livre, *in situ*, é praticamente inviável em locais de nidificação, dificultando a execução de estudos que corroborem essa hipótese. Não foi possível comparar a frequência de infecção entre as espécies, pois foram amostrados somente filhotes de *P. simplex*, enquanto para *R. niger* aves jovens e adultas foram avaliadas.

Devido às características da amostra avaliada nesse trabalho serem bastante distintas das avaliadas nos demais estudos sobre o assunto, não foram feitas

comparações mais específicas sobre as influências dos parâmetros ambientais nas taxas de prevalência e ocorrência de hemoparasitos. Primeiro, porque as espécies *P. simplex* e *R. niger* nunca tinham sido incluídas em estudos sobre hemosporídeos, e também não existem outros relatos de doenças nessas duas espécies. Segundo, porque o ambiente onde essas aves foram capturadas possui características bastante peculiares: área cuja existência é sazonal e sofre forte influência de uma bacia hidrográfica de característica muito dinâmica; que fica submersa durante a maior parte do ano; local de nidificação com alta densidade de aves e quelônios, sem vegetação e com baixa atividade antrópica. Com isso, a Praia do Meio se diferencia muito dos demais habitats onde já foram feitos estudos sobre malária aviária, que possuem vegetação e não são áreas de intensa nidificação. Além disso, a maioria dos trabalhos foi realizada em aves com características biológicas bastante distintas de *P. simplex* e *R. niger*. Sabe-se que diferentes habitats, com níveis distintos de interações ecológicas e de alterações (mais ou menos antropizados), podem determinar composições e dinâmicas muito diferentes da tríade parasito-vetor-hospedeiro, constituindo situações de parasitismo e prevalências incomparáveis entre si (ATKINSON, 1988; MARINI *et al.*, 1996; SHUTLER, 1996; DURRANT *et al.*, 2006; GARVIN & REMSEN, 1997; PIERSMA, 1997; MENDES *et al.*, 2005; ARRIERO & MOLLER, 2008; BELLO *et al.*, 2011; DELGADO & FRENCH, 2012).

Por isso, seria necessário conduzir mais estudos com as espécies aqui avaliadas, bem como com outras espécies da mesma região e da mesma comunidade, a fim de estabelecer um padrão de infecção nesse local. Estudos sobre a ocorrência de hemosporídeos em *P. simplex* e *R. niger* em outros pontos da América do Sul também são importantes, pois tornariam os dados sobre malária nessas aves muito mais robustos, uma vez que as comparações com dados compilados da literatura, sobre outras aves em outros habitats, podem não representar as reais condições dessas espécies e dos locais onde elas ocorrem naturalmente. Além disso, explorar as possibilidades de ocorrência de linhagens aparentemente especialistas, que poderiam servir de marcadores geográficos das aves migratórias a partir de comparações entre a distribuição das linhagens encontradas em sítios de reprodução e nascimento, com aquelas encontradas em regiões de invernada. Um estudo mais completo incluiria, também, a amostragem de aves sedentárias residentes de cada local.

É necessário considerar, ainda, que as aves migratórias, além de indicadores de saúde ambiental, funcionam como dispersoras de diversas doenças de importância

antropozoonótica, como Influenza e Febre do Nilo, e de importância na avicultura comercial, como a doença de New Castle. Por isso, é fundamental a ampliação das áreas de monitoramento sanitário, com programas mais completos de triagem, principalmente em animais de vida livre, através do diagnóstico de outros microorganismos patogênicos, além dos hemoparasitos, que porventura possam estar sendo carreados por animais que realizam migração.

6.2. Diversidade de hemoparasitos

As seis sequências obtidas (3,47% das 173 amostras coletadas) corresponderam a três diferentes linhagens, sendo duas de *Plasmodium* e uma de *Haemoproteus*. A linhagem de *Plasmodium* sp. Ryni_RDMS02, encontrada em um indivíduo adulto de *R. niger* já tinha sido descrita no Brasil em 11 espécies de aves, de oito famílias distintas, da ordem Passeriforme: em áreas de Cerrado, Mata Atlântica e Mata Seca de Minas Gerais (LACORTE *et al.* 2013); em uma espécie sinantrópica no Tocantins, Brasil (MARZAL *et al.*, 2011). Também foi descrita em três espécies da ordem Piciforme em cativeiros de Minas Gerais (FERREIRA JR, 2012). Levin *et al.* (2013) encontraram essa linhagem em Passeriformes nas Ilhas Galápagos, Equador, em uma espécie nativa da América do Norte que migra para a América do Sul para invernar. A mesma linhagem, denominada por Archer *et al.* (2011) como HMA-2012, foi encontrada em uma espécie de ave da ordem Passeriforme na Costa Rica e em outra na região de Nova York, nos EUA. Essa linhagem foi caracterizada como *Plasmodium nucleophilum* por Chagas *et al.* (2013) em uma ave exótica, da ordem Anseriforme, nascida no Zoológico de São Paulo.

A linhagem Ryni_RDMS01 de *Plasmodium* sp. foi encontrada em outro *R. niger* adulto da Praia do Meio. Essa mesma linhagem já foi descrita em três famílias da ordem Passeriformes: em duas espécies no sudoeste e nordeste dos Estados Unidos (EUA) (PAGENKNOPP *et al.*, 2008; LEVIN *et al.*, 2013); e em três espécies no Brasil, em Minas Gerais (LACORTE *et al.*, 2013). Essa mesma linhagem, denominada GHOW3489 por Ishak *et al.* (2008), foi encontrada em uma espécie da ordem Stigiforme em um cativeiro na Califórnia, EUA (ISHAK *et al.*, 2008). Merino *et al.* (2008) descreveram essa mesma linhagem em uma espécie de Passeriforme no Chile, denominando-a de ChP5. A ocorrência dessa linhagem em pontos distantes entre si

pode estar relacionada à migração de seus hospedeiros, demonstrando a importância das aves migratórias na dispersão de hemoparasitos por áreas bastante distintas em aspectos biogeográficos.

Nota-se que as duas linhagens de *Plasmodium* encontradas em *R. niger* da RDSM, no Amazonas, apresentam um certo grau de generalismo, sendo encontradas em aves taxonomicamente diferentes. De fato, Bennet e colaboradores (1982) já haviam demonstrado a baixa especificidade de *Plasmodium* sp., apresentando ampla distribuição em aves de diferentes espécies e ordens, oriundas de habitats bastante heterogêneos. Acredita-se, também, que existam muitas espécies e gêneros de culicídeos como potenciais vetores de *Plasmodium* sp., muitos com uma grande plasticidade para adaptação em ambientes diversos e ampla distribuição geográfica, o que facilitaria a manutenção do ciclo do parasito em diferentes áreas (FRIEND & FRANSON, 1999). Além disso, maiores prevalências podem estar relacionadas a diferenças na capacidade dos vetores em transmitir algumas linhagens com maior eficiência do que outras (ALAVI *et al.*, 2003; PAGENKOPP *et al.*, 2008). No entanto, essas diferenças nas dinâmicas da transmissão são difíceis de elucidar sem maiores estudos sobre a abundância e distribuição dos vetores.

Uma única linhagem de *Haemoproteus* sp. (Ryni_RDSM) foi a mais abundante, encontrada em cinco indivíduos adultos de *R. niger*, a partir da amplificação pela *nested* PCR segundo protocolo descrito por Hellgren e colaboradores (2004). A caracterização molecular utilizando sequências parciais do citocromo b demonstrou que a linhagem Ryni_RDSM possui 100% de similaridade genética com *Haemoproteus macrovacuolatus* (linhagem CA1017), descrita pela primeira vez em *Dendrocygna autumnalis* (marreca-cabocla) em uma região de savana na Colômbia (MATTA *et al.*, 2014). A análise filogenética identificou ainda uma proximidade entre essa espécie de *Haemoproteus* e a linhagem C033 encontrada em patos (*Dendrocygna javanica*) no sudeste da Ásia, indicando um antecessor comum entre as três linhagens descritas aqui. Considerando que os gêneros de aves *Dendrocygna* e *Rynchops* possuem uma distribuição ampla, predominantemente tropical e subtropical, com algumas espécies de distribuição sobreposta, essas linhagens de *Haemoproteus* podem servir de modelos em estudos biogeográficos, para demonstrar a existência de simpatria ou especiação geográfica de hemoparasitos e os efeitos de especificidade e/ou generalidade de hospedeiros.

Segundo alguns autores, as espécies de *Haemoproteus* são relativamente hospedeiro-específicas e restritas a poucas espécies de aves (ATKINSON *et al.*, 1986; BENNETT *et al.*, 1994a; SAVAGE & GREINER, 2004; PEIRCE & ADLARD, 2005). No entanto, trabalhos mais recentes demonstram um panorama diferente em relação à dinâmica de infecção por espécies de *Haemoproteus*, em que foram encontradas linhagens com amplas distribuições, infectando hospedeiros de famílias e ordens distintas (FALLON *et al.*, 2003b; RICKLEFS, *et al.*, 2004; RICKLEFS *et al.*, 2005; BELO, 2012).

Essas variações na estratégia de exploração de hospedeiros, do completo generalismo a altos graus de especialismo, são dependentes de complexas interações entre fatores bióticos e abióticos nas comunidades onde a transmissão ocorre. Os fatores abióticos incluem as condições climáticas e as características do hábitat, determinando a diversidade e a abundância dos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os fatores bióticos, relacionados aos hospedeiros, incluem sexo, faixa-etária, imunidade, padrões de migração e de comportamento (BENSCH *et al.*, 2000;. RICKLEFS & FALLON, 2002;. RICKLEFS *et al.*, 2005). Assim, em regiões de grandes áreas contínuas, com climas mais estáveis, ambientes menos degradados e com um ecossistema em estágio sucessional maduro, assim como as florestas tropicais preservadas da Amazônia, por exemplo, proporcionariam um aumento da diversidade biológica geral, criando situações mais intensas de competição entre parasitos e aumentando o grau de especialização dos parasitos em relação aos hospedeiros. Em contrapartida, em biomas mais delicados e instáveis, as comunidades possuem nichos mais amplos, devido a necessidades adaptativas de cada espécie, tornando os organismos mais generalistas (PERONI & HERNÁNDEZ, 2011). Esses fatores podem ser determinantes na variação entre regiões, e também conforme as espécies hospedeiras, quanto ao grau de generalismo ou especialismo de algumas linhagens de *Haemoproteus* e *Plasmodium*, pois a dinâmica parasito-hospedeiro em populações de aves migratórias pode estar sujeita a pressões de seleção contrastantes com as sofridas em populações de aves sedentárias (FALLON *et al.*, 2006).

No entanto, a escassez de estudos *in situ* sobre hemoparasitos de aves silvestres, principalmente na região amazônica, dificulta o entendimento sobre as particularidades das infecções por *Haemoproteus* sp. em algumas ordens de aves. Principalmente porque a maioria dos trabalhos contempla amostragens de Passeriformes, o que não representaria um bom parâmetro para estabelecer correlações de infecção por

Haemoproteus sp. em aves Charadriiformes, amostradas nesse estudo, pois as dinâmicas de infecção por hemosporídeos nessa ordem de aves é praticamente desconhecida. A ampliação das áreas de estudo bem como uma avaliação mais ampla avaliação sanitária das populações selvagens de aves Charadriiformes, é fundamental para identificar: (1) quais hemoparasitos ocorrem e quais podem comprometer significativamente as dinâmicas populacionais e de migração; (2) para avaliar morbidade e mortalidade; (3) e para demonstrar quais hemoparasitos atuam em sinergismo com outras patologias, principalmente viroses. Por algumas espécies, como *R. niger* e *P. simplex* possuírem uma distribuição geográfica abrangente, é fundamental incluí-las nos programas de avaliação sanitária com objetivos conservacionistas e de coleta de informações sobre agravos e epizootias em animais selvagens.

7. CONCLUSÕES

Os dados encontrados nesse estudo corroboram a hipótese da existência de infecção por *Plasmodium* spp. e por *Haemoproteus* spp. em aves das espécies *R. niger* e *P. simplex* na RDSM. Além disso, foi confirmada a transmissão de hemoparasitos na RDSM através da detecção de infecção nos filhotes nascidos na região.

As linhagens de *Plasmodium* encontradas nas aves em Mamirauá apresentam uma característica de distribuição, geográfica e de hospedeiros, mais generalista quando comparado à linhagem de *Haemoproteus*.

Não foram encontradas evidências de doença clínica decorrente das infecções, tanto por *Plasmodium* spp. quanto por *Haemoproteus* spp., nas aves amostradas. Também não existem descrições na literatura que demonstrem a virulência ou a mortalidade dessas infecções em Charadriiformes.

A linhagem Ryni_RDSM01 de *Plasmodium*, além de ter sido encontrada em aves adultas da espécie *R. niger* em Mamirauá, já foi descritas na região sudeste do Brasil, na costa oeste dos EUA, e no extremo sul do Chile. A ocorrência dessa linhagem em pontos distantes entre si pode estar relacionada à migração de seus hospedeiros, demonstrando a importância das aves migratórias na dispersão de hemoparasitos por áreas bastante distintas em aspectos biogeográficos.

A outra linhagem de *Plasmodium* encontrada (Ryni_RDSM02) também havia sido descrita em diferentes espécies de aves em pontos distintos, porém, restritos à América do Sul e Central.

Algumas características biológicas dos hospedeiros vertebrados e invertebrados podem estar relacionadas a diferenças na susceptibilidade das aves aos parasitos da malária aviária, como por exemplo, período de atividade e descanso. Isso foi demonstrado com a diferença na prevalência de *Plasmodium* em espécies de hábitos diurnos e vespertinos, e de *Haemoproteus* em aves com pico de atividade à noite.

A linhagem de *Haemoproteus* sp. Ryni_RDSM descrita neste estudo também foi descrita em uma espécie de Anseriforme na Colômbia, demonstrando uma área de ocorrência bastante restrita desse gênero de hemoparasito. No entanto, as amostragens em aves Americanas são bastante restritas à ordem Passeriformes. Assim, estudos que incluam ordens poucos avaliadas, como Charadriiformes e Anseriformes, fazem-se necessários para contribuir com informações adicionais. Principalmente sobre a ocorrência de *Haemoproteus* spp.

Por fim, corroborando o que foi descrito em outros trabalhos na área, demonstramos que a associação dos métodos de microscopia óptica e PCR permite a identificação de um maior número de aves infectadas e deve ser utilizada em estudos de prevalência de malária aviária, pois as duas técnicas em conjunto detectam maior número de animais positivos.

REFERÊNCIAS

- ALAVI Y, ARAI M, MENDOZA J, TUFET-BAYONA M, SINHA R, FOWLER K, BILLKER O, FRANKE-FAYARD B, JANSE CJ, WATERS A, SINDEN RE 2003. The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int. J. Parasitol.* 33(9): 933-43.
- ANDERSON RM, MAY RM 1978. Regulation and stability of host-parasite population interaction. *J. Animal Ecol.* 47: 219-247.
- APANIUS V 1998. Stress and immune defense. *Adv. Stud. Behav.* 27:133-153.
- ARCHER HM, MENDENHALL CD, SEKERCIOGLU CH, SEHGAL RNM 2011. The persistence of host-parasite interactions in a human dominated landscape. *In press*.
- ARRIERO E, MOLLER AP 2008. Host ecology and life history traits associated with blood parasite species richness in birds. *J. Evol. Biol.* 21: 1504-1513.
- ATKINSON CT, GREINER EC, FORRESTER DJ 1986. Pre-erythrocytic development and associated host responses to *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *J. Protozool.* (33)3: 375-381.
- ATKINSON CT, FORRESTER DJ, GREINER EC 1988. Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: Seasonal Transmission and Vector Abundance. *J. Med. Entomol.* 25: 45-51.
- ATKINSON CT, VAN RIPER III C 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leukocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loya JE, Zuk M (Eds.) *Blood-parasite interactions: Ecology, evolution, and behaviour*, Oxford University Press, Oxford: 19-47.
- ATKINSON CT, WOODS KL, DUSEK RJ, SILEO LS, IKO WM 1995. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology* 111 (Suppl.): 59-69.
- ATKINSON CT, DUSEK RJ, WOODS KL, IKO WM 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wild. Dis.* 36: 197-204.
- AVIBASE. The world bird database. *Phaetusa simplex*. Disponível em <http://avibase.bsc-eoc.org>. Acesso em: dezembro de 2013.
- AYRES JM 1993. *As Matas de várzea do Mamirauá*. Rio de Janeiro: MCT-CNPq-PTU; Sociedade Civil Mamirauá, 90 pp.

BARBIERI E 2007. Variação sazonal e abundância de *Rynchops niger* no estuário de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida, São Paulo. *Bio. Neotrop.* 7(2): 21-26.

BEAUDOIN RL, APPLGATE JE, DAVIS DE, McLEAN RG 1971. A model for the ecology of avian malária. *J. Wildl. Dis.* 7: 5-13.

BELL GA 1997. Selection. Chapman and Hall, New York, New York, USA.

BELO NO, PASSOS LF, MARTINS LC, GOULART CE, SHERLOCK TM, BRAGA EM 2009. Avian malaria in captive psittacine birds: detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. *Prev Vet Med* 88: 220-224.

BELO NO, PINHEIRO RT, REIS ES, RICKLEFS RE, BRAGA EM 2011. Prevalence and lineage diversity of avian haemosporidians from three distinct cerrado habitats in Brazil. *PLoS One* 6(3): e17654.

BELO NO 2012. *Prevalência e diversidade de Haemosporida em aves silvestres de diferentes habitats no Brasil e na Venezuela*. Tese doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 119 pp.

BELTON W 1984. Birds of Rio Grande do Sul, Brazil. Part. 1. Rheidae through Furnariidae. *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 178: 371-631.

BENNETT GF, CAMPBELL AG 1972. Avian Haemoproteidae. I. Description of *Haemoproteus fallisi* n. sp. and a review of the haemoproteids of the family Turdidae. *Canad. J. Zool.* 50(10): 1269-1275.

BENNETT GF, SOUZA O 1980. Blood parasites of some birds from São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 75: 117-134.

BENNETT GF, THOMMES F, BLANCOU J, ARTOIS M 1982a. Blood parasites of some birds from the Lorraine region, France. *J. Wildl. Dis.* 18: 81-88.

BENNETT GF, PEIRCE MA, EARLÉ RA 1994a. An annotated checklist of the valid avian species of *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Syst. Parasitol.* 29: 61-73.

BENSCH S, STJERNMAN M, HASSELQUIST D, OSTMAN O, HANSON B, WESTERDAHL H, PINHEIRO RT 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, PEREZ-TRIS J, WALDENSTRÖM J, HELLGREN O 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evol.* 58: 1617-1620.

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. Res.* 9: 1353-1358.

- BERESTNEFF N. 1904. Über das Leucocytozoon Danilewskyi. *Arch. Protistenkd.* 3: 376–386.
- BERNARDON B, NASSAR PM 2012. Birdwatching in the Mamirauá Lake as an appeal to ecotourists/birdwatchers. *Uakari* 8(2): 51-66.
- BRAGA EM, 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(1): 3-11.
- BRANCO JO 2000. Avifauna associada ao estuário do Saco da Fazenda, Itajaí, SC, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 17(2): 384-394.
- BRANCO JO, FRACASSO HAA 2005. Ocorrência e abundância de *Rynchops niger* Linnaeus 1758, no litoral de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 22(2): 430-432.
- BURGER J 1981. Sexual differences in parental activities of breeding black skimmers. *Am. Nat.* 117 (6): 975-984.
- BURGER J 1982. The role of reproductive success in colony-site selection and abandonment in black skimmers (*Rynchops niger*). *Auk*. 99:109-115.
- BURGER J, GOCHFELD M 1990. *The black skimmer social dynamics of a colonial species*. Columbia Univ. Press, New York. 355 pp.
- CBRO 2011. Comitê brasileiro de registros ornitológicos. *Listas das aves do Brasil 10ª Edição*, Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: janeiro de 2013.
- CEMAVE. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Disponível em < <http://www.icmbio.gov.br/cemave/>>. Acesso em: setembro de 2012.
- CHAGAS CRF, VALKIŪNAS G, NERY CVC, HENRIQUE PC, GONZALES IHL, MONTEIRO EF, GUIMARÃES LO, ROMANO CM, KIRCHGATTER K 2013. *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* from an Egyptian Goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. *Int. J. Parasitol.: Parasites and Wildlife*, 2: 286-291.
- CLAYTON BH, MOORE J 1997. Host-parasite evolution, general principals and avian models. Oxford University Press: Oxford: 1-6.
- CUNNINGHAM AA, DASZAK P 1998. Extinction of a species of land snail due to infection with a microsporidian parasite. *Cons. Biol.* 12: 1139–1141.
- CUNNINGHAM AA, DASZAK P, RODRIGUEZ JP 2003. Pathogen pollution: Defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *J. Parasitol.* 89: 78-83.
- DASZAK P, CUNNINGHAM AA 1999. Extinction by infection. *Trends Ecol. Evol.* 14: 279-279.
- DAY T 2001. Parasite transmission mode and the evolution of virulence. *Evol.* 55: 2389-2400.

DEL HOYO J, ELLIOTT A, SARGATAL J 1996: *Handbook of the Birds of the World, volume 3. Hoatzin to Auks* Barcelona: Lynx editions. pp. 821.

DELGADO-V CA, FRENCH K 2012. Parasite-bird interactions in urban areas: Current evidence and emerging questions. *Landscape Urban Plan.* 105: 5-14.

DEVICHE P, GREINER EC, MANTECA X 2001. Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *J. Exp. Zool.* 289(1):456-466.

DIECKMANN U 2002. *Adaptive dynamics of pathogen-host interactions*. In: Adaptive Dynamics of Infectious Diseases (U DIECKMANN, METZ JAJ, SABELIS MW, SIGMUND K eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK: 39-59.

DURRANT KL, BEADELL JS, ISHTIAQ F, GRAVES GR, OLSON SL, GERING E, PEIRCE MA, MILENSKY CM, SCHMIDT BK, GEBHARD C, FLEISCHER RC 2006. Avian hematozoa in south america: a comparison of temperate and tropical zones. *Ornit. Monographs* 60: 98-111.

ENDLER JA 1986. *Natural selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton, NJ. pp 336.

ERWIN RM 1977. Black Skimmer breeding ecology and behavior. *Auk* 94: 709-717.

ERWIN RM 1979. Species interactions in a mixed colony of Common Terns (*Sterna hirundo*) and Black Skimmers (*Rynchops niger*). *Anim. Behav.* 27: 1054-1062.

FALLON SM, RICKLEFS RE, SWANSON BL, BERMINGHAM 2003a. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *J. Parasitol.* 89(5): 1044-1047.

FALLON SM, BERMINGHAM EE, RICKLEFS RE 2003b. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. *Evol.* 57(3): 606-615.

FALLON SM, BERMINGHAM E, RICKLEFS RE 2005. Host specialization and geographic localization of avian malaria parasites: a regional analysis in the Lesser Antilles. *Am. Naturalist* 165(4): 466-480.

FALLON SM, FLEISCHER RC, GRAVES GR 2006. Malarial parasites as geographical markers in migratory birds? *Biol. Lett.* 2: 213-216.

FALLON SM, RICKLEFS RE 2008. Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. *J. Avian Biol.* 39: 514-522.

FECCHIO A 2011. *Prevalência, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (Haemoproteus e Plasmodium) em aves do Cerrado do Brasil Central*. Tese doutorado, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 130 pp.

FELDMAN RA, FREED LA, CANN RL 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol. Ecol.* 4(6): 663-673.

FERREIRA JR 2012. *Avaliação sanitária de tucanos e araçarís (Aves: Piciformes) em cativeiro no Estado de Minas Gerais*. Dissertação mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 80 pp.

FORATTINI OP, GOMES AC, NATAL D, SANTOS JLF 1986. Observações sobre atividades de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes no Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 20(3): 178-203.

FRANK SA 1996. Models of parasite virulence. *Q. Rev. Biol.* 71: 37-78.

FRIEND M, FRANSON JC 1999. *Field manual of wildlife diseases, general field procedures and disease of birds*. U.S. Geol. Surv. Inf. and Tec. Rep. 426 pp.

GARNHAM PCC 1966. *Malaria Parasites and other haemosporidia*, Blackwell Scientific publications, Oxford, 1114 pp.

GAUNT AS, ORING LW 2010. *Guidelines to the use of wild birds in research*. The Ornithological Council: providing scientific information about birds, 3^a ed, Washington DC, 215 pp.

GILLESPIE TR, CHAPMAN CA 2004. Forest fragmentation alters primate parasite dynamics: implications for primate health and conservation. *Folia Primatol.* 75(1): 267

GARAMSZEGI LZ 2010. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. *J. Parasit.* 96: 1197-203.

GARVIN MC, REMSEN JV 1997. An alternative hypothesis for heavier parasite loads of brightly colored birds: exposure at the nest. *Auk* 114: 179-191.

GARVIN MC, GREINER AC 2003. Epizootiology of *Haemoproteus danilewskyi* (Haemosporina: Haemoproteidae) in blue jays (*Cyanocitta cristata*) in southcentral Florida. *J. Wild. Dis.* 39: 1-9.

GIRÃO W, ALBANO C, CAMPOS AA, PINTO T, CARLOS CJ 2008. Registros documentados de cinco novos trinta-réis (Charadriiformes: Sternidae) no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Ornit.* 16(3): 252-255.

GOCHFELD M, BURGER J 1994. Black skimmer: 1-29 in: Poole A, Gill F (eds). *The Birds of North America, Vol. 3 (pp 108), 1st Edition*. Philadelphia, PA: American Ornithologists Union & The Academy of Natural Sciences of Philadelphia.

GREINER EC, BENNETT GF, WHITE EF, COOMBS RF 1975. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can. J. Zool.* 53: 1762-1787.

GRENFELL BT, DOBSON AP 1995 (Eds.). *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations*. Cambridge University Press: 534 pp.

HAMILTON WD, ZUK M 1982. Heritable true fitness and bright birds: A role for parasites? *Science*, 218: 384-387.

HAMMERSON G, CANNINGS S 2006. Comprehensive Report Species - *Rynchops niger*. Disponível em < <http://explorer.natureserve.org/>>. Acesso em: dezembro de 2013.

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(4): 797-802.

HIRSH DC, ZEE YC 2003. *Microbiologia veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 446 pp.

HOCHACHKA VW, DHONDT AA 2000. Density-dependent decline of host abundance resulting from a new infectious disease. *PNAS* 97: 5303-5306.

HUDSON PJ, RIZZOLI A, GRENFELL BT, HEESTERBEEK H, DOBSON AP 2002. *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford, U.K, 197 pp.

ISHAK HD, DUMBACHER JP, ANDERSON NL, KEANE JJ, VALKIŪNAS G, HAIG SM, TELL LA, SEHGAL RNM 2008. Blood parasites in wols with conservation implications for the spotted owl (*Strix occidentalis*). *PLoS One* 3(5): e2304.

ISHTIAQ F, GERING E, RAPPOLE JH, RAHMANI AR, JHALA YV, DOVE CJ, MILENSKY C, OLSON SL, PEIRCE MA, FLEISCHER RC 2007. Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: a regional survey. *J. Wildl. Dis.* 43(3): 382-398.

JAVRI SI, SCHULTZ JJ, ATKINSON CT 2002. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *J. Parasit.* 88: 153-158.

JULIAN RJ, GALT DE 1980. Mortality in Muscovy Ducks (*Cairina moschata*) caused by *Haemoproteus* infection. *J. Wildl. Dis.* 16: 39-44.

KEESING F, BELDEN LK, DASZAK P, DOBSN A, HARVELL CD, HOLT RD, HUDSON P, JOLLES A, JONES KE, MITCHELL CE, MYERS SS, BOGICH T, OSTFELD RS 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647-652.

KOCK M 1996. Wild life, people and development. *Trop. Anim. Helth Prod.* 28: 68-80.

KRANNITZ PG 1989. Nesting biology of black skimmers, large-billed terns, and yellow-billed terns in Amazonian Brazil. *Journal of field ornithology, Columbus*, 60 (2): 216-223.

LACORTE GA, FÉLIX GMF, PINHEIRO RRB, CHAVES AV, ALMEIDA-NETO G, NEVES FS, LEITE LO, SANTOS FR, BRAGA EM 2013. Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites - a molecular survey from southeast Brazil. *PLoS One* 8(3): e57770.

LEVIN II, VALKIŪNAS G, SANTIAGO-ALARCON D, CRUZ LL, IEZHOVA TA, O'BRIEN SL, HAILER F, DEARBORN D, SCHREIBER EA, FLEISCHER RC, RICKLEFS RE, PARKER PG 2011. Hippoboscids-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. *Inter. J. Parasitol.* 41: 1019-1027.

LEVIN II, ZWIERS P, DEEM SL, GEEST EA, HIGASHIGUCHI JM, IEZHOVA TA, JIMÉNEZ-UZCÁTEGUI G, KIM DH, MORTON JP, PERLUT NG, RENFREW RB, SARI EHR, VALKIŪNAS G, PARKER PG 2013. Multiple lineages of avian malaria parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and evidence for arrival via migratory birds. *Cons. Biol.* 27: 1366-1377.

LINLEY JR, HOCH AL, PINHEIRO FP 1983. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. *J. Med. Entomol.* 20(4): 347-364.

LOBATO DNC 2007. *Indicadores hematológicos e parasitológicos como ferramentas ecológicas para avaliar a saúde de Turdus leucomelas (Passeriformes)*. Dissertação mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 93 pp.

LOISEAU C, HARRIGAN RJ, CORNEL AJ, GUERS SL, DODGE M, MARZEC T, CARLSON JS, SEPPI B, SEHGAL RNM 2012. First evidence and predictions of *Plasmodium* transmission in alaskan bird populations. *PLoS ONE* 7(9): e44729.

LOYE JE, ZUK M 1991. *Bird-parasite interactions: ecology, evolution and behavior*. Oxford University Press, Oxford, 406 pp.

LOTTA IA, MATTA NE, TORRES RD, MORENO DE SANDINO M, MONCADA LI 2013. *Leucocytozoon fringillinarum* and *Leucocytozoon dubreuilii* in *Turdus fuscater* from a Colombian Páramo Ecosystem. *J. Paras.* 99(2): 359-362.

LUQUE C, TEJADA C 2013. Primer registro de Gaviotín de Pico Grande (*Phaetusa simplex*) en el Santuario Nacional Lagunas de Mejía y en la costa sur del Perú. *Bol. Inf. UNOP* 8(1): 06-09.

MATTA NE, PACHECO MA, ESCALANTE AA, VALKIŪNAS G, AYERBE-QUIÑONES, ACEVEDO-CENDALES LD 2014. Description and molecular characterization of *Haemoproteus macrovacuolatus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae), a morphologically unique blood parasite of black-bellied whistling duck (*Dendrocygna autumnalis*) from South America. *Paras. Res.* 113(8): 2991-3000.

MARINI MA, REINERT BL, BORNSCHEIN MR, PINTO JC, PICHORIM MA 1996. Ecological correlates of ectoparasitism on Atlantic Forrest birds, Brazil. *Ararajuba* 4: 93-102.

MARIANO-JELICICH, R., FAVERO, M. & SILVA, M.P. 2003. Fish prey of the Black Skimmer *Rynchops niger* at Mar Chiquita, Buenos Aires Province, Argentina. *Marine Ornith.* 31: 199-202.

MARTINSEN ES, PAPERNA I, SCHALL JJ 2006. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. *Parasitology* 133: 279-288.

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. Phil. Evol.* 47: 261-273.

MARZAL A, RICKLEFS RE, VALKŪNAS G, ALBAYRAK T, ARRIERO E, BONNEAUD C, CZIRJÁK GA, EWEN J, HELLGREN O, HOŘÁKOVÁ D, IEZHOVA TA, JENSEN H, KRIŽANAUSKIENĖ A *et al.* 2011. Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. *PLoS One* 6(7): e21905.

MCCALLUM H, DOBSON AP 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends Ecol. Evol.* 10: 190-194.

MASCARELLO NE, MOREIRA JS, WURDIG JBR, SANDER M 2005. Ampliação da zona de distribuição de talha-mar (*Rynchops niger* LINNAEUS, 1758) no Estado do Rio Grande Do Sul, Brasil. *Biodiv. Pampeana, PUCRS* 3: 19-20.

MELTZER DGA 1993. Historical survey of disease problems in wildlife population: southern Africa mammals. *J. Zoo Wildl. Med.* 24: 237-244.

MENDES L, PIERSMA T, LECOQ M, SPAANS B, RICKLEFS RE 2005. Disease-limited distributions? Contrasts in the prevalence of avian malaria in shorebird species using marine and freshwater habitats. *Oikos* 109: 396-404.

MERINO S, MORENO J, VÁSQUEZ RA, MARTÍNEZ J, SÁNCHEZ-MONSÁLVEZ I, ESTADES CF, IPPI S, SABAT P, ROZZI R, MCGEHEE S 2008. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. *Austral Ecol.* 33: 329-340.

MOLLER PA, NIELSEN JT 2007. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Ecol.* 88(4): 871-881.

MOTTA 2011. *Malária aviária em cracídeos: influências sobre a hematologia, bioquímica sanguínea e perfil eletroforético de proteínas plasmáticas*. Tese doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 140 pp.

MÜLLER A, BARROS MP 2013. Diversidade e abundância de aves costeiras em um trecho do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biotemas* 26(3): 163-175.

MURATTA K 2002. Prevalence of blood parasite in Japanese wild birds. *Parasitol.* 64(9): 785-790.

NEVES DP 2010. *Parasitologia Humana 11ª Ed*, Atheneu, São Paulo, 494 pp.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) 1998. Indicadores para o estabelecimento de políticas e a tomada de decisão em saúde pública. Genebra.

- OSOVSKY SA, KARESH WB, DEEM SL 2000. Conservation Medicine: a veterinary perspective. *Cons. Biol.* 14(2): 336-337.
- OWEN TM, PIERCE AR 2013. Hatching success and nest site characteristics of Black Skimmer (*Rynchops niger*) on the Isles Dernieres Barrier Island Refuge, Louisiana. *Waterbirds* 36(3): 342-347.
- PAGENKNOPP KM, KLICKA J, DURRANT KL, GARVIN JC, FLEISCHER RC 2008. Geographic variation in malaria parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). *Conserv. Genetics* 9: 1577-1588.
- PATZ JA 2002. A human disease indicator for the effects of recent global climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (20): 12506-08.
- PEIRCE MA, ADLARD RD 2005. The haemoproteidae of the Culicidae. *J. Nat. Hist.* 39: 2281-2287.
- PEREIRA MS, POERSCHKE F 2010. New bird records from Lagoa do Peixe National Park, southern Brazil. *Biotemas* 23(1): 241-246.
- PEREZ-TRIS J, HASSELQUIST D, HELLGREN O, KRIZANAUSKIENE A, WALDENSTRON J, BENSCH S 2005. What are malária parasites? *Trends Par.* 21: 209-211.
- PERKINS ME 1990. Cell biology of *Plasmodium*. In: Modern parasite biology: cellular, immunological, and molecular aspects (WYLER DJ, ed.). New York: W.H. Freeman and Company, cap. 1: 5-25.
- PERKINS SL, SCHALL JJ 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol.* 88: 972-978.
- PERONI N, HERNÁNDEZ MIM 2011. *Ecologia de populações*. Florianópolis: CCB/EAD/UFSC, pp 123.
- PETERS JL 1934. Check-list of Birds of the World Vol. 2. Cambridge: Harvard University Press, pp 547.
- PIERSMA T 1997. The global patterns of habitat use and migration strategies co-evolve with relative investments in immunocompetence due to spatial variation in parasite pressure? *Oikos* 80: 623-631.
- PILLAR VP, MÜLLER SC, CASTILHOS ZMS, JACQUES AVA 2009. *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*, Brasília: MMA, 403 pp.
- PULLIN AS, KNIGHT TM 2001. Effectiveness in conservation practice: pointers from medicine and public health. *Cons. Biol.* 15: 50-54.
- QUILLFELDT P, MARTÍNEZ J, HENNICKE J, LUDYNIA K, GLADBACH A, MASELLO JF, RIOU S, MERINO S 2010. Hemosporidian blood parasites in seabirds - A comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. *Natur Wiss.* 97(9): 809-817.

- RAEDER FL 2003. *Elaboração de Plano para Conservação e Manejo de Aves e Quelônios na Praia do Horizonte, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, AM*. Dissertação de Mestrado, INPA/FUA-Manaus, AM, 48 pp.
- RIBEIRO SF, SEBAIO F, BRANQUINHO FCS, MARINI MA, VAGO AR, BRAGA EM 2005. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitol.* 130: 261-267.
- RICHARD FA, SEHGAL RNM, JONES HI, SMITH T 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *J. Parasitol.* 88(4): 819-822.
- RICKLEFS RE 1992. Embryonic development period and prevalence of avian blood parasites. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 4722-4725.
- RICKLEFS RE, FALLON SM 2002. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. Royal Soc. London* 269: 885-892.
- RICKLEFS RE, FALLON SM, BERMINGHAM 2004. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Syst. Biol.* 53: 111-119.
- RICKLEFS RE, SWANSON B, FALLON SM, MARTÍNEZ-ABRAÍN A, SCHEUERLEIN A, GRAY J, LATTA SC 2005. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecol. Monograp.* 75: 543-559.
- ROSÁRIO LA 1996. *As aves em Santa Catarina: Distribuição geográfica e meio ambiente*. Florianópolis, FATMA. pp 329.
- SAMBROOK J, RUSSEL DW (Ed.) 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, CHSL Press. pp 2028.
- SANGUINETTI CJ, NETO ED, SIMPSON AJG 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.
- SANTA CRUZ ACM, BORDA JT, PATINO EM, GOMEZ L, ZUNINO GE 2000a. Habitat fragmentation and parasitismo in howler monkey (*Alouatta caraya*). *Neotrop. Primates* 8(4): 146-148.
- SAVAGE AF, GREINER EC 2004. Hematozoa of the avian family Brachypteraciidae (the ground-rollers). *J. Parasit.* 90: 1468-1472.
- SCOPEL KKG, FONTES CJF, NUNES AC, HORTA MF, BRAGA EM 2004. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitemias in a Brazilian Amazon endemic area. *Malaria J.* 3: 01-06.
- SCOTT ME 1988. The Impact of Infection and Disease on Animal Populations: Implications for Conservation Biology. *Cons. Biol.* 2: 40-56.

- SCHRENZEL MD, MAALOUF GA, KEENER LL, GAFFNEY PM 2003. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *J. Paras.* 89: 1025-1033.
- SHUTLER D, ANKNEY CD, DENNIS DG 1996. Could the blood parasite *Leucocytozoon* deter mallard range expansion? *J. Wildl. Manage.* 60(3): 569-580.
- SICK H 1997. *Ornitologia Brasileira*, Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 912 pp.
- SILVEIRA LF, OLMOS F 2007. Quantas espécies de aves existem no Brasil? Conceito de espécie, conservação e o que falta descobrir. *Rev. Bras. Ornit.* 15(2): 289-296.
- SCM 1996. SOCIEDADE CIVIL MAMIRAUÁ. *Mamirauá: Plano de Manejo*. Brasília: CNPq/MCT, Manaus: IPAAM, 96 pp.
- SOARES RKP, RODRIGUES AAF 2008. Distribuição espacial e temporal da avifauna aquática no Lago de Santo Amaro, Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses, Maranhão, Brasil. *Rev. Bras. Ornit.* 17(3-4): 173-182.
- SOL D, JOVANI R, TORRES J 2003. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia* 135: 542-547.
- STALLONES RA 1972. *Environment, ecology and epidemiology*. PAHO, Scientific Publication 231, 15 pp.
- STAMATAKIS A 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731-2739.
- TELFORD SR JR 1988. A contribution to the systematics of the reptilian malaria parasites, family Plasmodiidae (Apicomplexa: Haemosporina). *Bull. Fla. State Mus. Biol. Sci.* 34: 65-96.
- TEMPLE SA 1986. *Predicting impacts of habitat fragmentation on forest birds: a comparison of two models*. In: VERNER J, MORRISON M, RALPH C (Eds.), *Wildlife 2000: Modeling Habitat Relationships of Terrestrial Vertebrates*. University of Wisconsin Press, Madison: 301-304.
- TRINDADE RL, GORAYEB IS 2005. Atividade diária de maruins (Diptera: Ceratopogonidae) da zona costeira da Amazônia Oriental, Pará, Brasil. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi. Sér. Ciências Naturais* 1(3): 213-221.
- VALKIŪNAS G 1997. Bird haemosporida (in Russian). *Acta Zool. Lituanica* 3-5: a monograph, Vilnius: Institut. Ecol., 608 p.

VALKIŪNAS G 2005. *Avian malaria parasites and other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 932 pp.

VALKIŪNAS G, BENSCH S, IEZHOVA TA, KRIZANAUSKIENĖ A, HELLGREN O, BOLSHAKOV CV 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *J. Parasit.* 92: 418-22.

VALKIŪNAS G, IEZHOVA TA, KRIZANAUSKIENĖ A, PALINAUSKAS V, SEHGAL RN, BENSCH S 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *J. Parasitol.* 94: 1395-1401.

VAN RIPER III C, VAN RIPER SG, GOFF ML, LAIRD M 1986. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian landbirds. *Ecological Monographs* 56: 327-344.

VAN RIPER III C, ATKINSON CT, SEED TM 1994. Plasmodia of birds. In JP Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*, Academic Press, San Diego, p. 73-140.

VAN RENSBURG PJ, SKINNER JD, AARDE RJ 1987. Effects of feline panleucopenia on the population characteristics of feral cats on Marial Island. *J. Appl. Ecol.* 24: 63-73.

VARDO AM, WARGO AR, SCHALL JJ 2005. PCR detection of lizard malaria parasites: prevalence of *Plasmodium* infections with low-level parasitemia differs by site and season. *J. Parasitol.* 91(6): 1509-1511.

VASCONCELOS MF, PACHECO JF, PARRINI R 2007. Levantamento e conservação da avifauna na zona urbana de Marabá, Pará, Brasil. *Cotinga* 28: 45-52.

WALDENSTRÖM J, BENSCH S, KIBOI S, HASSELQUIST D, OTTOSSON U 2002. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol. Ecol.* 11: 1545-1554.

YOUNG BE, GARVIN MC, MCDONALD DB 1993. Blood parasites in birds from Monteverde, Costa Rica. *J. Wildl. Dis* 29: 555-560.

YORKE JA, NATHANSON N, PIANIGIANI G, MARTIN J 1979. Seasonality and the requirements for perpetuation and eradication of viruses in populations. *Am. J. Epidemiol.* 109: 103-123.

ANEXO 1



Instituto de Desenvolvimento
Sustentável Mamirauá

Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP/IDSM

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Ocorrência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - Amazonas**", sob Protocolo CEP IDSM 005/2012, que tem como responsável **Fernanda Lopes Roos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/IDSM), tendo sido aprovado na reunião de 04/10/2012. Este certificado tem validade até 03 de outubro de 2013.

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "**Occurrence of *Plasmodium* spp. in free-ranging birds in Mamirauá Sustainable Development Reserve**", submitted by **Fernanda Lopes Roos** under Protocol CEP IDSM 005/2012, is in accordance with the Ethical Principles for Research adopted by the Ethics Committee (CEP/IDSM). The protocol was approved on October 4, 2012 and this certificate is valid until October 3rd, 2013.

Tefé, 04 de outubro de 2012.

Dra. Miriam Marmontel
Coordenadora do CEP IDSM

Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
CNPJ: 03.119.820/0001-95 – Inscrição Estadual: Isenta
Estrada do Bexiga, nº 2584 - Bairro Fonte Boa - CEP 69470-000 - Tefé/AM - Brasil
PABX: +55-97-3343-4672 - FAX: +55-97-3343-4672
E-mail: mamiraua@mamiraua.org.br
HOME-PAGE: www.mamiraua.org.br

ANEXO 2

Instituto de Desenvolvimento
Sustentável Mamirauá - IDSM



Ministério da
Ciência e Tecnologia



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP/IDSM

PARECER CONSUBSTANCIADO
Reunião CEP 04 outubro 2012

Proponentes: Fernanda Lopes Roos
Projeto: Ocorrência de *Plasmodium* spp. em aves silvestres na Reserva de
Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - Amazonas
Submissão: 18/09/2012
No. Protocolo: 005/2012

O projeto foi submetido fisicamente, com as assinaturas não originais, em 18 de setembro de 2012. O CD contendo o material em formato eletrônico só foi submetido em 30 de setembro de 2012. Durante a reunião de avaliação foram entregues os documentos com assinaturas originais. O projeto foi protocolado em 18/09/2012, recebendo o número de protocolo CEP IDSM 005/2012. Todos os documentos solicitados foram disponibilizados, incluindo o parecer científico positivo de número 13/2012, comprovação de financiamento, currículo e cartas de aceite.

A proponente, aluna de mestrado do programa de pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pretende pesquisar a presença de hemoparasitas do gênero *Plasmodium* em aves aquáticas que ocorrem na RDS Mamirauá. O projeto se enquadra dentro das áreas Ciências Biológicas - Parasitologia - Malária constantes da tabela de áreas de conhecimento do CNPq.

A justificativa se baseia na importância da presença de hemoparasitos em aves como o indicador de variações na dinâmica populacional das espécies em estudo, especialmente considerando-se que trata-se de espécies migratórias.

O objetivo do trabalho é determinar a ocorrência de hemoparasitos em 3 espécies de aves silvestres aquáticas migratórias na região amazônica baseado no diagnóstico de infecções, relação da frequência do parasito com características biológicas das aves, caracterização da diversidade genética de isolados e correlação desta variabilidade com a biologia das aves.

O trabalho consiste em um projeto de mestrado, tem a previsão de duração de 2 anos, e se desenvolverá em áreas do setor Horizonte, concomitantemente às capturas do projeto "Aves em áreas e plantações: aspectos migratórios, reprodutivos e pressão de caça nas Reservas de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e Amanã, Amazonas", de Bianca Bernardon, protocolado e aprovado neste CEP sob número CEUAP 004/2011. A licença SISBIO de captura do projeto 004/2012 supre as necessidades das atividades do projeto ora em avaliação. O número amostral não foi definido previamente por depender da quantidade de aves a serem capturadas, salientando-se que a quantidade de aves previstas para captura e anilhamento (segundo projeto CEUAP 004/2011) é de 800 aves.

A proponente detalha a forma de captura e coleta de sangue, metodologias padrão normalmente utilizadas em estudos desta natureza; assim como as análises genéticas a serem desenvolvidas em laboratório. O grau de severidade envolvido na manipulação dos animais, incluindo a exposição a elementos físicos e/ou atmosféricos e o método de contenção mecânica

Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
CNPJ: 03.119.820/0001-95 – Inscrição Estadual: Isenta
Estrada do Bexiga, nº 2584 - Bairro Fonte Boa - CEP 69470-000 - Tefé/AM - Brasil
PABX: +55-97-3343-4672 - FAX: +55-97-3343-4672
E-mail: mamiraua@mamiraua.org.br
HOME-PAGE: www.mamiraua.org.br



e extração de sangue, foi classificado, pela proponente, como moderado. Não foi submetido um modelo de TCLE, por não ser adequado neste contexto.

Após a avaliação do protocolo, o CEP recomenda/solicita:

- na primeira oportunidade (antes do início das atividades de manipulação dos animais) seja feita uma reunião com a comunidade diretamente envolvida (Novo Horizonte) para esclarecer sobre os procedimentos adicionais aos de captura e anilhamento, e que esta reunião seja feita com a presença da pesquisadora Bianca Bernardon, ao qual o projeto está associado e sob cuja licença ele se desenvolverá
- se houver alteração significativa nos formulários, que seja encaminhado novo modelo ao CEP, para atualização (o CEP se torna co-responsável pela pesquisa)
- datas de relatório: parcial até 04 de abril de 2013; final até 01 de outubro de 2013
- validade do certificado: 03 de outubro de 2013

O projeto foi considerado aprovado.

Dra. Miriam Marmontel
Coordenadora do CEP IDSM

11/10/2012