

# **Prevalência, riqueza e padrões de hemosporídeos de aves (*Plasmodium* ssp., *Haemoproteus* ssp. e *Leucocytozoon* ssp.) em fragmento de Mata Atlântica**

**Responsável Técnico:** Marcos Robalinho Lima

**Equipe:** Guilherme Willrich, Larissa Corsini Calsavara, Gabriel Lima Medina Rosa

## **Introdução**

A taxa de doenças infecciosas emergentes tem aumentado nas últimas décadas, sendo que aproximadamente 45% dessas doenças provem de animais silvestres [1]. Fatores como urbanização, desenvolvimento agrícola, poluição, introdução de espécies invasoras e perda da biodiversidade têm uma forte contribuição para o aumento da incidência de doenças infecciosas emergentes [2,3]. Entretanto, um fator mais iminente no surgimento de doenças emergentes é o desmatamento, uma vez que esse altera processos ecológicos e evolutivos de todo um ecossistema [4], inclusive entre parasitas e hospedeiros [3,5]. Além disso, a expansão urbana leva à uma maior proximidade dos seres humanos com habitats naturais podendo levar ao surgimento de doenças emergentes oriundas de reservatórios de animais silvestres, como no caso da pandemia do HIV [6] e da primeira transmissão de malária pelo *Plasmodium falciparum* [7]. Mesmo sabendo do potencial de risco de extinção de espécies mediada por patógenos [2,8] e do risco de zoonoses de origem animal para os seres humanos [1], estudos referentes aos impactos da fragmentação na ecologia de doenças ainda são escassos [3]. Assim, é importante entender os mecanismos ecológicos e evolutivos envolvidos na propagação e diversificação de doenças infecciosas emergentes em vertebrados não humanos para uma maior avaliação do risco de extinção de espécies mediada por parasitas e para o melhor entendimento do surgimento dessas doenças em seres humanos.

A fragmentação florestal altera a suscetibilidade das espécies à agentes infecciosos de duas maneiras. Primeiramente, a fragmentação é responsável pela diminuição da diversidade genética devido à depressão endogâmica [9]. Segundo, a fragmentação proporciona o efeito de borda que é a alteração das características

bióticas e abióticas em até 400 m a dentro do fragmento [10], o que pode deixar a borda dos fragmentos mais suscetíveis a invasão de novos agentes infecciosos [2]. As introduções de patógenos trazem consequências sérias para biodiversidade podendo reduzir drasticamente as populações de espécies não adaptadas ao patógeno invasor podendo inclusive leva-las à extinção [11].

Haemosporidia (*Plasmodium* spp., *Leucocytozoon* spp. e *Haemoproteus* spp.) de aves são excelentes modelos de estudos, pois além de serem abundantes em todas as famílias de aves e apresentarem uma vasta distribuição geográfica [12], existe um excelente banco de dados (MalAvi) que disponibiliza as linhagens genéticas desses parasitas para todo o mundo, inclusive a localidade onde o parasita foi amostrado e as espécies de aves que as linhagens conseguem infectar [13].

Até o momento apenas dois estudos foram feitos avaliando a importância da fragmentação florestal na ocorrência desses haemosporídeos [5,14]. Ambos os estudos em florestas tropicais do Camarões e ambos compararam a ocorrência desses organismos em florestas perturbadas e pristinas. Entretanto, nenhum estudo avaliou como o efeito de borda pode alterar a interação entre esses haemosporídeos e seus hospedeiros. Como uma das consequências do efeito de borda é a modificação da comunidade de aves [15], espera-se que as interações entre as aves e seus parasitas também seja modificada. Este processo pode aumentar a transmissão de algumas linhagens de haemosporida, inclusive, novos patógenos podem ser introduzidos na comunidade (poluição patogênicas) [3]. Por exemplo, depois da introdução do *P. relictum* no arquipélago do Hawaí, várias espécies endêmicas foram extintas como consequência direta da introdução desse parasita [16].

Este estudo traz importantes implicações para populações de aves da Mata Atlântica, uma vez que estas aves podem estar mais suscetíveis a ocorrência de parasitas devido a forte fragmentação florestal deste Bioma. Assim, é de extrema importância monitorar e entender melhor a influência do processo de fragmentação na ocorrência desses parasitas.

## **Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é de iniciar um monitoramento da ocorrência de haemosporídeos de aves no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) com o intuito de estudar como o processo de fragmentação interfere na interação desses parasitas

com seus hospedeiros vertebrados. Como proposta inicial será avaliado se existe uma diferença na prevalência (proporção de indivíduos infectados) e composição de linhagens de haemosporídeos de aves que se encontram na borda e no interior do PEMG. Para este estudo serão utilizados a malária aviária (*Plasmodium spp.*) e outros haemosporídeos (*Leucocytozoon spp.* e *Haemoproteus spp.*) de aves como modelos de estudo.

Este estudo será inserido no escopo das linhas de pesquisa “Biodiversidade e Conservação em Habitats Fragmentados” do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e será executado em colaboração com o professores e pesquisadores da proposta de Sítio PELD – Mata Atlântica do Norte do Paraná – que conta com vários pesquisadores e professores da UEL na equipe permanente do projeto. Assim, este projeto vem a adicionar uma nova perspectiva ao estudo de fragmentação da Mata Atlântica do Norte do Paraná, com o intuito de melhor entender as possíveis consequências ecológicas e evolutivas decorrentes da fragmentação na interação entre parasita e hospedeiro. O projeto já foi aprovado do comitê de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (nº 8788.2014.41)

### **Objetivo Específico**

Esse estudo tem como objetivo específico responder as seguintes perguntas”

1. Existe uma diferença na prevalência e riqueza de haemosporídeos de aves entre o interior e a borda do PEMG?
2. Existe uma diferença na composição de espécies de aves e haemosporídeos entre o interior e a borda do PEMG?
3. No caso de linhagens de haemosporídeos que ocorram tanto no interior como na borda do PEMG, haverá diferenças em suas ocorrências?

### **Métodos**

Área de Estudo - O estudo ocorrerá no Parque Estadual Mata do Godoy (PEMG)– 23° 27’Sul e 51° 15’Oeste – que fica a 15 Km de Londrina (PR) e tem uma área de 656 ha. Este Parque Estadual é uma importante unidade de conservação do Norte do Paraná

para o Bioma da Mata Atlântica, sendo composto por Floresta Estacional Semidecídua.

Censo da aves - O censo das aves será conduzida pela equipe do Laboratório de Ornitologia e Bioacústica do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da UEL coordenado pelo Prof. Luiz dos Anjos como parte do projeto de monitoramento de aves no Sítio PELD – Mata Atlântica do Norte do Paraná.

Captura das aves - As aves serão capturadas com redes de neblina durante o período da manhã e serão abertas 15 minutos antes do nascer do sol e serão fechadas as 11:00 da manhã. As redes serão verificadas a cada 15 minutos afim de reduzir qualquer stress devido à captura [17]. A captura ocorrerá entre Outubro de 2014 e Setembro de 2015. Como nem todos os indivíduos capturados estarão infectados (aproximadamente 30% dos indivíduos devem estar infectados), iremos tentar capturar até 60 indivíduos das espécies mais abundantes no PEMG. Estima-se que entre 100-150 indivíduos serão capturados por ano.

Medidas morfológicas - As seguintes medidas serão feitas: (i) comprimento da asa; (ii) comprimento do tarso; (iii) comprimento do bico; (iv); largura do bico; (v) altura do bico; (vi) comprimento da cauda; (vii) comprimento total; e (viii) peso. As aves também serão anilhadas com anilhas metálicas do CEMAVE. Os métodos de medidas seguiram o de Ross [17].

Obtenção de amostras sanguíneas - As amostras de sangue serão obtidas da veia braquial/ulnar com a utilização de agulhas descartáveis e capilares. O volume de sangue a ser retirado é de 80ul. Recomenda-se que o volume máximo a ser coletado de animais saudáveis seja de 1% do peso vivo do animal. Assim, 80ul corresponde a 0,8% do peso de um ave de 10g. Essa é uma margem segura para que se tenha amostra de sangue suficiente para se fazer 2 esfregaços sanguíneos e que ainda seja possível extrair DNA (aproximadamente 500 ng) para as análises moleculares. Aves que apresentem um peso menor que 10 g, serão retirados o equivalente a 0,5% do seu peso. Assim, para uma ave de 8g serão retirados um volume de 40 ul (metade de um capilar). Nesse caso a amostra será utilizada apenas para as análises moleculares. Os procedimentos para coleta de amostras de sangue seguem Braga et al. [18].

Microscopia - Os esfregaços serão fixados com metanol 100% no campo e depois corados com GIEMSA 1% no laboratório na semana seguinte. Aproximadamente

15.000 eritrócitos (100 campos visuais com uma média cada de 150 eritrócitos) serão examinados para determinar a existência de infecção por mais de uma espécie de haemosporídeo e para estimar a intensidade de infecção (parasitemia). Para esta análise, apenas lâminas que apresentarem uma distribuição homogênea de eritrócitos, e que estiverem em boas condições (condições ótimas de fixação e coloração), serão analisadas. Para as aves infectadas, os haemosporídeos serão identificados até gênero (*Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*) e a intensidade do parasita será calculada como a porcentagem de parasitas para cada 15.000 eritrócitos como sugerido por Godfrey [19]

Procedimentos laboratoriais – As amostras de sangue serão armazenadas em etanol 95% em tubos de 1,5 ml a -20°C no museu de zoologia da Universidade Estadual de Londrina. Serão utilizados os marcadores moleculares desenvolvidos por Hellgreen et al. [20] para identificação e sequenciamento das linhagens de haemosporídeos. O protocolo de amplificação a ser utilizado para estes marcadores será o de Lima et al. [21]. Os procedimentos laboratoriais serão desenvolvidos na Universidade Estadual de Londrina no ano de 2015, mas a parceria com os laboratórios ainda está sendo consolidada.

### **Resultados Esperados**

Esperamos encontrar uma diferença na prevalência e riqueza de linhagens de haemosporídeos de aves entre a borda e o centro do PEMG. Os dados devem corroborar com a hipótese do “efeito diluidor”, onde as áreas com uma menor riqueza de aves devem apresentar uma maior prevalência de haemosporídeos. Entretanto, devido a natureza complexa de sistemas de parasitismo que envolvem vetores, é difícil de afirmar como será o “turnover” de linhagens de haemosporídeos para as espécies que ocorrem tanto no centro como na borda, como nos diferentes tipos florestais do PEMG. Mas esperamos que a composição das linhagens reflita a composição de espécies de aves nesses diferentes locais do PEMG. Por exemplo, esperamos encontrar linhagens mais generalistas (que infectam mais de uma espécie de ave) no centro do PEMG que deve apresentar uma maior riqueza de aves.

Esperamos obter com o fim deste projeto um melhor entendimento de como o efeito de fragmentação interfere com o sistema parasita-hospedeiro, ao avaliar como a composição destas entidades mudam entre a borda e o interior do PEMG. Além do

mais, poderemos averiguar se será necessário desenvolver medidas mitigatórias quanto a ocorrência de haemosporídeos para o PEMG que é de tremenda importância na conservação da Mata Atlântica do Norte do Paraná. Esse projeto dará início a linha de pesquisa do Dr. Marcos Lima (recém aprovado no concurso para professores da UEL) junto ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do departamento de Biologia Animal e Vegetal da UEL.

## Referências

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, et al. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993.
2. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.
3. Sehgal RNM (2010) Deforestation and avian infectious diseases. *Journal of Experimental Biology* 213: 955-960.
4. Smith TB, Bernatchez L (2008) Evolutionary change in human-altered environments. *Molecular Ecology* 17: 1-8.
5. Chasar A, Loiseau C, Valkiūnas G, Iezhova T, Smith TB, et al. (2009) Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology* 18: 4121-4133.
6. Keele BF (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
7. Rich SM, Leendertz FH, Xu G, LeBreton M, Djoko CF, et al. (2009) The origin of malignant malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14902-14907.
8. Smith KF, Sax DF, Lafferty KD (2006) Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology* 20: 1349-1357.
9. Brearley G, Rhodes J, Bradley A, Baxter G, Seabrook L, et al. (2012) Wildlife disease prevalence in human-modified landscapes. *Biological Reviews*.
10. Laurance W (2008) Theory meets reality: How habitat fragmentation research has transcended island biogeographic theory. *Biological Conservation* 141: 1731-1744.
11. Smith KF, Acevedo-Whitehouse K, Pedersen AB (2009) The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation* 12: 1-12.
12. Valkiūnas G (2005) *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*: CRC. 932 p.
13. 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. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353-1358.
14. Bonneaud C, Sepil I, Milá B, Buermann W, Pollinger J, et al. (2009) The prevalence of avian Plasmodium is higher in undisturbed tropical forests of Cameroon. *Journal of Tropical Ecology* 25: 439-447.

15. Boulinier T, Nichols JD, Hines JE, Sauer JR, Flather CH, et al. (2001) Forest fragmentation and bird community dynamics: inference at regional scales. *Ecology* 82: 1159-1169.
16. van Riper C, van Riper SG, Goff ML, Laird M (1986) The epidemiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs* 56: 327-344.
17. Ross AL (2010) Capturando aves. In: Matter SV, Straube FC, Accordi I, Piacentini V, Cândido-Jr JF, editors. *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. pp. 77-104
18. Braga É, Belo N, Pinheiro RT (2010) Técnicas para estudo de hemoparasita em aves. In: Matter SV, Straube FC, Accordi I, Piacentini V, Cândido-Jr JF, editors. *Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento*. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. pp. 395-411.
19. Godfrey R (1987) Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 558-565.
20. Hellgren O, Waldenström J, Bensch S (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 797-802.
21. Lima MR, Simpson L, Fecchio A, Kyaw CM (2010) Low prevalence of haemosporidian parasites in the introduced house sparrow (*Passer domesticus*) in Brazil. *Acta Parasitologica* 55: 297-303.