

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

CYNTHIA MARTINS VILLAR

**PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
HEMOPARASITAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E
AFRICANAS DE *Bulbucus ibis* (ARDEIDAE, PELECANIIFORMES,
AVES)**

SÃO CARLOS

2013

**PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
HEMOPARASITAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E
AFRICANAS DE *Bulbucus ibis* (ARDEIDAE, PELECANIIFORMES,
AVES)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

CYNTHIA MARTINS VILLAR

**PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
HEMOPARASITAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E
AFRICANAS DE *Bulbucus ibis* (ARDEIDAE, PELECANIIFORMES,
AVES)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Evolução,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências e
Genética e Evolução. *Orientação: Profa.
Dra. Sílvia Nassif Del Lama*

SÃO CARLOS

2013

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

V719pi

Villar, Cynthia Martins.

Prevalência e identificação de linhagens de hemoparasitas em populações brasileiras e africanas de *Bulbucus ibis* (Ardeidae, Pelecaniiformes, Aves) / Cynthia Martins Villar. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Genética. 2. Garça-vaqueira. 3. *Plasmodium*. 4. *Haemoproteus*. 5. Reação em cadeia de polimerase. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

"PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
HEMOPARASITAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E AFRICANAS
DE *Bulbucus ibis* (ARDEIDAE, PELECANIIFORMES, AVES)".

Dissertação de Mestrado de

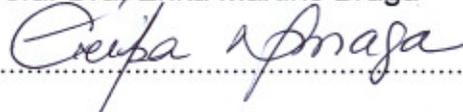
CYNTHIA MARTINS VILLAR

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama



Profa. Dra. Érika Martins Braga



Prof. Dr. José Salvatore Leister Patané



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“PREVALÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS DE
HEMOPARASITAS EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS E AFRICANAS
DE *Bulbucus ibis* (ARDEIDAE, PELECANIFORMES, AVES)”.**

CYNTHIA MARTINS VILLAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

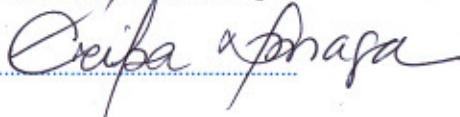
Submetida à defesa pública no dia 22/03/2013, tendo sido

aprovada

Presidente: Profa. Dra. Sílvia Nassif Del Lama



Membros: Profa. Dra. Érika Martins Braga



Prof. Dr. José Salvatore Leister Patané



Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na 273 Reunião Ordinária da CPG, em 05/04/13

Presidente: 

Membros: 



Soli Deo gloria

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo amor, fé e apoio incondicionais durante todos os anos da graduação, pós graduação e de minha vida.

Agradeço o meu noivo por todo o carinho e apoio (inclusive por me ajudar a padronizar as referências, tabelas, resumo,...).

Agradeço à Profa. Sílvia por acreditar no meu trabalho e ter contribuído para moldar o meu perfil acadêmico e profissional.

Agradeço aos colegas de laboratório toda a paciência e camaradagem, principalmente no início do meu trabalho no Laboratório de Genética de Aves. Agradeço ainda aos colegas que coletaram amostras de sangue de *Bubulcus ibis* (Emmanuel, Emeline, Andiara, Carlos, Elaine).

Agradeço nossa técnica de laboratório, a Regina, pelo auxílio e paciência durante o tempo que trabalhamos juntas, e pela amizade que existe até hoje.

Agradeço as dificuldades que surgiram ao longo do caminho, porque com elas produziram conhecimento e experiência.

Por fim, agradeço a Deus, quem fez tudo isso ser possível.

RESUMO

A garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*), nativa da África, invadiu o continente americano no final do século XIX, iniciando o processo de colonização pelo norte da América do Sul e se espalhando por toda a área do continente. Os hemoparasitas são encontrados em todos os continentes do mundo, com exceção da Antártida e em testes preliminares verificamos que estão presentes na população de garça vaqueira. Os objetivos desse trabalho foram estimar a prevalência dos hemoparasitas, *Plasmodium* e *Haemoproteus*, nas populações de *B. ibis* africanas e brasileiras e identificar o repertório das linhagens nessas populações. Amostras de sangue e lâminas foram obtidas de ninhegos de *B. ibis* em seis populações brasileiras e em 14 populações africanas, localizadas na costa oeste, totalizando cerca 859 indivíduos. Para o diagnóstico molecular, foram amplificados fragmentos do gene do citocromo B do *Plasmodium* spp e do *Hemoproteus* spp . O DNA do parasita dos indivíduos infectados foi sequenciado e a identificação do gênero e das linhagens presentes foi feita por análise filogenética pelo método bayesiano no programa Mr. Bayes. Esses resultados foram parcialmente confirmados com o diagnóstico morfológico. As prevalências da África para o gênero *Plasmodium* decresceram de Senegal e Guiné Bissau para a África do Sul, ao passo que as brasileiras aumentaram do Pará para o Rio Grande do Sul. As diversidades das linhagens africanas de *Plasmodium* spp. foram maiores nas regiões próximas e acima à linha do Equador; a maior diversidade brasileira foi encontrada próximo ao Equador também. O teste estatístico G par a par não revelou diferença entre as prevalências das populações de garças vaqueiras africanas e brasileiras, tanto para o gênero *Plasmodium* quanto para o *Haemoproteus*. Foi detectada diferença significativa com relação à riqueza das linhagens do gênero *Plasmodium* encontradas

na África e no Brasil, confirmando parcialmente as previsões da Hipótese da Liberação do Inimigo. Algumas evidências apontaram para os países africanos próximos e acima da linha do Equador como populações fonte-fundadora africana de garças vaqueiras que colonizaram o Brasil.

ABSTRACT

The cattle egret (*Bubulcus ibis*), native from Africa, invaded the American continent by the end of the XIX century, initiating the process of colonization through the north of South America and spreading throughout the continent. Haemoparasites are found in all continents in the world, with the exception of Antarctica, and in preliminary tests it was verified they are present in the cattle egret population. The objectives of this work were to estimate the prevalence of the haemoparasites *Plasmodium* and *Haemoproteus* on African and Brazilian populations of *B. ibis* and to identify the repertoire of the lineages in these populations. Blood samples and blood slides were acquired from *B. ibis* nestlings in six Brazilian populations and in 15 African populations, located at the west coast, totalling around 859 individuals. For the molecular diagnosis, fragments of the cytochrome B gene of the *Plasmodium* spp. and the *Haemoproteus* spp. were amplified. The DNA of the parasite in the infected individuals was sequenced and the identification of the genus and the lineages present was performed through phylogenetic analysis via the Bayesian method using the Mr. Bayes software. These results were partially confirmed by the morphological diagnosis. The prevalences in Africa for the *Plasmodium* genus decreased from Senegal and Guinea-Bissau to South Africa, while Brazilian prevalences increased from Pará to Rio Grande do Sul. The diversities of African lineages of *Plasmodium* spp. were higher in regions close to and above the Equator line; the highest Brazilian diversity was also found near the Equator. The G pair to pair statistical test did not reveal difference between the prevalences of African and Brazilian cattle egret populations, both for the *Plasmodium* and for the *Haemoproteus*

genera. Significant difference was detected relative to the richness of the lineages of the *Plasmodium* genus found in Africa and Brazil, partially confirming the predictions of the Enemy Release Hypothesis. Some evidence points to African countries near and above the Equator line as African source-founder populations of the cattle egret that colonized Brazil.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. ESTADOS BRASILEIROS ONDE FOI FEITA A COLETA, NÚMERO DE AMOSTRAS DE SANGUE E COORDENADAS DAS COLÔNIAS VISITADAS. | 36 |
| TABELA 2 PAÍSES E LOCALIDADES DA COLETA NO CONTINENTE AFRICANO, SUAS COORDENADAS E NÚMERO DE AMOSTRAS DE SANGUE. | 36 |
| TABELA 3. PREVALÊNCIA DOS HEMOPARASITAS <i>PLASMODIUM</i> E <i>HAEMOPROTEUS</i> NOS PAÍSES AMOSTRADOS NO CONTINENTE AFRICANO..... | 45 |
| TABELA 4. LATITUDES, NÚMERO DE HAPLÓTIPOS, E ÍNDICES DE DIVERSIDADE (NÚMERO DE HAPLÓTIPOS / NÚMERO DE INFECTADOS) NOS PAÍSES AMOSTRADOS NO CONTINENTE AFRICANO. P = <i>PLASMODIUM</i> ; H = <i>HAEMOPROTEUS</i> | 47 |
| TABELA 5. NÚMERO DE INDIVÍDUOS AMOSTRADOS E PREVALÊNCIA DE HEMOPARASITAS (<i>PLASMODIUM</i> E <i>HAEMOPROTEUS</i>) NOS ESTADOS AMOSTRADOS DO TERRITÓRIO BRASILEIRO. | 56 |
| TABELA 6. LATITUDES, NÚMERO DE HAPLÓTIPOS, ÍNDICE DE DIVERSIDADE (NÚMERO DE HAPLÓTIPOS / NÚMERO DE INFECTADOS) DOS HEMOPARASITAS <i>PLASMODIUM</i> E <i>HAEMOPROTEUS</i> NAS REGIÕES DO BRASIL. P = <i>PLASMODIUM</i> , H = <i>HAEMOPROTEUS</i> | 58 |
| TABELA 7. COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE RIQUEZAS DOS HAPLÓTIPOS COMPARTILHADOS DE <i>PLASMODIUM</i> E NAS POPULAÇÕES DO HOSPEDEIRO NOS PAÍSES AFRICANOS (ÁREA NATIVA) E NAS REGIÕES BRASILEIRAS (ÁREA COLONIZADA). O VALOR DE N CORRESPONDE AO TOTAL DE INDIVÍDUOS COLETADOS NA REGIÃO. | 65 |
| TABELA 8. ÍNDICES DE RIQUEZA DOS HAPLÓTIPOS ENCONTRADAS NAS POPULAÇÕES DO HOSPEDEIRO SOMENTE NO BRASIL. O VALOR DE N CORRESPONDE AO TOTAL DE INDIVÍDUOS COLETADOS NO ESTADO OU NA REGIÃO. | 65 |
| TABELA 9. ÍNDICES DE RIQUEZA DOS HAPLÓTIPOS ENCONTRADAS NAS POPULAÇÕES DO HOSPEDEIRO SOMENTE NA ÁFRICA. O VALOR DE N CORRESPONDE AO TOTAL DE INDIVÍDUOS COLETADOS NO PAÍS. | 66 |
| TABELA 10. HAPLÓTIPOS ENCONTRADOS E OS HOSPEDEIROS CORRESPONDENTES ONDE FORAM IDENTIFICADOS. AS CORES REPRESENTAM OS PAÍSES AFRICANOS E A REGIÕES BRASILEIRAS AMOSTRADAS. | 96 |
| TABELA 11. CONVENÇÃO ADOTADA PARA IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE HEMOPARASITAS. | 97 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ROTA DE INVASÃO..... | 17 |
| FIGURA 2. MODELO CÍCLICO. | 18 |
| FIGURA 3. DATAS DOS PRIMEIROS RELATOS DA PRESENÇA DE <i>B. IBIS</i> NA AMÉRICA DO SUL..... | 21 |
| FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO CICLO DE VIDA DO GÊNERO <i>PLASMODIUM</i> EM AVES (<i>P. RELICTUM</i> COMO EXEMPLO). (EXTRAÍDO E ADAPTADO DE VALKIUNAS, 2005). A PARTE DE CIMA CORRESPONDE AO VETOR E A PARTE DE BAIXO CORRESPONDE À AVE. I, II – MEROGONIA EXOERITROCÍTICA PRIMÁRIA; III – MEROGONIA EXOERITROCÍTICA; IV – MEROGONIA EXOERITROCÍTICA SECUNDÁRIA; 1 – ESPOROZOÍTO NA CÉLULA DO RETÍCULO ENDOTELIAL; 2, 3 – CRIPTOZOÍTOS; 4 – MEROZOÍTO NO MACRÓFAGO; 5, 6 – METACRIPTOZOÍTOS; 7 – MEROZOÍTOS EM ERITRÓCITOS; 8 – GAMETÓCITOS; 9 – MEROZOÍTO NO ERITRÓCITO; 10, 11 – MERONTES ERITROCÍTICOS; 12 – MEROZOÍTO NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DOS CAPILARES; 13, 14 – FANEROZOÍTOS; 15 – MEROZOÍTOS EM ERITRÓCITOS; 16 – GAMETÓCITOS; 17 – MACROGAMETA; 18 – “EXOFLAGELAÇÃO” DE MICROGAMETAS; 19 – FERTILIZAÇÃO DO MACROGAMETA; 20 – OOCINETO PENETRANDO A MEMBRANA PERITRÓFICA; 21 – OOCISTO JOVEM; 22, 23 – ESPOROGONIA; 24 – ESPOROZOÍTOS NA GLÂNDULA SALIVAR DO VETOR | 24 |
| FIGURA 5. CICLO DE VIDA SIMPLIFICADO DE <i>PLASMODIUM</i> SP. | 25 |
| FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DO CICLO DE VIDA DO GÊNERO <i>HAEMOPROTEUS</i> EM AVES (<i>H. MANSONI</i> COMO EXEMPLO). (EXTRAÍDO E ADAPTADO DE VALKIUNAS, 2005). A PARTE DE CIMA CORRESPONDE AO VETOR E A PARTE DE BAIXO CORRESPONDE À AVE. 1 – ESPOROZOÍTO NA CÉLULA DO RETÍCULO ENDOTELIAL; 2, 3 – MERONTES EXOERITROCÍTICOS DA PRIMEIRA GERAÇÃO COM MEROZOÍTOS ALONGADOS; 4 – MEROZOÍTO NA CÉLULA ENDOTELIAL; 5, 6 – MEGALOMERONTES CRESCENDO E MADUROS EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS, RESPECTIVAMENTE; 7 – MEROZOÍTOS EM ERITRÓCITOS; 8 – GAMETÓCITOS MADUROS; 9 – MEROZOÍTO NA CÉLULA RETICULOENDOTELIAL NO BAÇO; 10, 11 – MERONTES EM CRESCIMENTO E MADUROS NO BAÇO, RESPECTIVAMENTE; 12 – MEROZOÍTO NOS ERITRÓCITOS; 13 – GAMETÓCITOS MADUROS; 14 – MACROGAMETA; 15 – “EXOFLAGELAÇÃO” DE MICROGAMETAS ; 16 – FERTILIZAÇÃO DO MACROGAMETA; 17 – OOCINETO PENETRANDO A MEMBRANA PERITRÓFICA; 18 – OOCISTO JOVEM; 19, 20 - ESPOROGONIA; 21 – ESPOROZOÍTOS NA GLÂNDULA SALIVAR DO VETOR. | 27 |
| FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DO CICLO DE VIDA DO GÊNERO <i>LEUCOCYTOZOOM</i> EM AVES (<i>L. SIMONDI</i> COMO EXEMPLO). (EXTRAÍDO E ADAPTADO DE VALKIUNAS, 2005). A PARTE DE CIMA CORRESPONDE AO | |

| | |
|---|----|
| <p>VETOR E A PARTE DE BAIXO CORRESPONDE À AVE. 1 – ESPOROZOÍTO OU MEROZOÍTO NA CÉLULA PARENQUIMAL DO FÍGADO (HEPATOCISTO); 2 - 4 – MERONTES HEPÁTICOS; 5 – MEROZOÍTO NOS ERITRÓCITOS; 6 – GAMETÓCITOS EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS ARREDONDADAS; 7 – SINCÍCIO OU MEROZOÍTO EM CÉLULAS RETICULOENDOTELIAIS; 8 - 9 – MEGALOMERONTES; 10 – MEROZOÍTOS EM LEUCÓCITOS MONONUCLEARES; 11 – GAMETÓCITOS EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS FUSIFORMES; 12 – MACROGAMETA; 13 – “EXOFLAGELAÇÃO” DE MICROGAMETAS ; 14 – FERTILIZAÇÃO DO MACROGAMETA; 15 – OOCINETO PENETRANDO A MEMBRANA PERITRÓFICA; 16 – OOCISTO JOVEM; 17, 18 - ESPOROGONIA; 19 – ESPOROZOÍTOS NA GLÂNDULA SALIVAR DO VETOR.....</p> | 29 |
| <p>FIGURA 8. REGIÕES ONDE ESTÃO LOCALIZADAS AS COLÔNIAS REPRODUTIVAS DE <i>B. IBIS</i> AMOSTRADAS NO BRASIL E NO CONTINENTE AFRICANO.....</p> | 35 |
| <p>FIGURA 9. ESQUEMA GRÁFICO DO CICLO MODIFICADO PARA O PAR DE PRIMERS HAEMNF₁ E HAEMNR₃.</p> | 39 |
| <p>FIGURA 10. ESQUEMA GRÁFICO DO CICLO MODIFICADO PARA O PAR DE PRIMERS HAEMNF E HAEMNR₂.</p> | 40 |
| <p>FIGURA 11. ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR INFERÊNCIA BAYESIANA MOSTRANDO AS RELAÇÕES ENTRE AS LINHAGENS DE HEMOPARASITAS DO CONTINENTE AFRICANO E AS MORFOESPÉCIES OBTIDAS NA LITERATURA E NO BANCO DE DADOS MALAVI, FORAM USADOS 97 HAPLÓTIPOS PRODUZIDOS NESSE ESTUDO, 22 DO BANCO DE DADOS (16 DO GÊNERO <i>PLASMODIUM</i> 6 DO GÊNERO <i>HAEMOPROTEUS</i>) E 15 DO TRABALHO DE CUMMING ET AL, 2012. GRUPO EXTERNO: <i>P. FALCIPARUM</i>.</p> | 44 |
| <p>FIGURA 12. PREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES PELOS GÊNEROS <i>PLASMODIUM</i> (EM AZUL) E <i>HAEMOPROTEUS</i> (EM VERMELHO) NOS PAÍSES AFRICANOS. O ERRO PADRÃO ESTÁ MOSTRADO PELAS BARRAS EM PRETO.</p> | 46 |
| <p>FIGURA 13. DIVERSIDADE DOS HAPLÓTIPOS DO GÊNERO <i>PLASMODIUM</i> (EM AZUL) E <i>HAEMOPROTEUS</i> (EM VERMELHO). O ERRO PADRÃO É MOSTRADO PELAS BARRAS EM PRETO.....</p> | 48 |
| <p>FIGURA 14. CURVA DAS FREQUÊNCIAS DAS DIFERENÇAS PAREADAS ENCONTRADAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DOS HEMOPARASITAS ENCONTRADOS NO CONTINENTE AFRICANO.....</p> | 49 |
| <p>FIGURA 15. REDE DE HAPLÓTIPOS CONSTRUÍDA A PARTIR DAS LINHAGENS DO CLADO 1 DA FIGURA 11 DOS HEMOPARASITAS AFRICANOS.....</p> | 50 |
| <p>FIGURA 16. REDE DE HAPLÓTIPOS DO CLADO2 DA FIGURA 11 DAS LINHAGENS DOS HEMOPARASITAS AFRICANOS.....</p> | 50 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 17. ÁRVORE COM TODAS AS LINHAGENS (ÁFRICA E BRASIL) EM CLADOS CONDENSADOS (À ESQUERDA) E O DETALHAMENTO DOS CLADOS 1, 2, 3, 4, 5 E 6 (À DIREITA). GRUPO EXTERNO: <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> | 53 |
| FIGURA 18. ÁRVORE FILOGENÉTICA OBTIDA POR INFERÊNCIA BAYESIANA COM AS LINHAGENS DE HEMOPARASITAS DO CONTINENTE AFRICANO E DO BRASIL, JUNTO COM MORFOESPÉCIES OBTIDAS NA LITERATURA E LINHAGENS DO BANCO DE DADOS MALAVI. FORAM INCLUÍDOS NA ANÁLISE 97 HAPLÓTIPOS PRODUZIDOS NESSE ESTUDO E 22 DE BANCO DE DADOS (16 DO GÊNERO <i>PLASMODIUM</i> 6 DO GÊNERO <i>HAEMOPROTEUS</i>) GRUPO EXTERNO: <i>P. FALCIPARUM</i> | 55 |
| FIGURA 19. PREVALÊNCIA DOS GÊNEROS <i>PLASMODIUM</i> (EM AZUL) E <i>HAEMOPROTEUS</i> (EM VERMELHO) NAS REGIÕES BRASILEIRAS. O ERRO PADRÃO É MOSTRADO PELAS BARRAS EM PRETO. | 57 |
| FIGURA 20. DIVERSIDADE DE LINHAGENS DOS GÊNEROS <i>PLASMODIUM</i> (EM AZUL) E <i>HAEMOPROTEUS</i> (EM VERMELHO) NOS PAÍSES AFRICANOS E REGIÕES BRASILEIRAS. O ERRO PADRÃO É MOSTRADO PELAS BARRAS EM PRETO. | 58 |
| FIGURA 21. FREQUÊNCIA DAS DIFERENÇAS PAREADAS ENCONTRADAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE HEMOPARASITAS IDENTIFICADOS NA ÁFRICA E NO BRASIL | 59 |
| FIGURA 22. PREVALÊNCIAS DOS GÊNEROS <i>PLASMODIUM</i> (EM AZUL) E <i>HAEMOPROTEUS</i> (EM VERMELHO) NOS PAÍSES AFRICANOS E REGIÕES BRASILEIRAS. O ERRO PADRÃO É MOSTRADO PELAS BARRAS EM PRETO. | 60 |
| FIGURA 23. DIVERSIDADE DE LINHAGENS DOS GÊNEROS <i>PLASMODIUM</i> (EM AZUL) E <i>HAEMOPROTEUS</i> (EM VERMELHO) NOS PAÍSES AFRICANOS E REGIÕES BRASILEIRAS. O ERRO PADRÃO É MOSTRADO PELAS BARRAS EM PRETO. | 61 |
| FIGURA 24. REDE DE HAPLÓTIPOS DO CLADO1 (FIGURA 15) DAS LINHAGENS AFRICANAS E BRASILEIRAS. | 62 |
| FIGURA 25. REDE DE HAPLÓTIPOS DO CLADO 2 (FIGURA 16) , INCLUINDO LINHAGENS AFRICANAS E BRASILEIRAS..... | 62 |
| FIGURA 26. REDE DE HAPLÓTIPOS DO CLADO 3 DAS LINHAGENS AFRICANAS E BRASILEIRAS..... | 63 |
| FIGURA 27. HISTOGRAMA COM AS FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS COMPARTILHADOS COM AS REGIÕES ONDE FORAM ENCONTRADOS. | 64 |
| FIGURA 28. HISTOGRAMA COM A FREQUÊNCIA DO HAPLÓTIPO COMPARTILHADO DE NÚMERO 22 COM AS REGIÕES ONDE ELE FOI ENCONTRADO. | 64 |
| FIGURA 29. GRÁFICO DAS PORCENTAGENS DE SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS APRESENTADAS NESSE TRABALHO EM RELAÇÃO ÀS LINHAGENS DEPOSITADAS NO GENBANK. AS PORÇÕES DESTACADAS EM VERDE E AZUL NO GRÁFICO CORRESPONDEM ÀS LINHAGENS INÉDITAS RELATADAS NESSE TRABALHO. A | |

| | |
|---|----|
| FATIA VERDE DESTACA UMA PARTE DAS LINHAGENS QUE TEM 97% DE SIMILARIDADE COM A LINHAGEM JÁ DESCRITA PAPOL06 (LACORTE ET AL, 2013)..... | 67 |
| FIGURA 30. MAPA DA DO CONTINENTE AFRICANO COM OS LOCAIS DE COLETA E AS PREVALÊNCIAS ENCONTRADAS. | 71 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 Biologia da invasão | 16 |
| 1.2 A garça vaqueira, <i>Bubulcus ibis</i> (LINNAEUS, 1758)..... | 19 |
| 1.3 Os Hemoparasitas..... | 22 |
| 1.3.1 Ciclo de vida do gênero <i>Plasmodium</i> | 23 |
| 1.3.2 Ciclo de vida do gênero <i>Haemoproteus</i> | 26 |
| 1.3.3 Ciclo de vida do gênero <i>Leucocytozoon</i> | 27 |
| 1.3.4 Filogenia dos hemoparasitas..... | 29 |
| 1.4 Hipótese da Liberação do Inimigo | 31 |
| 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES A SEREM TESTADAS | 32 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 35 |
| 4.1 Amostras | 35 |
| 4.2 Extração de DNA | 37 |
| 4.3 Rastreamento de indivíduos infectados e identificação das linhagens de Plasmodium e Haemoproteus (BENSCH; HELLGREN; PÉREZ-TRIS, 2004)..... | 38 |
| 4.4 Diagnóstico da presença dos hemoparasitas por microscopia | 41 |
| 4.5 Análise filogenética..... | 41 |
| 4.6 Análise de prevalência | 42 |
| 4.7 Comparação par-a-par das prevalências e da riqueza com o teste G..... | 42 |
| 5. RESULTADOS..... | 43 |
| 5.1 Prevalência e diversidade dos hemoparasitas encontrados no continente africano | 43 |
| 5.1.1 Relações filogenéticas entre as linhagens de hemoparasitas encontradas no continente africano | 43 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2 Prevalência dos hemoparasitas (<i>Plasmodium e Haemoproteus</i>) nas amostras africanas | 45 |
| 5.1.3 Diversidade das linhagens dos hemoparasitas | 47 |
| 5.1.4 Análise das diferenças pareadas entre as sequências de citocromo B determinadas para amostras africanas..... | 48 |
| 5.1.5 Rede de haplótipos determinada entre as linhagens africanas..... | 49 |
| 5.2 Prevalência e diversidade dos hemoparasitas encontrados nas regiões brasileiras | 51 |
| 5.2.1 Identificação nas árvores filogenéticas das linhagens dos hemoparasitas encontradas nas regiões brasileiras..... | 51 |
| 5.2.2 Prevalência dos hemoparasitas (<i>Plasmodium e Haemoproteus</i>) nas amostras brasileiras | 56 |
| 5.2.3 Diversidade de linhagens dos hemoparasitas (<i>Plasmodium e Haemoproteus</i>) encontradas nas amostras brasileiras..... | 57 |
| 5.3 Análise comparativa entre os hemoparasitas identificados nas populações de garça vaqueira na África e no Brasil..... | 59 |
| 5.3.1 Análise das diferenças pareadas das sequências dos hemoparasitas nas amostras brasileiras e africanas | 59 |
| 5.3.2 Comparação das prevalências e diversidades entre África e Brasil..... | 60 |
| 5.3.3 Rede de Haplótipos | 61 |
| 5.4 Originalidade das linhagens descritas | 67 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 68 |
| 6.1 Discussão dos dados africanos | 68 |
| 6.1.1 Identificação por análise filogenética dos gêneros de hemoparasitas encontradas no continente africano..... | 68 |
| 6.1.2 Prevalência e Diversidade dos hemoparasitas (<i>Plasmodium e Haemoproteus</i>) | 69 |
| 6.1.3 Distribuição geográfica de linhagens | 76 |

| | |
|---|----|
| 6.2 Discussão dos dados brasileiros em comparação com os dados africanos..... | 78 |
| 6.2.1 Identificação dos gêneros dos hemoparasitas encontradas no Brasil..... | 78 |
| 6.3 Teste da Hipótese da Liberação do Inimigo..... | 82 |
| 6.4 Não identificação da fonte fundadora da população brasileira | 84 |
| 7. CONCLUSÕES | 86 |
| 8. REFERÊNCIAS | 87 |
| 9. Apêndice | 96 |
| 9.1 Haplótipos encontrados..... | 96 |
| 9.2 Análise morfológica | 97 |

1. INTRODUÇÃO

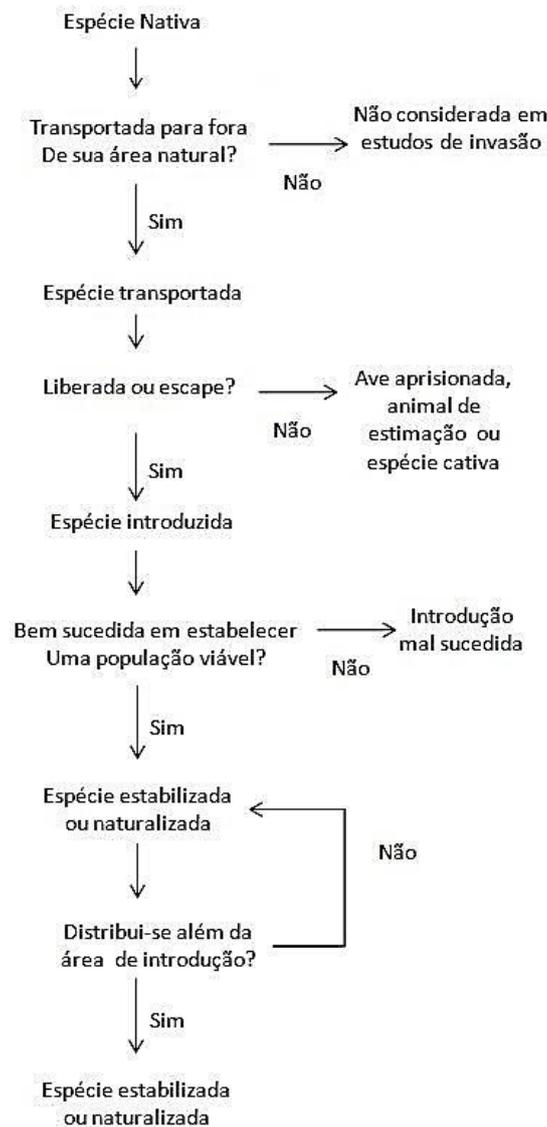
1.1 Biologia da invasão

Nos trabalhos sobre invasão biológica são utilizadas diversas nomenclaturas e, antes de discutir o processo em si, alguns termos-chave precisam ser definidos. Espécies nativas são definidas como as que evoluíram no ambiente onde vivem ou que lá chegaram desde épocas remotas, sem a interferência humana. Espécies exóticas são as que vivem em ambiente diferente do seu local de origem e que foram transportadas por ação do homem (intencional ou acidental). Algumas espécies, como a enfocada nesse trabalho, recebem essa designação mesmo sendo introduzidas sem interferência humana. Uma espécie invasora é definida como uma espécie exótica que, por desenvolver altas taxas de crescimento, reprodução e dispersão, interfere no ecossistema natural. Praga (ou peste) é a designação de uma espécie exótica ou não, indesejável no local por razões geralmente econômicas. Espécie superdominante é uma espécie nativa que se comporta como invasora, após um desequilíbrio ambiental (RICHARDSON et al, 2000; WILLIAMSON, 1996).

O estabelecimento bem sucedido de uma espécie em uma nova área é o ponto final de um processo que se inicia em sua área nativa (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009). O processo da invasão pode ser subdividido em diversos estágios (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009; DAVIS, 2009; KOLAR; LOGDE, 2001) e, o número de etapas varia de acordo com a definição dos estudiosos do tema. Davis (2009), por exemplo, divide o processo em seis estágios: introdução, estabelecimento, naturalização, dispersão, distribuição populacional e dispersão invasiva. Blackburn, Lockwood e Cassey (2009) e Lockwood, Hoopes e Marchetti (2007) por sua vez, denominam o conjunto dos processos envolvidos no deslocamento de uma espécie para um local novo como “rota de invasão”, ilustrada no fluxograma da Figura 1. A rota de invasão é definida considerando-se uma série de filtros (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009; RICHARDSON et al, 2000). Segundo esse modelo de filtros, todas as espécies teriam potencial para tornarem-se exóticas, todavia somente as capazes de

passar pelos filtros impostos pela rota, obteriam sucesso. Esses filtros podem ser representados por caracteres fisioanatômicos (como tipo de plumagem), localização geográfica ou limitação demográfica (um baixo N populacional¹, ineficiente para uma possível colonização).

Figura 1. Representação esquemática da rota de invasão.



Fonte: extraído de Blackburn, Lockwood e Cassey, 2009.

Davis (2009) atenta para as desvantagens do uso do modelo de estágios para explicar o processo de invasão, pois o modelo propõe passos sequenciais e deixa a

¹ Número de indivíduos em uma dada população.

se estabelecem e, os propágulos produzidos por eles irão enfrentar as adversidades fundamentais que os propágulos recém-chegados enfrentam, ou seja, encontrar uma área própria e segura na qual se estabelecer. A interação contínua desse *loop* interno está descrita na Figura 2 como o “*loop* de população persistente”, cujo sinônimo é “naturalização” (RICHARDSON et al, 2000b), o termo usado anteriormente por Davis (2009).

Como nem todas as introduções de uma espécie invasora apresentarão o mesmo padrão, será necessária a utilização de modelos diversos para que se compreenda o processo de invasão de uma espécie e se planeje seu controle antes que ela se torne uma praga.

1.2 A garça vaqueira, *Bubulcus ibis* (LINNAEUS, 1758)

A espécie hospedeira alvo do presente estudo é popularmente chamada de garça vaqueira. *Bubulcus ibis* (LINNAEUS, 1758) é uma ave generalista, pertencente à ordem Pelecaniiformes, família Ardeidae. Suas características principais são um corpo totalmente branco com bico íris e os tarsos amarelos e, durante a reprodução, peito e costas adquirem cor de ferrugem (SICK, 1997).

Bubulcus ibis normalmente se reproduz em colônias mistas com outros ardeídeos (ARAÚJO; NISHIDA, 2004; BURGER, 1978). No Brasil, a reprodução ocorre com maior intensidade durante a estação chuvosa (aproximadamente por seis meses no norte e por quatro meses no sudeste e sul do país), a época de maior oferta de alimento (BELLA; AZEVEDO-JR, 2004). O número médio de ovos varia entre dois e quatro (TELFAR; BISTER, 2004), sendo que as posturas estão relacionadas com a disponibilidade alimentar (BELLA; AZEVEDO-JR, 2004; BURGER, 1978; MAXWELL; KALE, 1977). O potencial biótico de *B. ibis* é maior do que de outras garças, pelo fato de começarem a reproduzir logo no primeiro ano de vida, frequentemente com duas posturas por estação (SICK, 1997).

A garça vaqueira é frequentemente encontrada em associação com bovinos, por alimentar-se de presas espantadas pelo pastoreio do gado, o que diminui o gasto energético da ave e do tempo de forrageamento (BELLA; AZEVEDO-JR, 2004;

THOMPSON; LANYOU; THOMPSON, 1982). Apesar de primariamente insetívoras, essas garças apresentam comportamento alimentar oportunista, (BELLA; AZEVEDO-Jr, 2004; SICK, 1997) uma característica que se manifesta principalmente em áreas antrópicas e em ambientes naturais modificados (SICK, 1997; FELLOWS; PATON, 1988).

Apesar do mecanismo e detalhes da invasão do continente americano pela *B. ibis* não serem conhecidos, supõe-se que a origem de sua dispersão tenha sido a partir da costa oeste da África, de onde partiu e atravessou o oceano Atlântico, até alcançar a costa nordeste da América do Sul. A menor distância entre África e América do Sul são cerca de 3220 km entre Senegal e o estado do Rio Grande do Norte, contudo, essa rota não encontra ventos favoráveis, de modo que é mais provável que os indivíduos migrantes vieram do Norte da África ou da Península Ibérica para a costa Nordeste do continente Sul Americano, com o trajeto facilitado pelos ventos alísios (SICK, 1997; CROSBY, 1972).

A primeira observação desta garça no continente americano ocorreu no Suriname (antiga Guiana Inglesa), entre os anos de 1877 e 1882 (CROSBY, 1972; WETMORE, 1963). Na segunda metade do século passado, iniciou-se a dispersão e a ave espalhou-se até os Estados Unidos a partir da Flórida (em 1941), atingindo até o Canadá. O primeiro registro da garça vaqueira na América Central ocorreu posteriormente em 1954 no Canal do Panamá. *Bubulcus ibis* foi avistado no Brasil pela primeira vez no estado do Pará em 1962 em associação com Búfalos na Ilha de Marajó, foi registrado no estado do Rio Grande do Sul onze anos depois e, em 1977 já havia chegado à Patagônia (TELFAIR, 1983; STRANGE, 1979; CROSBY, 1972) (Figura).

Figura 3. Datas dos primeiros relatos da presença de *B. ibis* na América do Sul.



Fonte: extraído de TELFAIR, 1983.

A espécie pode ser classificada como invasora, porém no continente americano não interfere significativamente com as populações nativas. Por outro lado, em ilhas oceânicas, onde o espaço é limitado, a espécie se apresenta agressiva e danosa. O caso de competição com a espécie *Sula sula* (LINNAEUS, 1766), popularmente conhecida como atobá-de-pés-vermelhos, tem causado preocupação. Esse atobá, apesar de ter ampla distribuição tropical e subtropical nos oceanos, reproduz-se somente em Fernando de Noronha, onde *B. ibis* prolifera (NELSON, 1978).

1.3 Os Hemoparasitas

Os hemosporídeos são parasitas de células sanguíneas pertencentes ao Filo Apicomplexa (protistas) encontrados em aves, répteis e mamíferos, amplamente distribuídos em todos os continentes do mundo, com exceção da Antártida (ATKINSON, 2008; VALKIUNAS, 2005; GARNHAM, 1966).

Quatro gêneros de hemosporídeos infectam aves, *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*, sendo o *Haemoproteus* dividido entre dois sub gêneros baseados em evidência morfológica e suporte filogenético para dois clados irmãos: um clado que infecta preferencialmente a ordem Columbiformes (*Haemoproteus* (*Haemoproteus*)) e, o outro que contém parasitas que se desenvolvem em aves pertencentes a todas as outras ordens de aves (*Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*)) (LEVIN et al, 2011; MARTINSEN et al, 2008). Tanto os plasmódios quanto hemoproteídeos e leucocitonídeos são esporozoários parasitas e pertencem ao Phylum Apicomplexa. Sua Classe é a Haematozoaeae, ordem Haemosporina. Os plasmódios pertencem à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Eles estão agrupados em 14 subgêneros, estando distribuídos segundo sua ocorrência em répteis, mamíferos e aves. Os hemoproteídeos pertencem à família Haemoproteidae e ao gênero *Haemoproteus*. Finalmente, os leucocitonídeos pertencem à família Plasmodiidae e ao gênero *Leucocytozoon*.

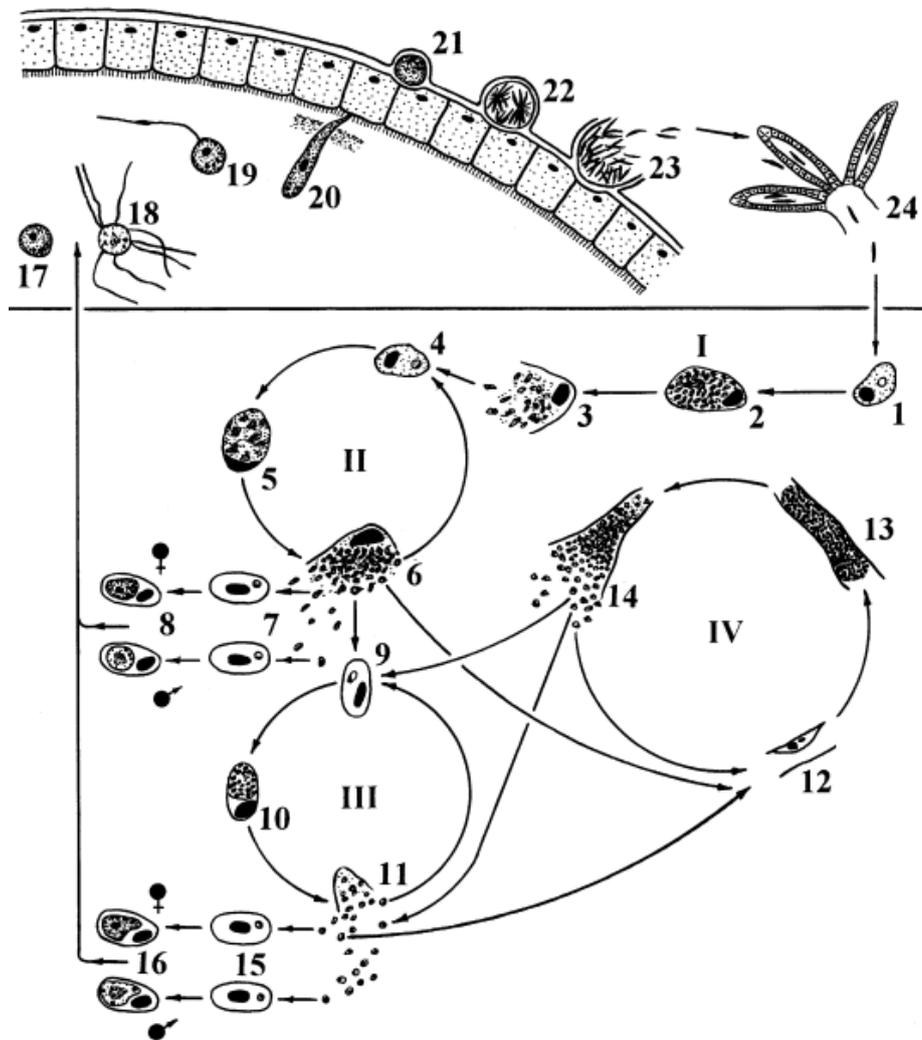
Esses parasitas são dependentes de vetores para sua transmissão e estão associados a espécies de pelo menos sete famílias da ordem Diptera (LEVINE, 1988). Segundo Valkiunas (2005) O gênero *Plasmodium* geralmente tem por vetores os mosquitos da família Culicidae; o gênero *Haemoproteus* é transmitido principalmente por membros da família Ceratopogonidae e Hippoboscidae; os vetores de *Leucocytozoon* são borrachudos da família Simuliidae; por fim, os vetores de *Fallisia* ainda são incertos.

1.3.1 Ciclo de vida do gênero *Plasmodium*

Répteis, aves e mamíferos (principalmente roedores e primatas) são hospedeiros intermediários para o parasito. Os artrópodes da ordem Díptera, famílias Culicidae e Simuliidae (GREINER et al, 1975, VALKIUNAS 2005) – gêneros do mosquito-pólvora, como *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* – atuam como hospedeiros finais (HAUSMANN et al, 2003).

Os plasmódios (família Plasmodiidae) são parasitos heteróxenos, vivendo parte de seu ciclo de vida em um organismo invertebrado e parte em um vertebrado (Figura). O desenvolvimento do parasita nas aves é dividido em três fases: merogonia exoeritrocítica, merogonia eritrocítica e formação de gametócitos (Valkiunas, 2005). A merogonia exoeritrocítica é dividida em duas, a primária (itens I e II da Figura 4) e a secundária (itens III e IV da Figura 4). A merogonia exoeritrocítica primária produz duas gerações de merontes, os criptozoítos (itens 2 e 3 da Figura 4) e os metacriptozoítos (itens 5 e 6 da Figura 4), e a secundária produz várias gerações de merontes, os fanerozoítos (itens 13 e 14 da Figura 4).

Figura 4. Representação do ciclo de vida do gênero *Plasmodium* em aves (*P. relictum* como exemplo). (Extraído e adaptado de VALKIUNAS, 2005). A parte de cima corresponde ao vetor e a parte de baixo corresponde à ave. I, II – merogonia exoeritrocítica primária; III – merogonia exoeritrocítica; IV – merogonia exoeritrocítica secundária; 1 – esporozoíto na célula do retículo endotelial; 2, 3 – criptozoítos; 4 – merozoíto no macrófago; 5, 6 – metacriptozoítos; 7 – merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos; 9 – merozoíto no eritrócito; 10, 11 – merontes eritrócíticos; 12 – merozoíto nas células endoteliais dos capilares; 13, 14 – fanerozoítos; 15 – merozoítos em eritrócitos; 16 – gametócitos; 17 – macrogameta; 18 – “exoflagelação” de microgametas; 19 – fertilização do macrogameta; 20 – oocineto penetrando a membrana peritrófica; 21 – oocisto jovem; 22, 23 – esporogonia; 24 – esporozoítos na glândula salivar do vetor

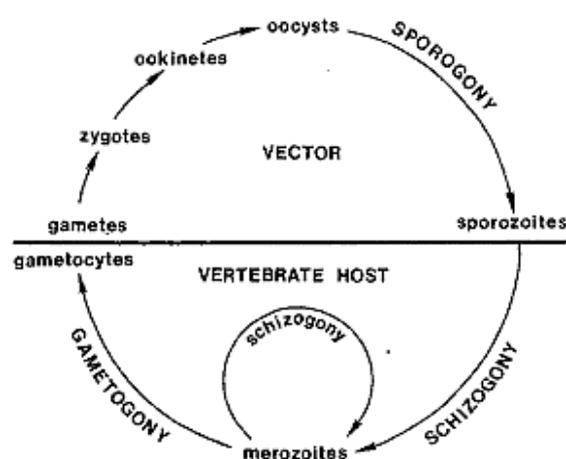


Fonte: extraído de Valkiunas, 2005.

O ciclo de vida no hospedeiro invertebrado tem início quando o vetor alimenta-se do sangue de uma ave infectada e ingere os **gametócitos** (itens 8 e 16 da Figura 4), formas sexuadas que liberam gametas. Sua fusão origina os **oocistos** no estômago do díptero, os quais, por sua vez, sofrem o processo chamado **esporogonia** (itens 22 e 23 da Figura 4), rompendo e liberando **esporozoítos** na cavidade celomática do invertebrado de onde seguem em direção às glândulas salivares (item 24 da Figura 4). Este é chamado o estágio “infectante”, no qual os parasitos estão prontos para serem

transferidos para a circulação sanguínea de outro vertebrado, juntamente com a saliva do vetor durante sua alimentação. No local da picada, os esporozoítos penetram as células do Sistema Retículo Endotelial – SRE (macrófagos) – e as células do Sistema Fagocítico Mononuclear – SFM (monócitos); posteriormente eles penetrarão nos macrófagos alinhados na camada endotelial dos capilares sanguíneos cerebrais, do baço, fígado, rins e de outros órgãos, dando início ao ciclo exoeritrocítico. Dentro dessas células, os esporozoítos dividem-se assexuadamente e originam os **esquizontes**, os quais são compostos por uma porção de **merozoítos**. Liberados do ambiente exoeritrocítico, os merozoítos atingem a circulação sanguínea da ave e invadem os eritrócitos, onde sofrerão o processo de **divisão esquizogônica**, transformando-se em **esquizontes sanguíneos**. O rompimento do eritrócito permite que os esquizontes liberem os merozoítos e, conseqüentemente, há invasão de novas células vermelhas; este *loop* permanece por algumas gerações de merontes (merozoítos). Alguns merozoítos vão diferenciar-se em **trofozoítos** e outros em **gametócitos**, os primeiros compõem o chamado estágio “crônico” da doença e, os últimos, a fase eritrocítica sexuada. Gametócitos masculinos e femininos são ingeridos pelo vetor e, assim, o ciclo reinicia-se (PARAENSE, 1945; ATKINSON; VAN RIPER, 1991; BARNES, 2005; HAUSMANN et al, 2003; VALKIUNAS, 2005). Uma esquematização simplificada do ciclo de vida encontra-se na Figura 5.

Figura 5. Ciclo de vida simplificado de *Plasmodium* sp.



Fonte: extraído de ATKINSON; VAN RIPER, 1991.

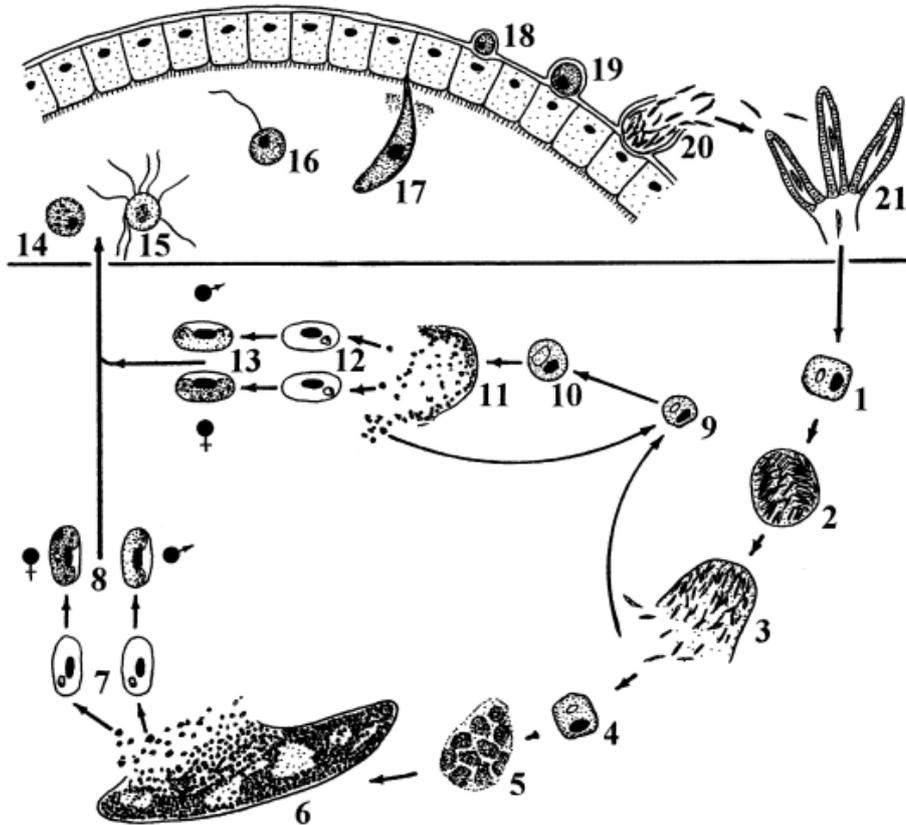
As espécies de *Plasmodium* compartilham uma série de características morfológicas e de desenvolvimento com os gêneros *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*, sendo fator importante para a distinção entre os três parasitos a divisão assexuada dos plasmódios (merogonia) nos eritrócitos circulantes (ATKINSON; VAN RIPER, 1991; JARVI; SCHULTS; ATKINSON, 2002; HAUSMANN et al, 2003; ATKINSON et al, 2008; FALLON et al, 2008).

1.3.2 Ciclo de vida do gênero *Haemoproteus*

O ciclo biológico do gênero *Haemoproteus* (família Haemoproteidae) ainda é pouco esclarecido (VALKIUNAS, 2005). Somente **gametócitos** desenvolvem-se em células sanguíneas (eritrócitos maduros) uma característica que os diferencia dos *Plasmodium*. Dípteros das famílias Ceratopogonidae e Hippoboscidae são vetores dos hemoproteídeos. Os **esporozoítos** injetados na circulação da ave iniciam o desenvolvimento de **merontes** exoeritrocíticos, os quais geralmente são encontrados nos pulmões e, menos frequentemente, no fígado, baço, rins, coração, musculatura esquelética e outros órgãos. A **merogonia** exoeritrocítica (ao contrário do gênero *Plasmodium* de humanos) ocorre nas células endoteliais e, provavelmente, em macrófagos teciduais, enquanto que, em certas espécies pode ocorrer também em miofibroblastos.

A infecção de hospedeiros vertebrados por sub-inoculação de sangue infectado não é possível, devido à ausência de **merogonia** no sangue, exceto em casos quando **merozoítos** exoeritrocíticos estão presentes na circulação – a probabilidade do evento aumenta de acordo com o grau da parasitemia. **Gametogênese, fertilização** e desenvolvimento de **zigotos** e **oocinetos** ocorrem de acordo com o esquema uniforme para todos os hemosporídios (descrito anteriormente para *Plasmodium* sp.). **Oocinetos** migram através da camada epitelial para o intestino médio (mesêntero) do vetor e desenvolvem-se sob a lâmina basal, gerando **oocistos** e a partir deles, pelo menos 100 **esporozoítos** desenvolvem-se. Estes últimos atingem as glândulas salivares do vetor (VALKIUNAS, 2005) (Figura 6).

Figura 6. Representação do ciclo de vida do gênero *Haemoproteus* em aves (*H. mansonii* como exemplo). (Extraído e adaptado de VALKIUNAS, 2005). A parte de cima corresponde ao vetor e a parte de baixo corresponde à ave. 1 – esporozoítio na célula do retículo endotelial; 2, 3 – merontes exoeritrocíticos da primeira geração com merozoítos alongados; 4 – merozoítio na célula endotelial; 5, 6 – megalomerontes crescendo e maduros em músculos esqueléticos, respectivamente; 7 – merozoítos em eritrócitos; 8 – gametócitos maduros; 9 – merozoítio na célula reticuloendotelial no baço; 10, 11 – merontes em crescimento e maduros no baço, respectivamente; 12 – merozoítos nos eritrócitos; 13 – gametócitos maduros; 14 – macrogameta; 15 – “exoflagelação” de microgametas; 16 – fertilização do macrogameta; 17 – oocineto penetrando a membrana peritrófica; 18 – oocisto jovem; 19, 20 - esporogonia; 21 – esporozoítos na glândula salivar do vetor.



Fonte: extraído de Valkiunas, 2005.

1.3.3 Ciclo de vida do gênero *Leucocytozoon*

O ciclo de vida dos leucocitonídeos não foi totalmente estudado em aproximadamente 30% das espécies descritas até agora. As moscas simuliídeas (Diptera: Simuliidae) são os vetores para esses parasitas, e uma das espécies usa membros da família Ceratopogonidae como vetores (*L. caulleryi*). A merogonia exoeritrocítica em aves ocorre nas células parenquimais do fígado (hepatócitos), em macrófagos e várias outras células reticuloendoteliais, incluindo as células endoteliais dos capilares. Os gametócitos e todos os outros estágios de desenvolvimento não possuem hemozoína. Os gametócitos desenvolvem-se em eritroblastos, eritrócitos e

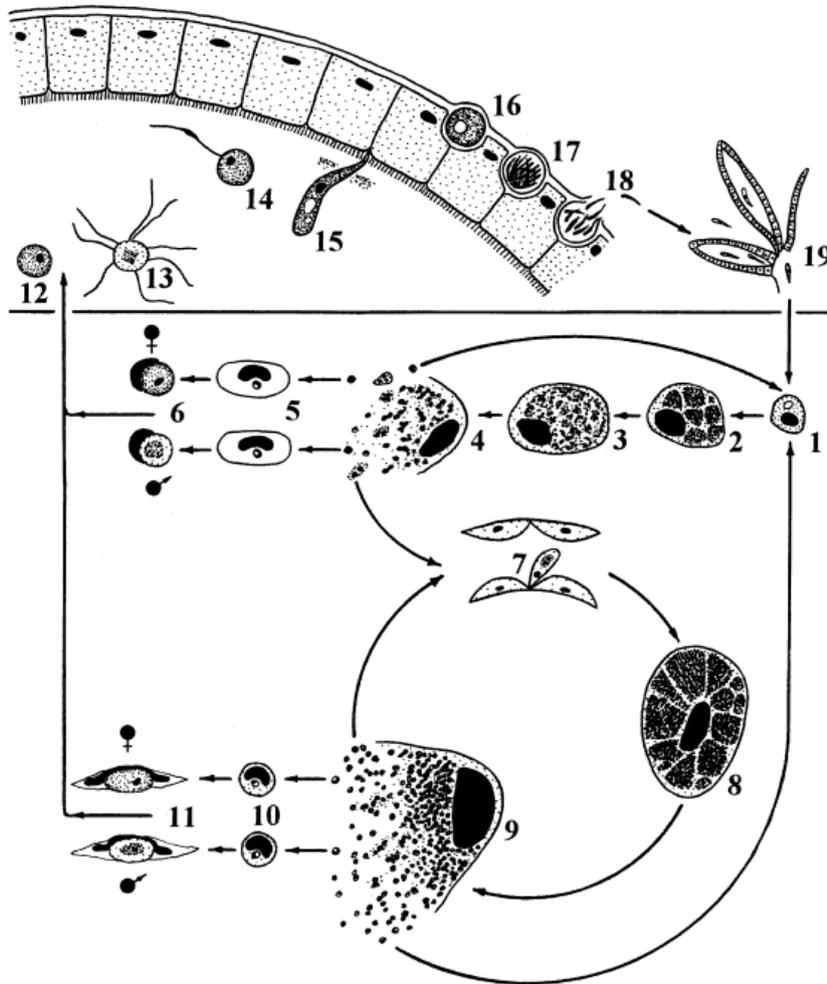
leucócitos mononucleares. A merogonia não ocorre em células sanguíneas. (VALKIUNAS, 2005).

Os esporozoítos que são injetados nas aves no momento que a mosca se alimenta do seu sangue, podem se desenvolver somente nos hepatócitos. Esporozoítos viáveis são encontrados em aves por vários dias e, após sua gradual penetração nos hepatócitos, eles dão origem aos merontes hepáticos de primeira geração (Figura 7, 1-3). O crescimento dos merontes é acompanhado por um aumento da quantidade de citoplasma e da múltipla divisão do núcleo, e a posterior invaginação do citoplasma leva ao surgimento de merozoítos unicelulares. Depois que os merozoítos atingem o sangue, eles penetram em eritrócitos maduros e imaturos, gerando gametócitos, os quais causam uma marcada hipertrofia e deformação do núcleo (VALKIUNAS, 2005).

O sincício atinge o sangue e espalha-se em muitos órgãos. Eles são fagocitados por macrófagos e outras células do sistema reticuloendotelial, originando a segunda geração de merontes, os quais são chamados de megalomerontes ou megaloesquizontes devido ao seu tamanho. Os megalomerontes possuem centenas de milhares de merozoítos, os quais penetram nos linfócitos e outros leucócitos mononucleares e dão origem a gametócitos. As células infectadas tornam-se fusiformes, enquanto seu núcleo deforma-se e é movido para a periferia. Uma parte dos merozoítos transformado em megalomerontes é absorvida pelas células reticuloendoteliais (VALKIUNAS, 2005).

Os gametócitos de *Leucocytozoon* podem ser arredondados, ovais ou alongados e, todas essas formas são capazes de infectar o vetor. O desenvolvimento dos gametas, fertilização, desenvolvimento de oocinetos e esporogonia tomam lugar na glândula salivar dos simúlideos, os quais ingerem os gametócitos maduros.

Figura 7. Representação do ciclo de vida do gênero *Leucocytozoon* em aves (*L. simondi* como exemplo). (Extraído e adaptado de VALKIUNAS, 2005). A parte de cima corresponde ao vetor e a parte de baixo corresponde à ave. 1 – esporozoíto ou merozoíto na célula parenquimal do fígado (hepatocisto); 2 - 4 – merontes hepáticos; 5 – merozoíto nos eritrócitos; 6 – gametócitos em células hospedeiras arredondadas; 7 – sincício ou merozoíto em células reticuloendoteliais; 8 - 9 – megalomerontes; 10 – merozoítos em leucócitos mononucleares; 11 – gametócitos em células hospedeiras fusiformes; 12 – macrogameta; 13 – “exoflagelação” de microgametas; 14 – fertilização do macrogameta; 15 – oocineto penetrando a membrana peritrófica; 16 – oocisto jovem; 17, 18 – esporogonia; 19 – esporozoítos na glândula salivar do vetor.



Fonte: extraído de Valkiunas, 2005.

1.3.4 Filogenia dos hemoparasitas

Considerando-se somente as aves, 206 espécies de hemosporídeos foram descritos em centenas de espécies de hospedeiros, com 16 espécies diferentes de vetores (VALKIUNAS, 2005). BENSCH e colaboradores et al (2007) afirmam que linhagens de DNA mitocondrial de parasitas diferindo em pelo menos uma base no gene do citocromo B podem apresentar diferentes áreas de transmissão e hospedeiros

e, os dados de sequenciamento gerados constantemente sugerem que há centenas de espécies crípticas não descritas que dividem morfologias convergentes com taxa conhecidos (BENSCH et al, 2004).

Os estudos sistemáticos de hemosporídeos classicamente baseavam-se em caracteres observados em microscopia óptica, traços do ciclo de vida e hospedeiros intermediários e finais para classificação dos grupos. Um dos principais traços de vida analisado era a merogonia eritrocitária, a replicação assexuada de células haploides dentro dos eritrócitos dos hospedeiros (chamados de merontes ou esquizontes), uma característica única do gênero *Plasmodium*. De semelhante modo, uma das principais características analisadas microscopicamente era a presença de pigmentos de estocagem de produtos finais da digestão de hemoglobina dentro das células infectadas (MARTINSEN et al, 2008).

A suspeita de que essas características clássicas poderiam ser resultado de convergência levou Manwell⁴ (1936, *In apud* MARTINSEN et al, 2008) a concluir que apenas os dados genéticos proporcionariam relações claras entre os grupos de hemosporídeos. Ao longo dos anos, os estudos sugerem cada vez mais que essas características morfológicas usadas na classificação dos hemosporídeos foram perdidas e surgiram novamente várias vezes dentro do clado (MARTINSEN et al, 2008).

Outro ponto em discussão dentro do estudo de hemoparasitas é a escolha de grupos externos durante a construção de árvores filogenéticas. A escolha desses grupos influencia grandemente a elucidação das relações evolutivas (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) logo, deve-se considerar com cuidado as relações ancestrais entre os taxa e a monofilia do grupo. Reconstruções pré moleculares assumiam que o gênero *Plasmodium* exibia os traços mais derivados e, portanto, formavam um clado monofilético. Utilizando-se do mesmo raciocínio, como *Leucocytozoon* não apresenta algum desses traços, o gênero era colocado em uma posição basal (OUTLAW; RICKLEFS, 2011). Todavia, alguns estudos concluem que o táxon do gênero *Plasmodium* é parafilético em relação ao do *Haemoproteus* (PÉREZ-TRIS et al, 2005;

⁴ Manwell, R. D.. The problem of species, with special reference to the malaria parasites. Ann. Trop. Med. 30, 435–439. 1936.

PERKINS; SCHALL,, 2002), ou seja, não apresentam o mesmo ancestral comum, e a utilização do táxon de *Leucocytozoon* como grupo externo pode confundir a análise, (OUTLAW; RICKLEFS, 2011).

A análise de Outlaw e Ricklefs (2011) que utiliza a abordagem de ausência de grupo externo (*outgroup-free routing approach*) mostra um cenário que difere grandemente de estudos anteriores. *Plasmodium* de aves, répteis e mamíferos tornam-se parafiléticos em relação aos demais gêneros (ao invés de derivados) e *Leucocytozoon* agrupa-se como grupo irmão de *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus*.

1.4 Hipótese da Liberação do Inimigo

O sucesso na instalação de espécies exóticas em áreas não nativas parece ser favorecido quando há um escape de um ambiente nativo, onde a competição é maior com os “inimigos naturais” da espécie (parasitas, por exemplo), para um ambiente onde esse confronto é menor ou inexistente (LIMA et al, 2004; TORCHIN et al, 2003; MICHEL; POWER, 2003). Essa hipótese foi denominada Hipótese da Liberação do Inimigo, do inglês *Enemy Release Hypothesis* (ERH). O sucesso no estabelecimento de uma espécie exótica é explicado por uma hipótese alternativa à ERH chamada Hipótese da Nova Arma, do inglês, *Novel Weapon Hypothesis*. Essa supõe que espécies introduzidas possuem uma vantagem em relação às espécies nativas por possuírem químicos alelopáticos ou parasitas patógenos contra os quais as espécies nativas não possuem defesas evoluídas (MARZAL et al, 2011).

Segundo Keane e Crawley (2002), a ERH prediz que quando uma espécie é introduzida em uma nova região: 1) os antagonistas especializados na espécie em questão estarão ausentes na nova área 2) os antagonistas especializados da fauna nativa raramente trocarão de hospedeiro 3) os parasitas ou predadores generalistas exercerão maior impacto nos competidores nativos. Como consequência, nas áreas colonizadas é esperado pela ERH que a espécie introduzida apresente menor prevalência e riqueza de linhagens de parasitas do que na área nativa, pois as espécies introduzidas devem ser menos afetadas por inimigos naturais do que seus

competidores que estão em sua própria área nativa (KEANE; CRAWLEY, 2002; TORCHIN et al., 2005).

Colautti et al (2004) revisando a literatura que diz respeito à ERH, criticaram a simples relação entre a liberação de inimigos naturais e o vigor, abundância ou impacto de espécies exóticas, dada a complexidade que envolvem as invasões biológicas.

Segundo Callway e Ridenour (2004), a NWH prevê que se os invasores produzem químicos alelopáticos que provêm grandes vantagens competitivas no local invadido, e não proporcionavam essas vantagens nas áreas nativas, então a pressão de seleção para as características que conferem a vantagem será muito maior na área exótica.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES A SEREM TESTADAS

A introdução da garça vaqueira, de origem africana, há cerca de 130 anos atrás no continente americano resultou na ocupação atual de grande parte do continente. De acordo com Hipótese da Liberação do Inimigo, é esperado que as populações de garça-vaqueira brasileiras apresentem uma menor prevalência de hemoparasitas e um repertório mais reduzido de linhagens de hemoparasitas, em comparação às aves da região nativa africana. Um resultado diferente do esperado por essa hipótese poderá ser observado, considerando-se que a ecologia do processo de invasão extrapola a simples relação hospedeiro-parasita (COLAUTTI et al, 2004). Além disso, pela comparação quantitativa entre as prevalências nas duas áreas (nativa e invadida) poderemos inferir se as populações brasileiras de *B. ibis* passaram ou não por gargalo populacional no seu estabelecimento no continente americano. No caso de gargalo, encontraremos nas populações brasileiras uma prevalência e um número menor de linhagens de parasitas do que nas populações originais.

O repertório de linhagens de hemoparasitas das populações brasileiras posicionadas mais próximas da provável entrada de *B. ibis* no continente (região norte e nordeste do país) será comparado com o das amostras dos países africanos (Senegal, Guiné Bissau, Ghana, Nigéria e África do Sul) e aos dados obtidos na literatura

(WALDENSTROM et al, 2002; LEVIN et al, 2011) e em de bancos de dados (BENSCH; HELLGREN; PÉREZ-TRIS, 2009). Essa análise será baseada nas sequências do gene mitocondrial do citocromo B que é o mais utilizado para caracterizar linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, os dois hemoparasitas mais frequentes na regiões a serem investigadas.

A análise filogeográfica permitirá ainda a determinação indireta da origem da população fundadora, caso a amostra africana contenha a população fonte-fundadora. Miura et al (2006) estudaram a invasão do parasita trematódeo e de seu hospedeiro exótico, o caramujo asiático *Batillaria attramentaria*, ambos introduzidos na América do Norte. Esses autores comprovaram que a introdução do caramujo teve origem no Japão, na região de onde foram importadas ostras para a América do Norte a partir de análise genética de uma espécie críptica do parasita.

Esse trabalho está inserido num projeto maior desenvolvido no Laboratório Genética de Aves da UFSCar, intitulado “Colonização do continente americano pelas populações africanas de garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*): a genética desvendando o processo de bioinvasão” (Fapesp processo 2010/50406-5). Os dados genéticos levantados nesse estudo serão agregados aos obtidos para as populações de garça nas duas regiões por outros integrantes da equipe do Laboratório de Genética de Aves e esse conjunto será analisado visando a compreensão do histórico da invasão do continente americano.

3. OBJETIVOS

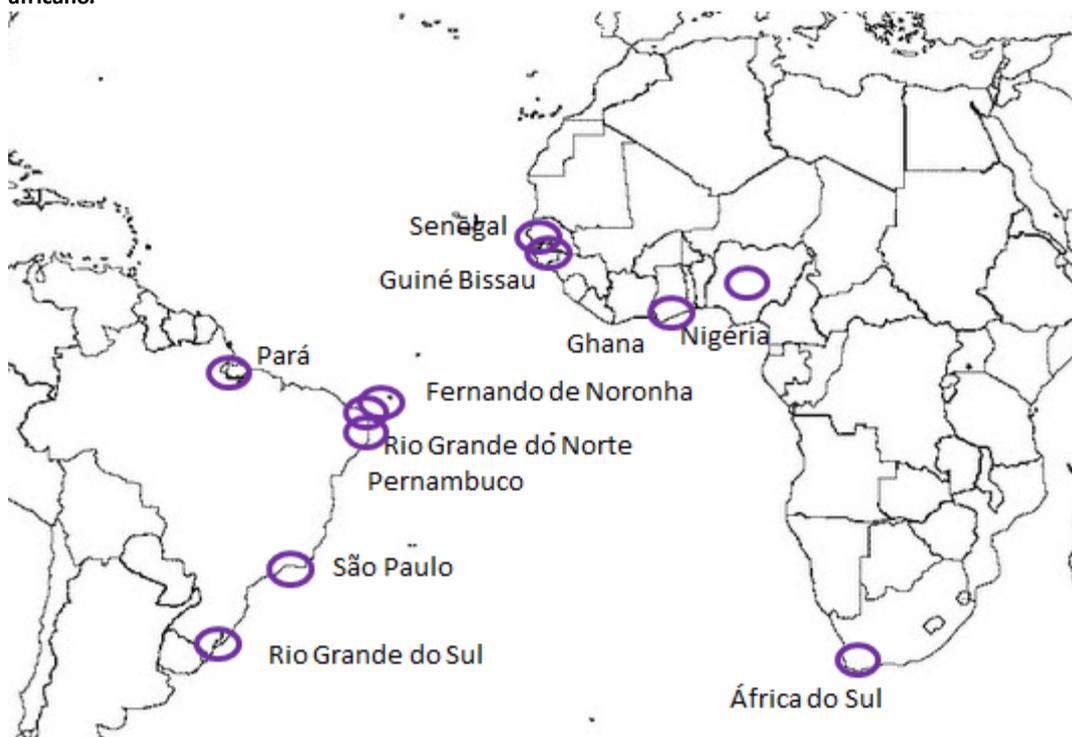
Estimar a prevalência de hemoparasitas nas populações de *B. ibis* africanas e brasileiras e identificar o repertório de linhagens de *Plasmodium* e *Haemoproteus* e as suas distribuições nas duas regiões: nativa e colonizada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras dos hemoparasitas foram obtidas a partir das amostras de sangue de garça vaqueira, coletadas dos ninhegos em colônias reprodutivas de garças. O mapa com as localidades das colônias reprodutivas onde foram efetuadas as coletas está ilustrado na Figura 8.

Figura 8. Regiões onde estão localizadas as colônias reprodutivas de *B. ibis* amostradas no Brasil e no continente africano.



Fonte: elaborado pelo autor.

As amostras do Brasil foram coletadas a partir do primeiro semestre de 2010 e totalizaram 350 indivíduos. Quatro populações foram amostradas na região brasileira próxima à provável entrada da garça vaqueira no continente americano (norte e nordeste do país), uma população posicionada na região sul e outra no sudeste brasileiro foram também amostradas. As coordenadas geográficas das populações brasileiras encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Estados brasileiros onde foi feita a coleta, número de amostras de sangue e coordenadas das colônias visitadas.

| Estado | N | Coordenadas | |
|---------------------|----|-------------|--------------|
| Pará | 53 | S00°30.325 | O049°13.768' |
| Rio Grande do Norte | 80 | S05°37.462 | O036°52.561' |
| Fernando de Noronha | 99 | S03°51.000' | O32 °25.000' |
| Pernambuco | 22 | S08°52' | O36°28' |
| São Paulo | 55 | S22°30' | O47°35' |
| Rio Grande do Sul | 41 | S30°01' | O51°31' |

No oeste africano foram amostradas 15 populações de cinco países africanos, posicionados em diversas latitudes. Dois países estão na região noroeste da África (Senegal e Guiné Bissau), um na costa oeste central do Golfo da Guiné (Gana), um na região central oeste (Nigéria) e um no extremo sul do continente (África do Sul) (N total = 509). As coordenadas geográficas das populações africanas encontram-se na Tabela 2. As amostras dos países africanos foram coletadas durante o segundo semestre do ano de 2011 e totalizaram 509 indivíduos.

Tabela 2 Países e localidades da coleta no continente africano, suas coordenadas e número de amostras de sangue.

| País | (Colônia) População | N | Coordenadas | |
|---------------|----------------------|----|--------------|--------------|
| Senegal | Zoo Dakar | 51 | N14°43.653' | O17°25.895' |
| | Parc Somone | 39 | N14°29.861' | O17°04.931' |
| | Thiés | 41 | N14°47.789 | O16°55.883' |
| Guiné Bissau | Ilha de Bandim | 53 | N12°07.182' | O05°40.214' |
| | Atanque São Domingos | 37 | N12°25.764' | O16°05.433' |
| | Ilha do Patrão | 14 | N11°15.827' | O15°46.480 |
| Nigéria | Fobour Fasa | 30 | N09°86.434' | E09°04.582' |
| | Kurra Falls | 30 | N09°43.153' | E09°00.063' |
| | Fusa | 30 | N09°87.991' | E08° 97.097' |
| | Toro | 30 | N10°03.472 | E009°03.864' |
| Gana | K. Lagoon | 31 | N05°06.309' | O001°23.359' |
| | Bansom Colony | 34 | N05°06.475' | O018°54.810' |
| África do Sul | Paarl | 29 | S33°41.051' | E18°59.031' |
| | Boschenmeer Golf | 30 | S33°45.000' | E18 °59.000' |
| | Rondevlei | 30 | S 34°03.759' | E18 °29.725' |

O número amostrado de indivíduos por colônias variou entre 10 e 51 ninhegos, com 2-3 semanas de idade. Os filhotes foram manipulados (um por ninho) para obtenção de amostras de 0,1 ml de sangue os quais foram coletadas por punção na veia braquial,

utilizando-se seringas hipodérmicas descartáveis. Na colônia de Rio Claro foram coletados também sangue dos adultos incubantes, através do uso de ovos falsos contendo triatomídeos vivos e em jejum e, posterior punção do sangue do trato digestivo do inseto. Uma gota de sangue foi utilizada para o preparo de algumas lâminas no campo e o restante foi estocado em etanol para ser utilizado para a extração do DNA.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada segundo o método fenol-clorofórmio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), com algumas modificações: 30 µL de papa de hemácias foram misturados a 220 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 e KCl 50mM), 5U de Proteinase K, esta mistura foi incubada em banho-maria por 12 horas à 37°C. A extração prosseguiu com a adição de 250 µL de fenol, seguida de agitação por 10 minutos e centrifugação durante 10 minutos à 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e acrescidos com 250 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), as etapas de agitação e centrifugação foram repetidas. Os sobrenadantes foram novamente transferidos e acrescidos com 250 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), as etapas de agitação e centrifugação foram feitas novamente. Os sobrenadantes resultados deste último passo foram transferidos para novos tubos, aos quais se adicionou acetato de sódio 3M (10% do volume transferido) e etanol absoluto gelado (250% do volume). O tubo foi levemente homogeneizado até a visualização do total do DNA precipitado.

Os tubos contendo DNA e álcool permaneceram no freezer durante uma noite, para a precipitação do DNA completar. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 rpm, descartou-se o etanol e repetiu-se o último passo de lavagem do DNA com álcool 70%. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente para a evaporação do álcool (protegidas da exposição à luz UV).

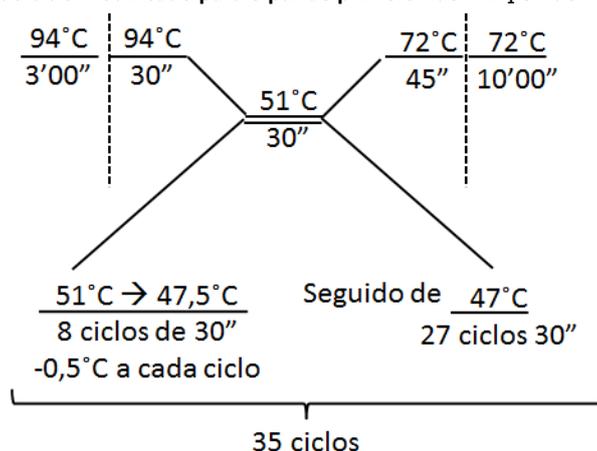
O DNA foi ressuspenso adicionando-se de 20 a 100µl de água destilada. As amostras foram quantificadas utilizando-se o Nanovue (®GE Healthcare). Após a quantificação as amostras foram diluídas em água destilada para a concentração de

DNA de 20ng/ μ l para serem usadas nas ampliações por PCR. O DNA estoque e as soluções diluídas foram armazenados em freezer -20°C.

4.3 Rastreamento de indivíduos infectados e identificação das linhagens de Plasmodium e Haemoproteus (BENSCH; HELLGREN; PÉREZ-TRIS, 2004)

Um protocolo de “nested PCR” foi descrito por Bensch, Hellgren e Perez-Tris (2004). O primeiro conjunto de *primers* HaemNF₁ + HaemNR₃ amplificam um fragmento de 595pb do gene do citocromo B, o qual corresponde a uma pequena região conservada nos três gêneros de parasitas sanguíneos: *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon*. O protocolo para reação com esse par de *primers* foi modificado em relação às condições originais: o volume final de 25 μ L incluiu os seguintes componentes: 40 ng de DNA total; 1X Taq *Buffer* + KCl (Fermentas); 0,6mM de cada *primer* HaemNF₁ e HaemNR₃; 4,0mM de MgCl₂; 0,25mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (GE), 1,25U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As principais modificações foram a inserção de um oito ciclos de “touchdown” com decréscimo de 0,5°C na temperatura de anelamento a cada ciclo, iniciando com 51°C, atingindo 47°C no final do oitavo ciclo, e o aumento da concentração de MgCl₂, de 1,5mM para 4,0mM. O programa usado incluía: um passo com desnaturação inicial a 94,0 °C por 3 min, seguido de 8 ciclos de 94,0 °C por 30”, 51,0 °C por 30” e 72,0 °C por 45”, com o “touchdown” da temperatura de anelamento levando ao decréscimo de 0,5°C a cada ciclo; seguido por desnaturação inicial a 94,0 °C por 3 min, 27 ciclos de 94,0 °C por 30”, 47,0 °C por 30” e 72,0 °C por 45”, e finalização com um passo de extensão à 72,0 °C por 10 min (Figura 9). Todos os indivíduos foram submetidos a esse protocolo e, posteriormente, à segunda reação do protocolo descrita a seguir.

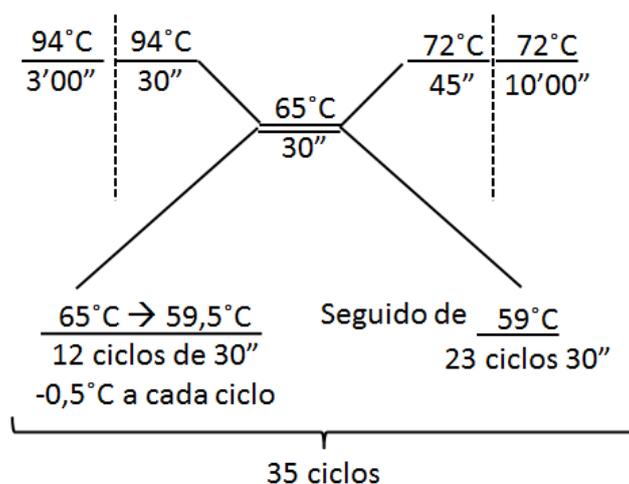
Figura 9. Esquema gráfico do ciclo modificado para o par de primers HaemNF₁ e HaemNR₃.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O segundo conjunto de *primers* HaemF + HaemR₂ descritos por Bensch, Hellgren e Perez-Tris (2004) amplificam um fragmento de 501 pb do gene do citocromo B dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus*. A principal modificação foi a inserção de um 12 ciclos de "touchdown" com decréscimo de 0,5°C na temperatura de anelamento a cada ciclo, iniciando com 65°C, atingindo 59°C no final do oitavo ciclo. O volume final foi de 25µL, contendo: 1µL do produto de PCR da reação com o primeiro par de *primers* (HaemF + HaemR₂); 1X Taq *Buffer* + KCl (Fermentas); 0,6mM de cada *primer* HaemNF e HaemR₂; 1,0mM de MgCl₂; 0,25mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato; 0,75U de Taq DNA polimerase (Fermentas). O programa incluiu: um ciclo de desnaturação inicial a 94,0 °C por 3 min, seguido de 12 ciclos de 94,0 °C por 30", 65,0 °C por 30" com touchdown e decréscimo de 0,5°C a cada ciclo e 72,0 °C por 45"; seguido de desnaturação a 94,0 °C por 3min, 23 ciclos de 94,0 °C por 30", 59,0 °C por 30" e 72,0 °C por 45"; finalizado com um passo de extensão a 72,0 °C por 10 min (Figura 10). Os produtos de PCR foram separados após eletroforese em gel de agarose à 2,0%, com tampão TBE, e foram visualizados sob luz UV pela coloração com brometo de etídeo.

Figura 10. Esquema gráfico do ciclo modificado para o par de primers HaemNF e HaemNR₂.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Como a prevalência do gênero *Leucocytozoon* na região Neotropical é menos do que 0,1% (VALKIUNAS, 2005), não foram utilizados os *primers* HaemFL + HaemR₂L nas amostras estudadas.

Após a amplificação, os produtos da reação com o par de *primers* HaemF + HaemR₂ e (BENSCH; HELLGREN; PÉREZ-TRIS, 2004) foram purificados. A um volume de 8 µl de produto de PCR, foi adicionado 1U da enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB®) e 0,5U de Exo I (Exonuclease I, USB®) e esta mistura foi submetida à 80°C por 15 min, e depois por uma hora à 37°C no termociclador *Veriti ThermalCycler*TM da *Applied Biosystems*®. A qualidade da purificação, bem como a quantidade de DNA presente, foi avaliada em gel de agarose 1% em corrida com tampão TBE, após comparação das bandas com as do marcador molecular (DNA *Ladder* 500 bp, Fermentas). As amostras purificadas foram diluídas em água estéril a fim de se obter uma concentração final do produto de aproximadamente 50ng/µl para serem usadas na reação de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer): 1µl de Big-Dye, 1µl do produto de PCR purificado (50ng/µl), 1µl do *primer* correspondente, 3µl de tampão (200mM Tris HCl pH 9.0, 5mM MgCl₂) e 4µl de água estéril, totalizando um volume final de 10µl. A reação de sequenciamento foi feita com os *primers* HaemNF + HaemNR₂ (BENSCH; HELLGREN; PÉREZ-TRIS, 2004). Os eletroferogramas

foram gerados após corrida em sequenciador automático ABI *Prism* 3730 ou 3700, no Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus de Jaboticabal.

4.4 Diagnóstico da presença dos hemoparasitas por microscopia

Os esfregaços sanguíneos foram preparados em duplicatas ou triplicatas, no local da coleta e as lâminas fixadas com metanol absoluto. No laboratório, a coloração das lâminas foi feita com solução de Giemsa a 3% e as lâminas dos indivíduos diagnosticados molecularmente como positivos foram examinadas pelo doutorando Francisco Carlos Ferreira Júnior, da equipe do Laboratório de Malária da UFMG, sob supervisão da Profa. Dra Erika Braga.

4.5 Análise filogenética

As sequências foram editadas e comparadas com o programa Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). O alinhamento de todas as sequências obtidas foi feito no programa ClustalX (THOMPSON et al, 1997) e a determinação e construção da árvore de haplótipos foram feitas, usando-se os softwares DnaSP v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e TCS (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), respectivamente.

Uma análise bayesiana foi realizada pelo programa Mr. Bayes 3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Os parâmetros do modelo de substituição nucleotídica foram selecionados usando-se o jModeltest (POSADA, 2008) seguindo-se o critério de Akaike Information Criterion (AIC) e Bayesian Information Criterion (BIC) para a inferência bayesiana. O suporte dos nós foi estimado mediante a probabilidade posterior. O modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo jModeltest para o gene do citocromo B dos hemosporídeos foi o GTR+I+R (Posada, 2008), o número de gerações de cadeias de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) foi de 7.000.000, com frequência de amostragem de 1 a cada 100 árvores. Para o cálculo das probabilidades e das árvores foi utilizado um *burn-in* de 10000. O grupo externo

elegido foi a sequência de citocromo B de *P. falciparum*, uma espécie que infecta humanos e *P. reichenowi*, uma espécie que infecta chimpanzés.

4.6 Análise de prevalência

Para obterem-se os valores de prevalência, o número de aves infectadas dentro de um país (no caso da África) ou de um estado (no caso do Brasil) foi dividido pelo número total de aves amostradas nesse mesmo território.

4.7 Comparação par-a-par das prevalências e da riqueza com o teste G

As comparações entre prevalências e entre riquezas de haplótipos foram feitas por um teste G de independência no software Bioestat (AYRES; AYRES; AYRES, 2007), comparando-se as amostras par-a-par. O valor crítico de p foi 0,05, ou seja, um valor de p menor que 0,05 era indicativo que as prevalências ou riquezas eram estatisticamente diferentes umas das outras.

Por se tratar de um teste realizado repetidas vezes em amostras independentes, a correção de Bonferroni foi aplicada para o teste G par-a-par. A correção é exemplificada pelas expressões a seguir:

$$\alpha^* = 1 - (1 - \alpha)^m$$

Onde α^* = erro conjunto;

m = número de testes realizados

α = nível descritivo

Depois de fixado o valor de α^* , calcula-se o valor de α individual:

$$\alpha = \alpha^*/m$$

5. RESULTADOS

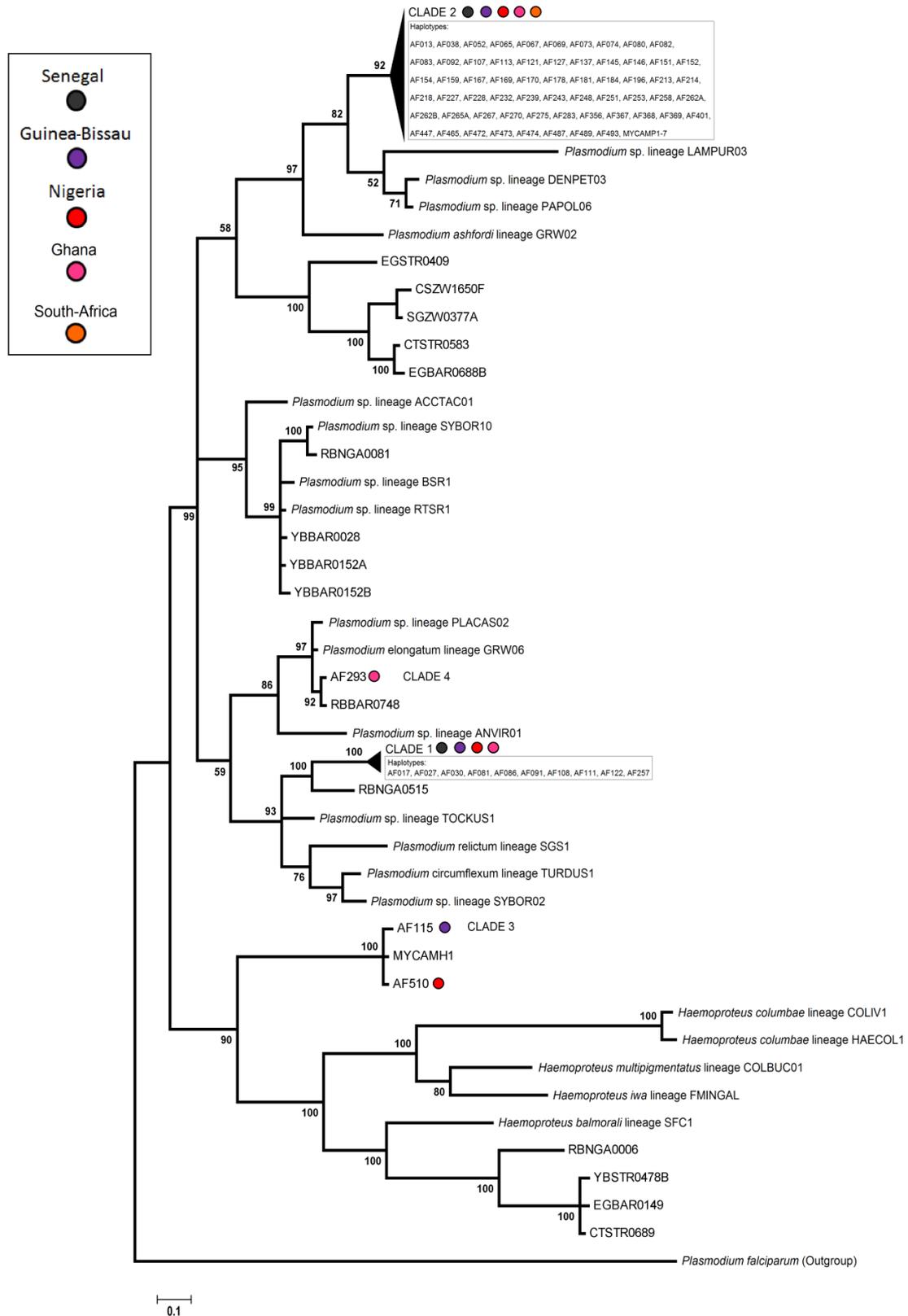
Os resultados estão apresentados em três subitens principais: ⁽¹⁾ os obtidos com as amostras dos países africanos - item 5.1; ⁽²⁾ os obtidos nas amostras do Brasil – item 5.2; ⁽³⁾ a análise comparativa entre os resultados obtidos na África e no Brasil – item 5.3.

5.1 Prevalência e diversidade dos hemoparasitas encontrados no continente africano

5.1.1 Relações filogenéticas entre as linhagens de hemoparasitas encontradas no continente africano

A árvore filogenética final construída com base na estatística bayesiana está representada na Figura 11. Nessa árvore, as relações entre os gêneros ficaram bem resolvidas. O clado 1, apesar do baixo valor de suporte do seu nó (51), inseriu-se dentro do grupo do gênero *Plasmodium* e ficou próximo às espécies *P. circumflexum* e *P. relictum*, espécies encontradas em todos os continentes (VALKIUNAS, 2005). O clado 2 é o mais prevalente e ficou incluído no grupo do gênero *Plasmodium*, mais próximo da linhagem africana LAMPUR03 (BEADELL et al, 2009), da linhagem DENPET03, encontrada na América do Norte (RICKLEFS; FALLON, 2002) e na Guiana e Uruguai (DURRANT et al, 2006), e da linhagem PAPOL06, encontrada no Brasil (LACORTE et al, 2013). O clado 4 ficou próximo à espécie *P. elongatum*, uma linhagem que está distribuída em todos os continentes e já foi relatada infectando Ciconiiformes (VALKIUNAS, 2005). O clado3 foi composto por *Haemoproteus* spp. E ficou agrupado com o clado desse gênero, com baixo valor de suporte do nó (57). A morfoespécie mais próxima a esse último grupo foi a do *H. balmorali*, encontrado na Espanha (MARTÍNEZ-DE-LA-PUENTE et al, 2011) e Lituânia (HELLGREN et al, 2007).

Figura 11. Árvore filogenética obtida por inferência Bayesiana mostrando as relações entre as linhagens de hemoparasitas do continente africano e as morfoespécies obtidas na literatura e no banco de dados MalAvi, Foram usados 97 haplótipos produzidos nesse estudo, 22 do banco de dados (16 do gênero *Plasmodium* 6 do gênero *Haemoproteus*) e 15 do trabalho de Cumming et al, 2012. Grupo externo: *P. falciparum*.



Fonte: elaborada pelo autor.

5.1.2 Prevalência dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) nas amostras africanas

A infecção pelos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) foi confirmada pela amplificação do gene de citocromo B pela técnica molecular (PCR) e a prevalência calculada para cada país foi calculada após identificação das linhagens na árvore filogenética. Os N totais de indivíduos analisados e as prevalências dos dois hemoparasitas encontram-se resumidas na Tabela 3, com as latitudes médias de cada país. A porcentagem de alguns indivíduos infectados por *Leucocytozoon* foi reportada, mas como o protocolo original não foi específico para esse hemoparasita, os valores encontrados não puderam ser reportados como prevalência.

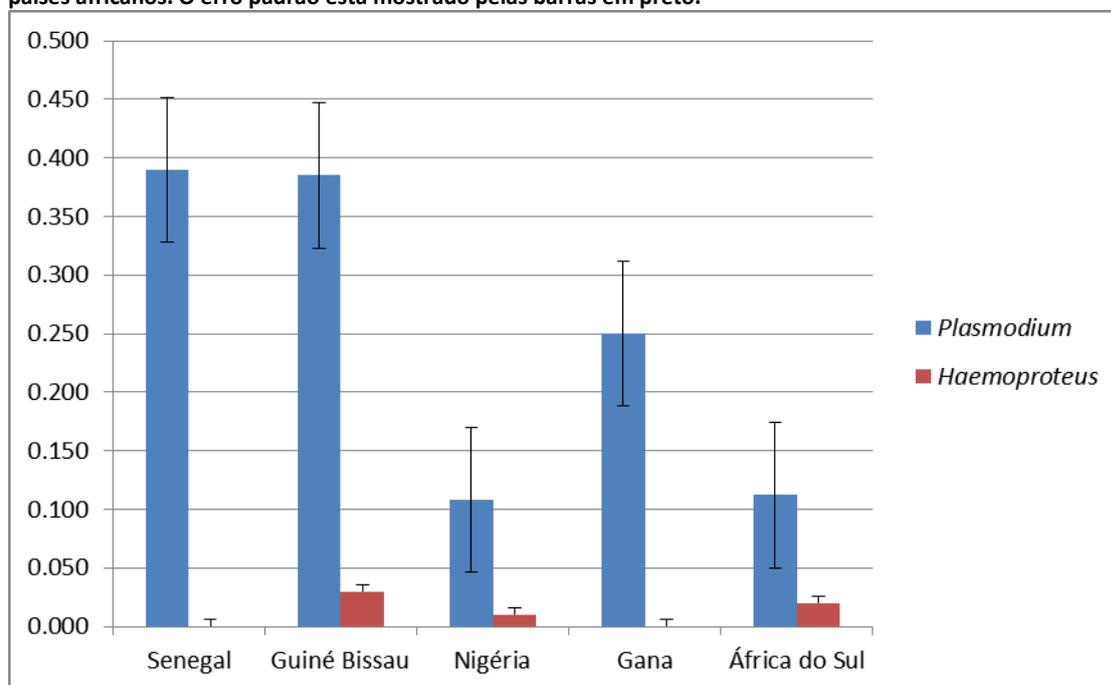
Tabela 3. Prevalência dos hemoparasitas *Plasmodium* e *Haemoproteus* nos países amostrados no continente africano.

| País | TOTAL | Latitude média | Infectados | | | |
|---------------|------------|----------------|-------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | | | <i>Plasmodium</i> | % | <i>Haemoproteus</i> | % |
| Senegal | 131 | N14°40.434' | 51 | 0.390 | 0 | - |
| Guiné Bissau | 104 | N12°16.257' | 40 | 0.385 | 3 | 0.030 |
| Nigéria | 120 | N 09°32.97' | 13 | 0.108 | 1 | 0.010 |
| Gana | 65 | N05°06.392' | 16 | 0.250 | 0 | - |
| África do Sul | 89 | S 33°29.83' | 10 | 0.112 | 2 | 0.020 |
| TOTAL | 509 | - | 134 | 0.354 | 6 | 0.010 |

Na Figura 12 está apresentado um histograma com os valores das prevalências do *Plasmodium* e de *Haemoproteus*. As maiores prevalências do gênero *Plasmodium* foram encontradas nas colônias de Guiné Bissau ($40/104 = 38\%$) e nas colônias de Senegal ($51/131 = 39\%$). As menores prevalências foram observadas nas colônias de Nigéria ($13/120 = 11\%$) e da África do Sul ($10/89 = 11\%$). A aplicação do teste G par a par por meio do software Bioestat (AYRES; AYRES; AYRES, 2007) revelou que as prevalências de *Plasmodium* entre Senegal, G. Bissau e Gana, entre Gana e África do Sul e entre Nigéria e A. do Sul não diferiram entre si. Prevalências de *Plasmodium* em Guiné Bissau e Senegal são estatisticamente diferentes das prevalências da África do Sul e da Nigéria ($p < 0,041$, depois da correção de Bonferroni). As prevalências de

Plasmodium nas colônias de Gana, comparadas com as das Nigéria também diferiram estatisticamente, porém em um nível menor ($p < 0,041$).

Figura 12. Prevalência das infecções pelos gêneros *Plasmodium* (em azul) e *Haemoproteus* (em vermelho) nos países africanos. O erro padrão está mostrado pelas barras em preto.



Fonte: elaborada pelo autor.

Foram encontrados dois indivíduos em Guiné Bissau e dois em Gana com dupla infecção pelo gênero *Plasmodium* (indivíduos AF062 e AF027 de Guiné Bissau, AF265 e AF262 de Gana).

Indivíduos infectados pelo gênero *Haemoproteus* não foram encontrados em todos os países amostrados e as porcentagens encontradas foram baixas, quando comparadas às prevalências do gênero *Plasmodium*. A maior prevalência do gênero *Haemoproteus* foi encontrada nas colônias de Guiné Bissau ($3/104 = 3\%$) e a menor na Nigéria ($13/120 = 1\%$). O teste G revelou que essas prevalências não são estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Foram detectados pelo protocolo descrito para diagnosticar *Plasmodium* e *Haemoproteus* sete indivíduos que parecem estar infectados pelo gênero *Leucocytozoon*: na Nigéria ($6/120 = 0,05$) e na África do Sul ($1/89 = 0,01$). A análise pelo BLAST no GeneBank demonstrou que essas sequências possuem 100% de similaridade com a linhagem cujo código é HF543631, depositada nesse banco de dados e identificada como pertencente ao gênero *Haemoproteus* (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al,

2013). O diagnóstico molecular com o protocolo dos *primers* HaemFL + HaemR₂L , descritos (HELLGREN; WALDENSTROM; BENSCH, 2004) confirmará tal suspeita.

5.1.3 Diversidade das linhagens dos hemoparasitas

O conjunto das sequências dos fragmentos de citocromo B dos hemoparasitas encontradas foi analisado pelo programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009), sendo determinados 78 haplótipos (Tabela 10 no Apêndice). Na Tabela 4 estão apresentados os números dos haplótipos encontrados nos diversos países africanos.

Tabela 4. Latitudes, número de haplótipos, e índices de diversidade (número de haplótipos / número de infectados) nos países amostrados no continente africano. P = *Plasmodium*; H = *Haemoproteus*.

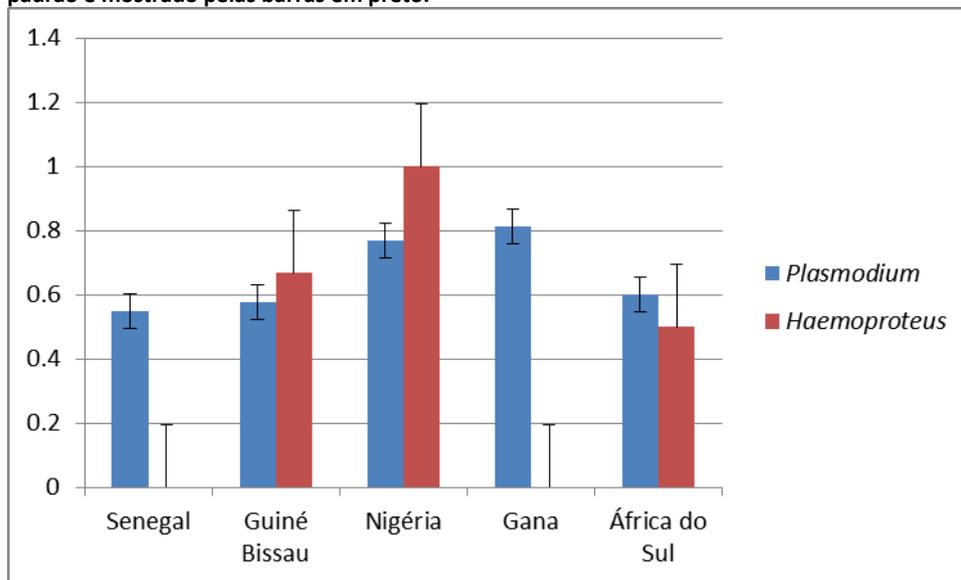
| País | Latitude média | Nº Infectados | | Haplótipos | | Índice de diversidade (Haplótipos/Infectados) | |
|---------------|----------------|---------------|---|------------|---|---|-------|
| | | P | H | P | H | P | H |
| Senegal | N14°40.434' | 51 | 0 | 28 | 0 | 0.549 | 0.000 |
| Guiné Bissau | N12°16.257' | 40 | 3 | 23 | 2 | 0.575 | 0.667 |
| Nigéria | N09°32.97' | 13 | 1 | 10 | 1 | 0.769 | 1.000 |
| Gana | N05°06.392' | 16 | 0 | 13 | 0 | 0.813 | 0.000 |
| África do Sul | S33°30.683' | 10 | 2 | 6 | 1 | 0.600 | 0.500 |

Alguns dos haplótipos encontrados na África apresentaram 100% de similaridade com linhagens já depositadas no GenBank. O haplótipo 8 , encontrado em Guiné Bissau e Senegal, foi previamente encontrado em *Aedes esoensis* (GenBank access number AB613275.1) na região subártica do Japão (EJIRI et al, 2011). O haplótipo 20 (GenBank access number JN164714.1) foi descrito previamente no gênero *Milvus* (família Accipitridae), coletado em toda a Europa. O haplótipo 96 (GenBank access number HF543631.1) foi descrito em aves do gênero *Milvus*, coletadas na Espanha (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al, 2013).

Os maiores índices de diversidades do gênero *Plasmodium* foram encontrados na Nigéria e Gana (Figura 13), países localizados na região equatorial e os maiores índices de *Haemoproteus* também estão nessa região. Os dados relativos ao

Haemoproteus são restritos e não permitem inferências sobre os níveis de diversidade na Nigéria, G.Bissau e Senegal, apesar de representados na Figura 13.

Figura 13. Diversidade dos haplótipos do gênero *Plasmodium* (em azul) e *Haemoproteus* (em vermelho). O erro padrão é mostrado pelas barras em preto.



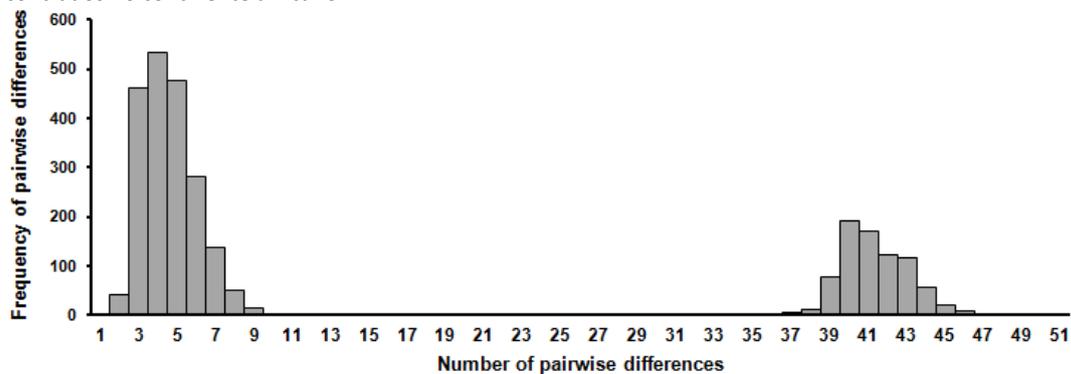
Fonte: elaborada pelo autor.

5.1.4 Análise das diferenças pareadas entre as sequências de citocromo B determinadas para amostras africanas

A Figura 14 ilustra as frequências das diferenças pareadas encontradas entre as sequências do citocromo B das amostras africanas. A primeira moda do histograma representa a variação genética encontrada dentro de um clado, para o fragmento de 477 pares de base (HELLGREN; WALDENSTROM; BENSCH. 2004), com uma variação entre 0,2% a 1,0%. A segunda moda, por sua vez, representa a variação genética encontrada entre as sequências pertencentes a diferentes clados, explicada por um intervalo de 7,0% a 9,0% da variação. Esses dados revelam que consideramos como pertencentes a um mesmo clado as sequências que apresentavam nove ou um número menor de passos mutacionais diferentes entre si; semelhantemente, consideramos as sequências que possuem de 37 a 46 passos mutacionais diferentes entre si como pertencentes a clados diferentes (espécies bem distintas ou gêneros diferentes). A

região central do histograma da Figura 14 pode ser considerada um “Barcoding Gap” e indica que o grupo amostrado pode ser identificado pela filogenética molecular.

Figura 14. Curva das frequências das diferenças pareadas encontradas entre as sequências dos hemoparasitas encontrados no continente africano.

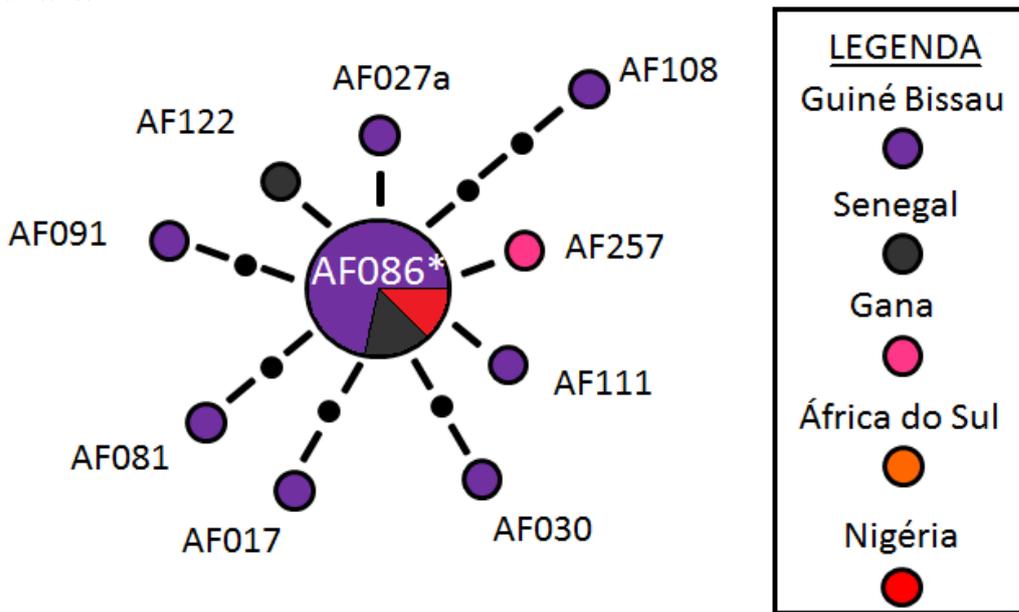


Fonte: elaborada pelo autor.

5.1.5 Rede de haplótipos determinada entre as linhagens africanas

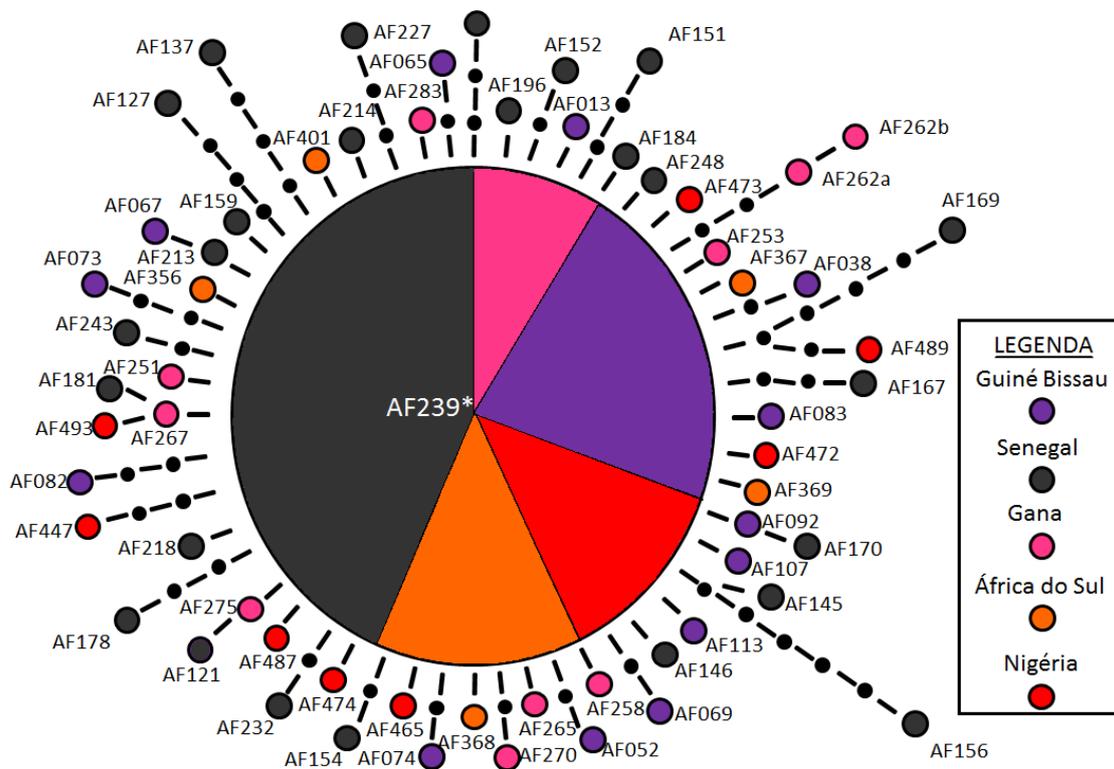
As sequências do continente africano agruparam-se em quatro clados distintos segundo as relações expressas na Figura 11, porém, somente duas dessas redes de haplótipos foram contruídas, porque o clado 3 contém dois haplótipos e o clado 4 é formado por um único haplótipo. As duas redes de haplótipos com detalhes das relações entre os haplótipos encontrados nos clados 1 e 2 da árvore filogenética da Figura 11 estão ilustradas nas Figuras 15 e 16, respectivamente. O haplótipo central foi inferido pelo programa como sendo o ancestral dos demais haplótipos.

Figura 15. Rede de haplótipos construída a partir das linhagens do clado 1 da Figura 11 dos hemoparasitas africanos.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 16. Rede de haplótipos do clado2 da Figura 11 das linhagens dos hemoparasitas africanos.



Fonte: elaborada pelo autor.

Na Figura 16 fica evidente que a partir de um haplótipo mais comum derivaram-se 61 haplótipos. Esse haplótipo mais comum está mais representado na

população do Senegal. Vinte e quatro haplótipos derivados foram encontrados no Senegal, 14 haplótipos em Guiné Bissau, 10 haplótipos em Gana, oito haplótipos na Nigéria e cinco na África do Sul.

5.2 Prevalência e diversidade dos hemoparasitas encontrados nas regiões brasileiras

5.2.1 Identificação nas árvores filogenéticas das linhagens dos hemoparasitas encontradas nas regiões brasileiras

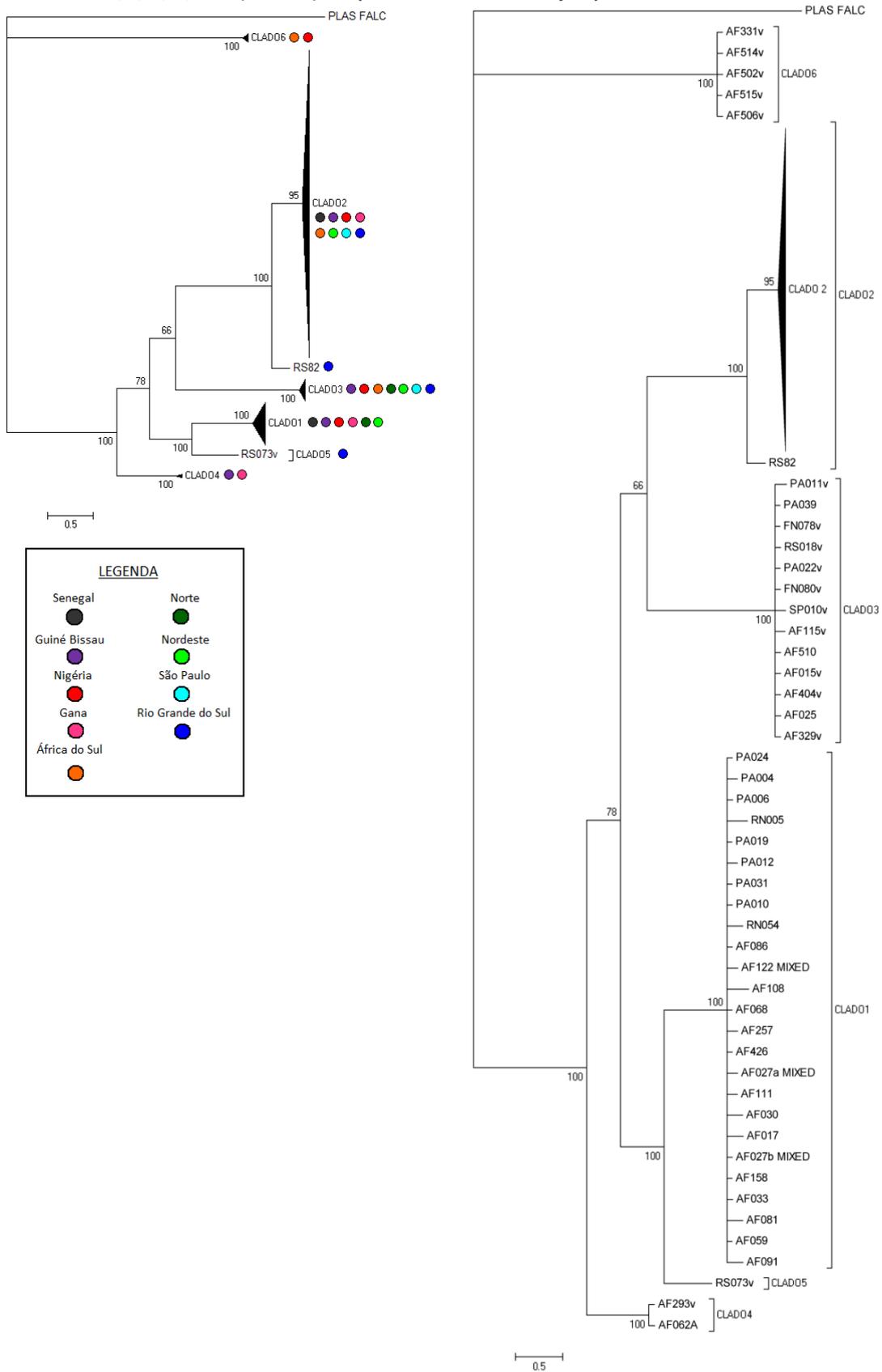
Como a árvore filogenética com os dados africanos foi altamente informativa, utilizamos o mesmo “background” para a construção da árvore incluindo os dados brasileiros mais as linhagens africanas descritas no item 5.1.1.

A árvore construída com todas as linhagens obtidas nesse trabalho e as linhagens da literatura e de base de dados, utilizadas como “background” nessa análise (Figura 17) revelou a presença de seis clados filogeneticamente distintos entre si. Os clados de números 1, 2, 4 e 5 caracterizaram o gênero *Plasmodium*; o clado número 3 o gênero *Haemoproteus* e o clado 6 o gênero *Leucocytozoon* (Figura 17). Alguns nós apresentaram suporte baixos, por exemplo (78) entre os clados 2 e 3 e o clado 1, e (66) entre os clados 2 e 3, mas essa foi a melhor resolução encontrada com esse conjunto de dados.

Durante as coletas de sangue das aves, algumas lâminas de esfregaço sanguíneo foram confeccionadas. Um total de 53,8% das infecções por *Plasmodium* foram confirmadas por meio da análise morfológica (39 de 117) e os detalhes do diagnóstico molecular encontram-se no Apêndice (item 9.3). Em Guiné Bissau, 37,2% das infecções detectadas pelo diagnóstico molecular foram confirmadas pela análise morfológica (17 lâminas entre 40 indivíduos positivos); em Senegal, 50,9% foram confirmadas (26 lâminas entre 51 indivíduos positivos); 78,5% das infecções foram confirmadas em Gana (11 lâminas entre 14 indivíduos positivos); e na África do Sul, 75% das infecções foram confirmadas (9 lâminas entre 12 indivíduos positivos).

Em relação aos indivíduos infectados por *Haemoproteus*, foi feito esfregaço sanguíneo somente para uma amostra e essa lâmina apresentava baixa qualidade para visualização no microscópio, de modo que não foi possível confirmar a presença desse gênero morfológicamente. As lâminas confeccionadas para apenas um dos indivíduos infectados pelo gênero *Leucocytozoon* também apresentava baixa qualidade (AF331 da África do Sul). Nesse esfregaço, foram visualizadas formas similares ao estágio eritrocitário do *Leucocytozoon*, porém a qualidade da lâmina não permitiu essa confirmação e também foram visualizados trofozoítos nesse esfregaço, caracterizando uma dupla infecção mista (*Leucocytozoon* e *Plasmodium*).

Figura 17. Árvore com todas as linhagens (África e Brasil) em clados condensados (à esquerda) e o detalhamento dos clados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (à direita). Grupo externo: *Plasmodium falciparum*.

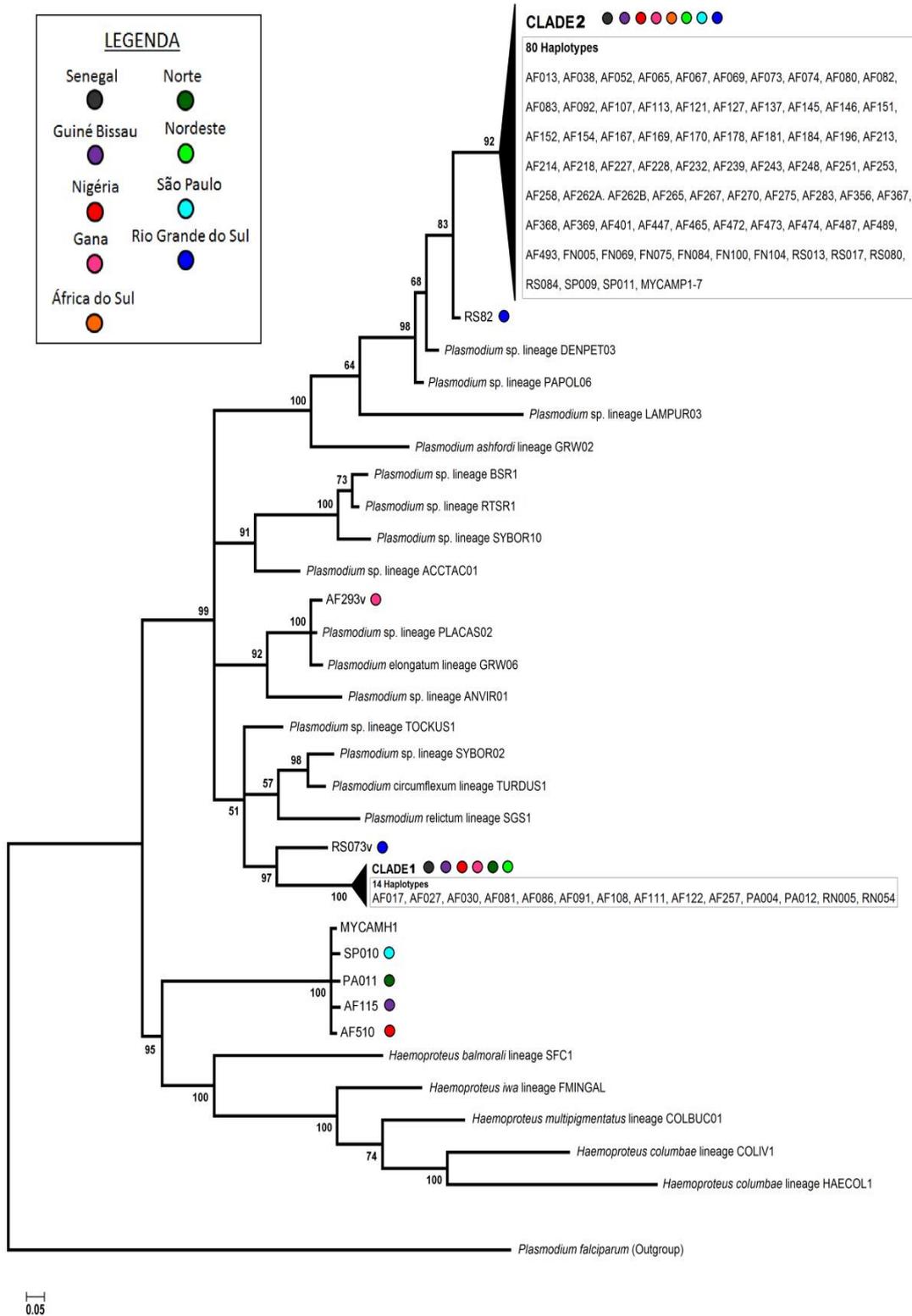


Fonte: elaborada pelo autor.

Algumas outras árvores foram feitas antes de chegar-se a árvore diagnóstica final (Figura 18). Para a primeira árvore foi feita uma seleção de linhagens na base de dados MalAvi (BENSCH; HELLGREN, PÉREZ-TRIS, 2009), escolhendo-se as sequências determinadas no continente africano e na América do Sul. Todavia, grande parte dessa seleção não se relacionava bem com as linhagens obtidas nesse trabalho (muito distantes filogeneticamente) e acabaram por gerar ruído na árvore, tornando-a pouco informativa. Para a segunda árvore, foram utilizadas morfoespécies bem conhecidas e não necessariamente da região geográfica das coletas desse trabalho, resultando numa árvore mais informativa. Para a árvore final (Figura 18), foram selecionadas sequências que mais se relacionavam com as nossas linhagens (da primeira árvore) e as morfoespécies mais informativas (da segunda árvore). Esse “background” foi usado para se traçar a árvore apresentada na análise das amostras da África e Brasil.

O clado 1 na Figura 18 continua proximamente relacionado à espécie *P. relictum*, e nessa árvore se mostrou relacionado à linhagem do indivíduo RS073 do clado 5. As linhagens do clado 2 como na árvore da Figura 11 continuaram relacionadas às linhagens DENPET03, PAPOL06 e LAMPUR03. O clado 3, pertencente ao gênero *Haemoproteus*, posicionou-se basalmente a esse grande grupo na árvore. O clado 4 ficou proximamente relacionado às linhagens de *Plasmodium* PLACAS02 e GRW06. O clado 6, pertencente ao gênero *Leucocytozoon*, não foi inserido na análise para se evitar o artefato de “atração de ramo longo”. Nota-se que a presença do clado de *Haemoproteus* na árvore torna parafilético o clado de *Plasmodium*, por posicionar-se entre o grupo de plasmódios de aves e o grupo de plasmódios de humanos.

Figura 18. Árvore filogenética obtida por inferência Bayesiana com as linhagens de hemoparasitas do continente africano e do Brasil, junto com morfoespécies obtidas na literatura e linhagens do banco de dados MalAvi. Foram incluídos na análise 97 haplótipos produzidos nesse estudo e 22 de banco de dados (16 do gênero *Plasmodium* 6 do gênero *Haemoproteus*) Grupo externo: *P. falciparum*.



Fonte: elaborada pelo autor.

5.2.2 Prevalência dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) nas amostras brasileiras

O total de indivíduos coletados em cada região brasileira e as prevalências dos hemoparasitas está resumido na Tabela 5. A amostra de São Paulo foi subdividida em duas partes: a correspondente aos ninhegos e outra parte referente aos adultos. Nas análises posteriores, apenas a soma dessas duas categorias foi considerada, sendo os números destacados em negrito os que foram considerados nas comparações.

Tabela 5. Número de indivíduos amostrados e prevalência de hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) nos estados amostrados do território brasileiro.

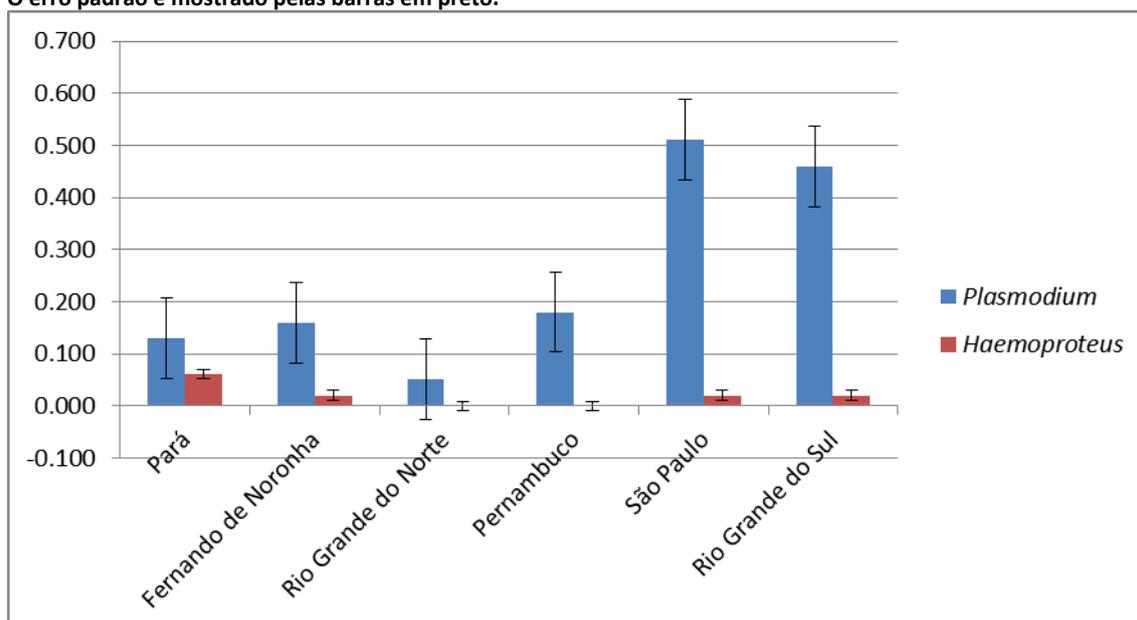
| Estado | TOTAL | Latitude | Número de infectados | | | | |
|---------------------|-----------------|-------------|----------------------|-----------|-------------|----------|-------------|
| | | | P | % | H | % | |
| Pará | 53 | S00°30.325' | 7 | 0.13 | 3 | 0.06 | |
| Fernando de Noronha | 99 | S03°51.000' | 16 | 0.16 | 2 | 0.02 | |
| Rio Grande do Norte | 80 | S05°37.462' | 4 | 0.05 | 0 | - | |
| Pernambuco | 22 | S08°52.00' | 4 | 0.18 | 0 | - | |
| São Paulo | Ninhegos | 36 | S22°30.00' | 16 | 0.44 | 1 | 0.03 |
| | Adultos | 19 | | 12 | 0.63 | 0 | - |
| | Total SP | 55 | | 28 | 0.51 | 1 | 0.02 |
| Rio Grande do Sul | 41 | S30°01.00' | 19 | 0.46 | 1 | 0.02 | |
| TOTAL | 350 | - | 79 | 0.23 | 7 | 0.02 | |

A Figura 19 compara as prevalências dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) nas populações brasileiras. As maiores prevalências do gênero *Plasmodium* no Brasil foram encontradas nas colônias de São Paulo (29/55 = 51%) e do Rio Grande do Sul (19/41 = 46%); enquanto que a menor prevalência foi encontrada na colônia do Rio Grande do Norte (4/80 = 5%). De acordo com o teste G par a par, a prevalência no Rio Grande do Norte (a menor de todas) diferiu estatisticamente da encontrada para: Fernando de Noronha ($p < 0,036$, depois da correção de Bonferroni), São Paulo ($p < 0,036$) e Rio Grande do Sul ($p < 0,036$). A prevalência no Pará foi estatisticamente diferente da prevalência de São Paulo ($p < 0,036$) e do Rio Grande do

Sul ($p < 0,036$). A prevalência de Fernando de Noronha foi estatisticamente diferente da reportada para São Paulo ($p < 0,036$) e Rio Grande do Sul ($p < 0,036$).

Entre as prevalências pelo gênero *Haemoproteus*, a maior delas é a do Pará ($3/53 = 6\%$). No Brasil assim como na África, o número de indivíduos infectados pelo gênero *Haemoproteus* foi consideravelmente menor do que o dos infectados pelo gênero *Plasmodium*.

Figura 19. Prevalência dos gêneros *Plasmodium* (em azul) e *Haemoproteus* (em vermelho) nas regiões brasileiras. O erro padrão é mostrado pelas barras em preto.



Fonte: elaborada pelo autor.

5.2.3 Diversidade de linhagens dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) encontradas nas amostras brasileiras

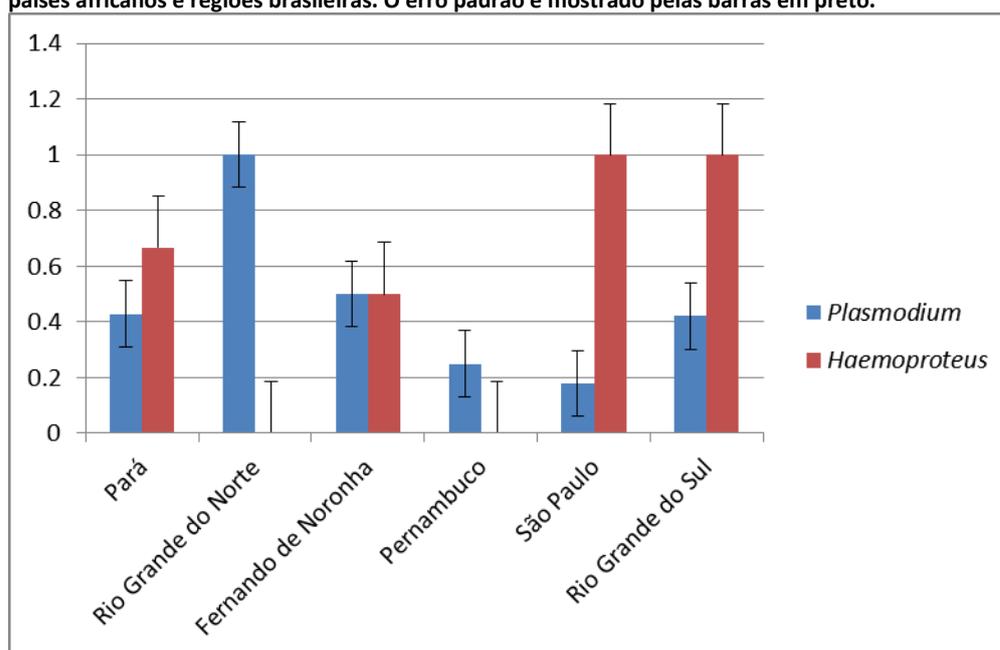
A Tabela 6 resume a riqueza dos hemoparasitas amostrados nas populações de garça-vaqueira no Brasil. Alguns dos haplótipos encontrados no Brasil apresentaram 100% de similaridade com linhagens depositadas no GenBank. O haplótipo 8 (GenBank access number AB613275.1) foi encontrado no Pará e em dois países da África nesse estudo (item 5.1.3) e foi previamente encontrado em *Aedes esoensis* na região subártica do Japão (EJIRI *et al*, 2011). O haplótipo 19 foi descrito previamente na espécie *Phaeomyias murina* (família Tyrannidae), coletada na região sudeste do Brasil (GenBank access number JX029862.1) (LACORTE *et al*, 2013).

Tabela 6. Latitudes, número de haplótipos, índice de diversidade (número de haplótipos / número de infectados) dos hemoparasitas *Plasmodium* e *Haemoproteus* nas regiões do Brasil. P = *Plasmodium*, H = *Haemoproteus*.

| Região | Latitude média | Nº de Infectados | | Haplótipos | | Índice de diversidade (Haplótipos/Infectados) | |
|---------------------|----------------|------------------|---|------------|---|---|-------|
| | | P | H | P | H | P | H |
| Pará | S00°30.325' | 7 | 3 | 3 | 2 | 0.429 | 0.667 |
| Rio Grande do Norte | S05°37.462' | 4 | 0 | 4 | 0 | 1.000 | 0.000 |
| Fernando de Noronha | S03°51.000' | 16 | 2 | 8 | 1 | 0.500 | 0.500 |
| Pernambuco | S08°0.866' | 4 | 0 | 1 | 0 | 0.250 | 0.000 |
| São Paulo | S22°0.500' | 28 | 1 | 5 | 1 | 0.179 | 1.000 |
| Rio Grande do Sul | S30°0.016' | 19 | 1 | 8 | 1 | 0.421 | 1.000 |

A Figura 20 resume os índices de diversidade dos hemoparasitas encontrados nas amostras brasileiras. O maior número de haplótipos de *Plasmodium* foi encontrado em Fernando de Noronha e no Rio Grande do Sul (N = 8), mas o maior índice de diversidade no Brasil foi encontrada no Rio Grande do Norte, local onde foram coletados quatro garças infectadas por *Plasmodium* e a análise pelo DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009) revelou a presença de quatro haplótipos distintos (Figura 20). Os dados relativos ao *Haemoproteus* são restritos e não permitem comparações entre os níveis de diversidade encontrados nas amostras brasileiras.

Figura 20. Diversidade de linhagens dos gêneros *Plasmodium* (em azul) e *Haemoproteus* (em vermelho) nos países africanos e regiões brasileiras. O erro padrão é mostrado pelas barras em preto.



Fonte: elaborada pelo autor.

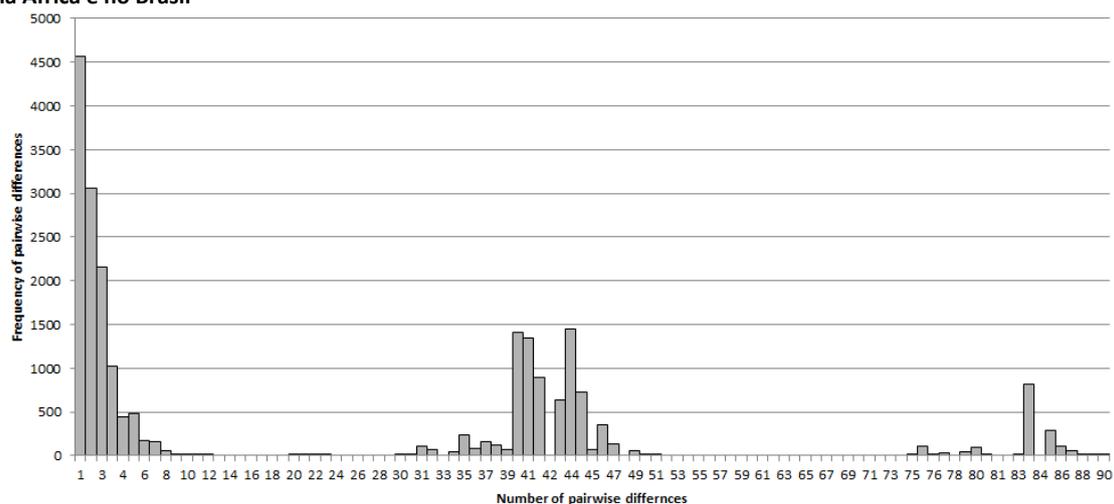
5.3 Análise comparativa entre os hemoparasitas identificados nas populações de garça vaqueira na África e no Brasil

Uma análise comparativa incluindo dados obtidos para os hemoparasitas identificados nas amostras dos países africanos e das regiões brasileiras serão apresentados nos itens que se seguem.

5.3.1 Análise das diferenças pareadas das sequências dos hemoparasitas nas amostras brasileiras e africanas

O conjunto de resultados obtidos para as amostras do continente africano e do território brasileiro estão apresentados na Figura 21. Nesse caso, foram encontradas três modas de variação: a primeira representa a variação dentro de um clado e a segunda, a variação entre os clados. A terceira moda é resultante da adição das linhagens do gênero *Leucocytozoon* (encontrados só na África), indicando que os gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* diferem desse terceiro gênero em 75 a 90 passos mutacionais.

Figura 21. Frequência das diferenças pareadas encontradas entre as sequências de hemoparasitas identificados na África e no Brasil

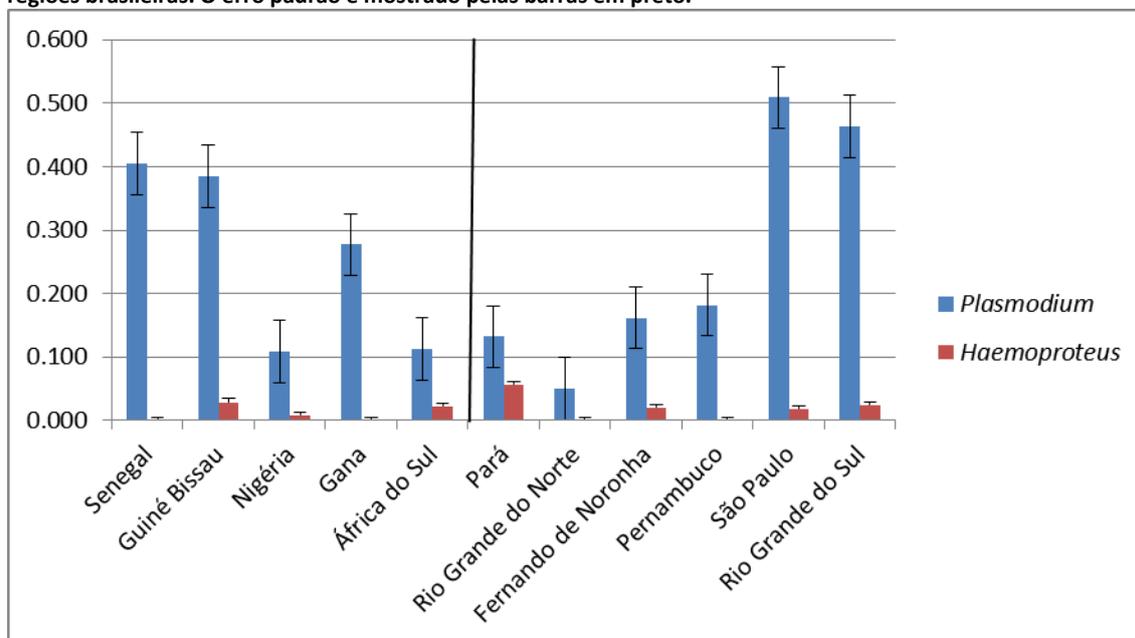


Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.2 Comparação das prevalências e diversidades entre África e Brasil

A Figura 22 compara a prevalência dos hemoparasitas encontrada nas amostras africanas e brasileiras, os dados do gráfico remetem ao conteúdo da Tabela 3 e da Tabela 5. Pode-se notar que enquanto a prevalência africana de *Plasmodium* spp. vai diminuindo do norte para sul, acontece o oposto com a brasileira que aumenta no sentido norte para o sul. As prevalências totais dos hemoparasitas na África e no Brasil não foram estatisticamente diferentes.

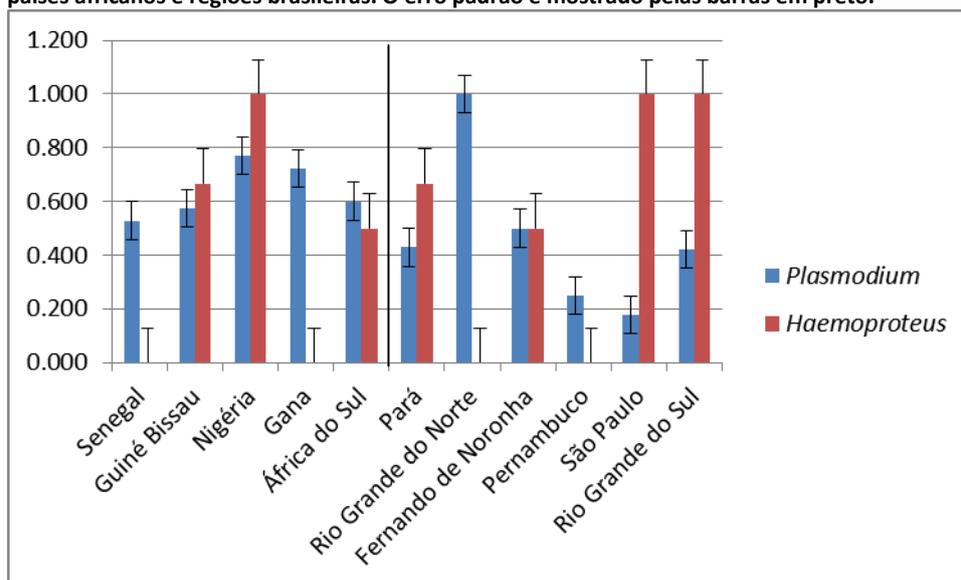
Figura 22. Prevalências dos gêneros *Plasmodium* (em azul) e *Haemoproteus* (em vermelho) nos países africanos e regiões brasileiras. O erro padrão é mostrado pelas barras em preto.



Fonte: elaborada pelo autor.

A Figura 23 compara os índices das diversidades de linhagens dos hemoparasitas encontrados nas amostras africanas e brasileiras, os dados do gráfico remetem ao conteúdo da Tabela 4 e da Tabela 6. De acordo com o teste G par a par, As riquezas de Guiné Bissau, Senegal, Nigéria e Gana diferiram significativamente da riqueza de São Paulo ($p < 0,026$, após a correção de Bonferroni).

Figura 23. Diversidade de linhagens dos gêneros *Plasmodium* (em azul) e *Haemoproteus* (em vermelho) nos países africanos e regiões brasileiras. O erro padrão é mostrado pelas barras em preto.



Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.3 Rede de Haplótipos

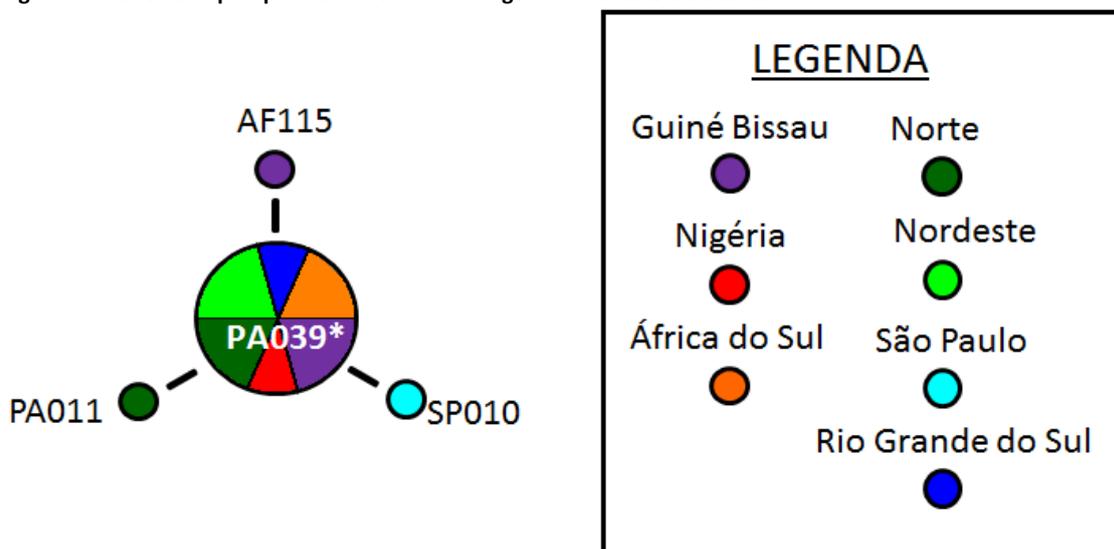
Da mesma forma que foi feito para as linhagens dos hemoparasitas encontradas na África, as redes de haplótipos para as amostras brasileiras juntamente com as africanas estão representadas na Figura 24, Figura 25 e Figura 26. Três redes de haplótipos foram contruídas correspondendo aos clados 1,2 e 3. Os clado 4, 5 e 6 foram formados por um único haplótipo.

Na Figura 24 fica mostrado que a partir do haplótipo ancestral do clado 1, foram encontrados: um haplótipo derivado no Senegal, sete em Guiné Bissau, um em Gana, dois no Pará e dois no Rio Grande do Norte. As relações entre os haplótipos nesse clado apontam para uma conexão África- Brasil uma vez que o haplótipo mais comum ocorre em três países africanos, posicionados na costa oeste, um provável ponto de “saída” das garças para o continente africano. Entre os haplótipos derivados encontramos alguns presentes nos estados brasileiros, próximos ao ponto do primeiro registro histórico de *B. ibis* no Brasil: Rio Grande do Norte e Pará.

reportados (Exemplo: na rede da Figura 16, há 25 haplótipos em Guiné Bissau e na rede da Figura 25 há 23 haplótipos). A distribuição dos haplótipos derivados não é coincidente com a da Figura 16 porque alguns desses haplótipos estão compartilhados entre indivíduos de duas ou mais localidades diferentes e o programa TCS acaba atribuindo esses haplótipos a localidades diferentes.

No clado 3, a partir do haplótipo ancestral e mais comum foram derivados: um haplótipo em Guiné Bissau, um no Pará e outro em São Paulo (Figura 26).

Figura 26. Rede de haplótipos do clado 3 das linhagens africanas e brasileiras.



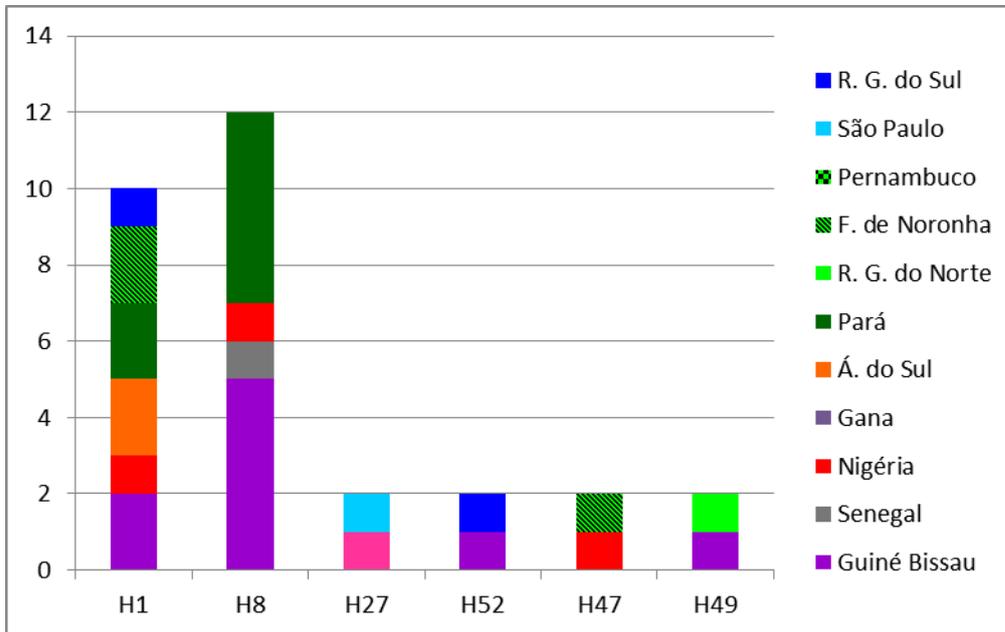
Fonte: elaborada pelo autor.

5.3.3 Haplótipos compartilhados

As Figura 27 e 28 mostram as frequências dos haplótipos compartilhados e os locais onde os hospedeiros foram amostrados. O haplótipo 1 do clado 3 (gênero *Haemoproteus*) ocorreu no Rio Grande do Sul, Fernando de Noronha, Pará, África do Sul, Nigéria e Guiné Bissau (Figura 27). O haplótipo 8 do clado 1 (gênero *Plasmodium*) ocorreu no Senegal, Guiné Bissau, Nigéria e o estado do Pará (Figura 27). No clado 2 (gênero *Plasmodium*), ocorreu um número maior de haplótipos compartilhados entre África e Brasil (cinco): o haplótipo 27 foi encontrado em Gana e em São Paulo; o haplótipo 52 foi encontrado em Guiné Bissau e no Rio Grande do Sul; o haplótipo 47 ocorreu na Nigéria e em Fernando de Noronha; o haplótipo 49 ocorreu em Guiné

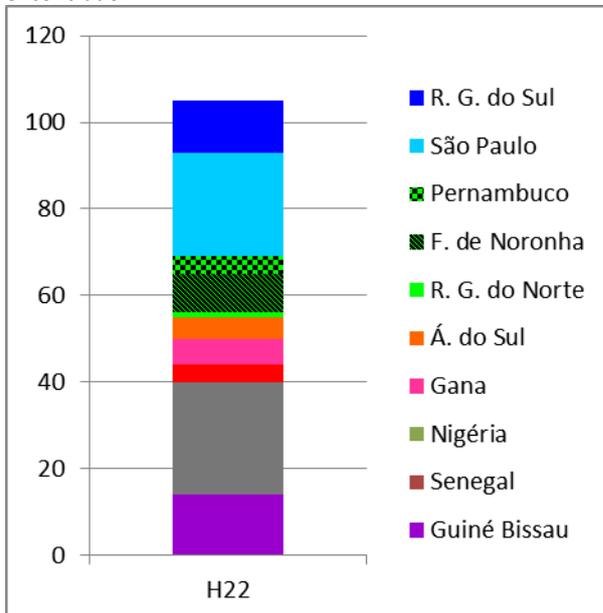
Bissau e Rio Grande do Norte. O haplótipo 22, o mais numeroso, foi compartilhado entre todas as regiões amostradas, com exceção do Pará (Figura 28).

Figura 27. Histograma com as frequências dos haplótipos compartilhados com as regiões onde foram encontrados.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 28. Histograma com a frequência do haplótipo compartilhado de número 22 com as regiões onde ele foi encontrado.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nas Tabelas 7, 8 e 9 apresentam compararm os índices de diversidade dos haplótipos dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* nas populações da área nativa

(continente africano) e da área colonizada (Brasil) diagnosticados nos hospedeiros *B. ibis*. Um total de 70 haplótipos foi encontrado somente no continente africano, 20 haplótipos somente no Brasil, e 7 haplótipos estão compartilhados entre as duas áreas. Esse resultado mostra que há um maior número de linhagens na área nativa da garça vaqueira, uma das predições da Hipótese da Liberação do Inimigo.

Tabela 7. Comparação dos índices de riquezas dos haplótipos compartilhados de *Plasmodium* e nas populações do hospedeiro nos países africanos (área nativa) e nas regiões brasileiras (área colonizada). O valor de N corresponde ao total de indivíduos coletados na região.

| | Área Nativa | | | | | Área Colonizada | | | | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | SE | GB | NI | GA | AS | PA | RN | FN | PE | SP | RS |
| N = | 131.0 | 104.0 | 120.0 | 65.0 | 89.0 | 53.0 | 80.0 | 99.0 | 22.0 | 55.0 | 41.0 |
| H1 | - | 5.0 | 7.7 | - | 20.0 | 28.6 | - | 12.5 | - | - | 5.3 |
| H8 | 2.0 | 12.5 | 7.7 | - | - | 71.4 | - | - | - | - | - |
| H22 | 51.0 | 35.0 | 30.8 | 37.5 | 50.0 | - | 25.0 | 56.3 | 100.0 | 85.7 | 63.2 |
| H27 | - | - | - | 6.3 | - | - | - | - | - | 3.6 | - |
| H47 | - | - | 7.7 | - | - | - | - | 6.3 | - | - | - |
| H49 | - | 2.5 | - | - | - | - | 25.0 | - | - | - | - |
| H52 | - | 2.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | 5.3 |

Tabela 8. Índices de riqueza dos haplótipos encontradas nas populações do hospedeiro somente no Brasil. O valor de N corresponde ao total de indivíduos coletados no estado ou na região.

| | Área Colonizada | | | | | |
|------------|-----------------|------|-----|----|-----|-----|
| | PA | RN | FN | PE | SP | RS |
| N = | | | | | | |
| H2 | 14.2 | - | - | - | - | - |
| H3 | - | - | - | - | 3.5 | - |
| H5 | 14.2 | - | - | - | - | - |
| H11 | - | 25.0 | - | - | - | - |
| H12 | 14.2 | - | - | - | - | - |
| H15 | - | 25.0 | - | - | - | - |
| H19 | - | - | - | - | - | 5.2 |
| H32 | - | - | 6.2 | - | - | - |
| H37 | - | - | - | - | 3.5 | - |
| H39 | - | - | - | - | - | 5.2 |
| H46 | - | - | 6.2 | - | - | - |
| H64 | - | - | 6.2 | - | 3.5 | - |
| H65 | - | - | - | - | - | 5.2 |
| H66 | - | - | - | - | 3.5 | - |
| H67 | - | - | - | - | - | 5.2 |
| H78 | - | - | 6.2 | - | - | - |
| H85 | - | - | 6.2 | - | - | - |
| H86 | - | - | - | - | - | 5.2 |
| H91 | - | - | 6.2 | - | - | - |
| H95 | - | - | - | - | - | 5.2 |

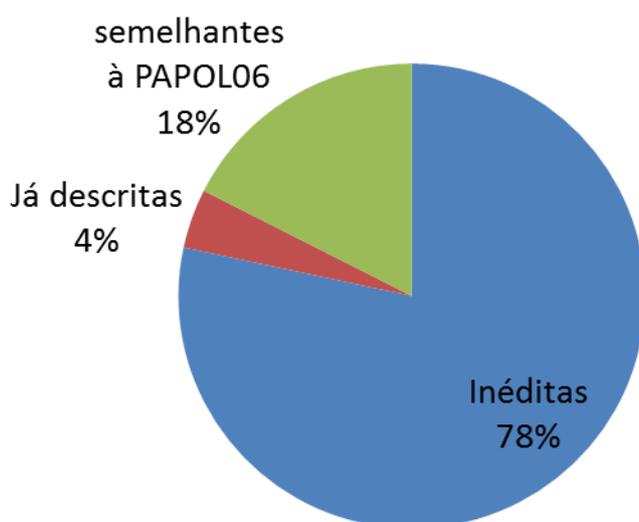
Tabela 9. Índices de riqueza dos haplótipos encontradas nas populações do hospedeiro somente na África. O valor de N corresponde ao total de indivíduos coletados no país.

| Área Nativa | | | | | | Área Nativa | | | | | |
|-------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | SE | GB | NI | GA | AS | | SE | GB | NI | GA | AS |
| N = | 131.00 | 104.00 | 120.00 | 65.00 | 89.00 | N = | 131.00 | 104.00 | 120.00 | 65.00 | 89.00 |
| H6 | - | 2.50 | - | - | - | H55 | - | - | 7.69 | - | - |
| H7 | - | - | - | 6.25 | - | H56 | 1.96 | - | - | - | - |
| H9 | 1.96 | - | - | - | - | H57 | - | 2.50 | - | - | - |
| H10 | - | 2.50 | - | - | - | H58 | 1.96 | - | - | - | - |
| H13 | - | 2.50 | - | - | - | H59 | 1.96 | - | - | - | - |
| H14 | - | 2.50 | - | - | - | H60 | 1.96 | - | - | - | - |
| H16 | - | 2.50 | - | - | - | H61 | 1.96 | - | - | - | - |
| H17 | - | 2.50 | - | - | - | H62 | - | 2.50 | - | - | - |
| H18 | - | 2.50 | - | - | - | H63 | - | - | 7.69 | - | - |
| H20 | - | 2.50 | - | 6.25 | - | H68 | 1.96 | - | - | - | - |
| H21 | 1.96 | - | - | - | - | H69 | - | 2.50 | - | - | - |
| H23 | - | - | - | 6.25 | - | H70 | 1.96 | - | - | - | - |
| H24 | - | - | - | - | 10.00 | H71 | 1.96 | - | - | - | - |
| H25 | 1.96 | - | - | - | - | H72 | - | 2.50 | - | - | - |
| H26 | - | - | 7.69 | - | - | H73 | - | - | - | 6.25 | - |
| H28 | - | - | - | 6.25 | - | H74 | - | - | - | 6.25 | - |
| H29 | - | 2.50 | - | - | - | H75 | - | 2.50 | - | - | - |
| H30 | 1.96 | - | - | - | - | H76 | - | 2.50 | - | - | - |
| H31 | 1.96 | - | - | - | - | H77 | 1.96 | - | - | - | - |
| H33 | - | - | 7.69 | - | - | H79 | - | 2.50 | - | - | - |
| H34 | - | - | - | 6.25 | - | H80 | - | 2.50 | - | - | - |
| H35 | 1.96 | - | - | - | - | H81 | - | - | 7.69 | - | - |
| H36 | - | - | - | 6.25 | - | H82 | - | - | - | 6.25 | - |
| H38 | 1.96 | - | - | - | - | H83 | 1.96 | - | - | - | - |
| H40 | - | - | - | 6.25 | - | H84 | - | 2.50 | - | - | - |
| H41 | 1.96 | - | - | - | - | H87 | - | - | - | - | 10.00 |
| H42 | - | - | - | - | 10.00 | H88 | 1.96 | - | - | - | - |
| H43 | - | - | 7.69 | - | - | H89 | 1.96 | - | - | - | - |
| H44 | - | - | - | 6.25 | - | H90 | 1.96 | - | - | - | - |
| H45 | - | - | - | - | 10.00 | H92 | 1.96 | - | - | - | - |
| H48 | 1.96 | - | - | - | - | H93 | - | 2.50 | - | - | - |
| H50 | 1.96 | - | - | - | - | H94 | - | - | 7.69 | - | - |
| H51 | - | - | - | - | 10.00 | H96 | - | - | 38.46 | - | 10.00 |
| H53 | 1.96 | - | - | - | - | H97 | - | - | 7.69 | - | - |
| H54 | 1.96 | - | - | - | - | | | | | | |

5.4 Originalidade das linhagens descritas

As linhagens encontradas foram submetidas ao BLAST no GenBank e o resultado revelou que 4 linhagens (4% do total, encontrada em 21 indivíduos) apresentaram 100% de similaridade com alguma sequência que foi previamente depositada nesse banco de dados. Um dado interessante encontrado foi que 17 linhagens (18% do total, encontradas em 122 indivíduos) apresentaram 97% de similaridade com uma única linhagem, a PAPOL06 (LACORTE et al, 2013), a qual foi encontrada em um indivíduo da espécie *Pachyramphus polychopterus* (Caneleiro-preto) coletado no cerrado, na região central de Minas Gerais durante a estação chuvosa. O restante das linhagens (78%) que não se alinharam com nenhuma outra do Genbank, logo, 78% das linhagens (N= 93) ao nosso conhecimento, parecem não terem sido reportadas anteriormente (Figura 29).

Figura 29. Gráfico das porcentagens de similaridade das sequências apresentadas nesse trabalho em relação às linhagens depositadas no GenBank. As porções destacadas em verde e azul no gráfico correspondem às linhagens inéditas relatadas nesse trabalho. A fatia verde destaca uma parte das linhagens que tem 97% de similaridade com a linhagem já descrita PAPOL06 (LACORTE et al, 2013).



Fonte: Elaborada pelo autor.

As linhagens encontradas nesse trabalho foram alinhadas com todas as linhagens de boa qualidade (n = 700) disponíveis na MalAvi (BENSCH; HELLGREN, PÉREZ-TRIS, 2009). Com exceção do Haplótipo 96, detectado na área nativa na Nigéria e África do Sul, nenhuma das linhagens foi idêntica às depositadas nesse banco de dados.

6. DISCUSSÃO

6.1 Discussão dos dados africanos

6.1.1 Identificação por análise filogenética dos gêneros de hemoparasitas encontradas no continente africano

O diagnóstico molecular da infecção pelos hemoparasitas a partir da sequência determinada de um gene requer uma análise filogenética para que o parasita seja identificado, pelo menos ao nível de gênero. Árvores filogenéticas são construídas e cada haplótipo é reconhecido como uma linhagem dentro de um clado que caracteriza um determinado gênero. Na construção dessas árvores são utilizadas sequências de parasitas já identificados que ajudam a referenciar a análise.

A árvore da Figura 18 mostra relações bem resolvidas entre os gêneros de hemoparasitas. O clado 1, apesar do baixo valor do nó (51), inseriu-se dentro do grupo do gênero *Plasmodium* e se agregou ao grupo das espécies *P. circumflexum* e *P. relictum*, ambas distribuídas em todos os continentes do mundo. O clado 2 (com o maior número de linhagens) se posicionou como pertencente ao grupo do gênero *Plasmodium* e ficou mais próximo das linhagens LAMPUR03 encontrada na África (BEADELL et al, 2009), DENPET03 encontrada na América do Norte (RICKLEFS; FALLON, 2002) Guiana e no Uruguai (DURRANT et al, 2006) e PAPOL06 encontrada no estado de Minas Gerais no Brasil (LACORTE et al, 2013). O clado 4 ficou próximo à espécie *P. elongatum*.

O clado 3 ficou basal ao agrupamento do gênero *Haemoproteus* e essa topologia sugere que as amostras analisadas pertencem a um grupo de

Parahaemoproteus, diferente de todas as linhagens publicadas até agora. A análise do Blast mostrou que essas linhagens tem maior similaridade com o gênero *Plasmodium*, mas ao mesmo tempo estão agrupadas com a linhagem MYCAMH1, descrita no hospedeiro *Mycteria americana* e tendo identificação morfológica para o gênero (VILLAR et al, 2013). Considerando esse conjunto de resultados pode-se afirmar que o clado da espécie putativa número 3 é composto pelo gênero *Haemoproteus* (Figura 18), confirmando a infecção em *B. ibis* por esse gênero.

6.1.2 Prevalência e Diversidade dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*)

Um conjunto de trabalhos tem reportado a ocorrência de gradientes latitudinais de prevalência e de riqueza de parasitas sanguíneos, sendo que, a maioria deles aponta para uma relação inversa entre prevalência/riqueza de hemoparasitas e latitude das regiões onde foram amostrados (CUMMING, 2000; GASTON, 2000. NUNN et al, 2005; DURRANT et al, 2006; MERINO et al, 2008). A revisão de Gaston (2000) sobre padrões globais de biodiversidade propõe que a riqueza média de espécies dentro de uma determinada área amostrada tende a crescer conforme se diminui a latitude, um padrão encontrado para um grande espectro de grupos taxonômicos (protistas, árvores, insetos, aves, primatas...). Segundo esse autor, o declínio na riqueza ocorre com o aumento da latitude e pode ser mais evidente no hemisfério Norte do que no Sul, podendo os picos de riqueza não coincidir necessariamente com a linha do Equador (GASTON, 2000). Além disso, esse padrão de riqueza das espécies pode ser interrompido devido à influência de outros fatores – por exemplo, topografia, elevação, aridez, entre outros. Portanto, a latitude por si só pode não ser determinante da riqueza de espécies, mas seria somente uma medida correlacionada a numerosos fatores ambientais (GASTON, 2000).

Padrões esperados de maior riqueza e prevalência de protozoários parasitas nas latitudes menores do globo são supostos considerando-se dois aspectos: nas regiões tropicais é maior abundância e diversidade de hospedeiros e de artrópodes hematófagos, além das condições climáticas que favorecem o comportamento dos

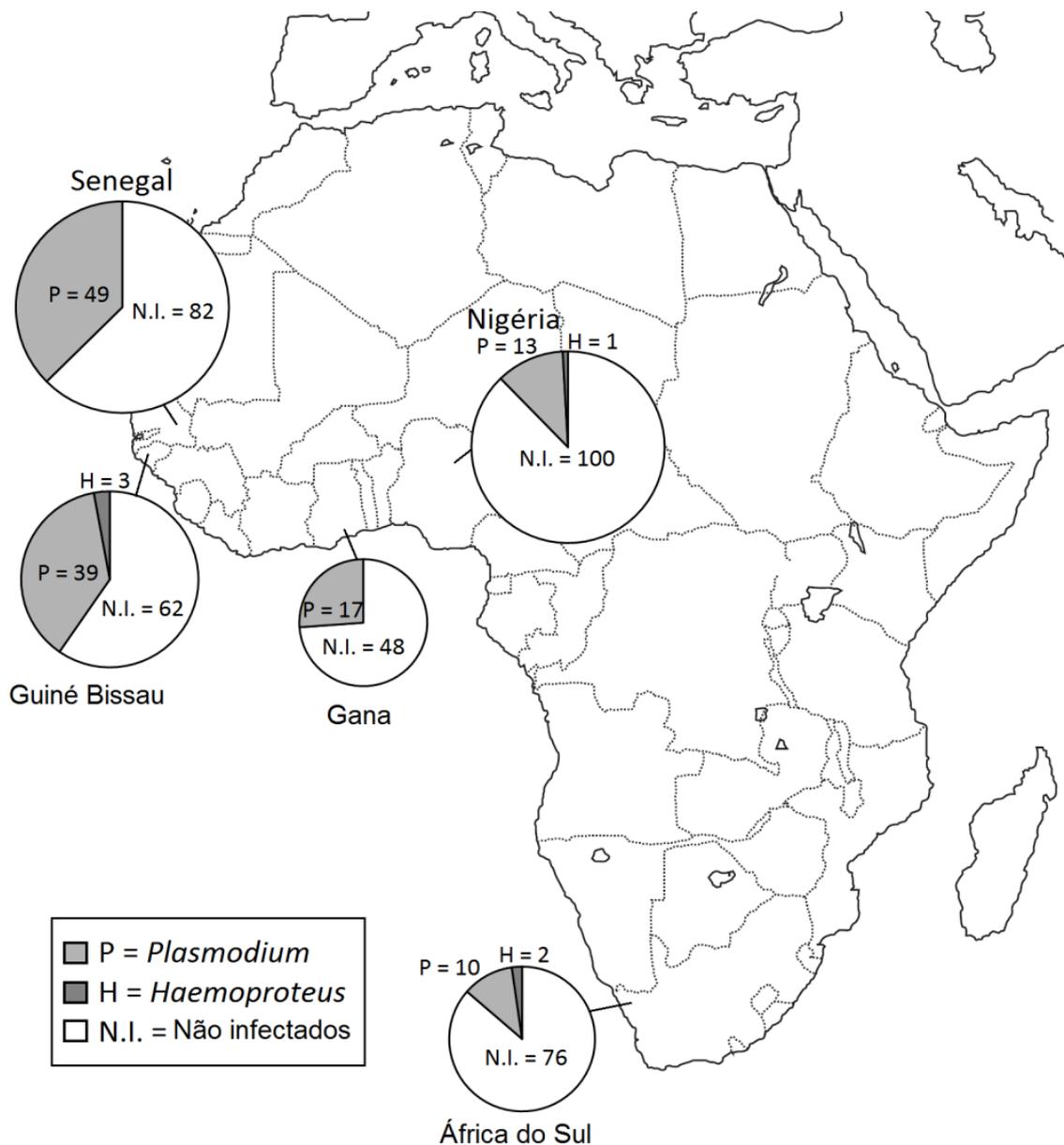
vetores e o desenvolvimento dos protozoários nessas regiões (NUNN et al, 2005; MERINO et al, 2008).

Esse estudo não foi delineado com o objetivo de se comparar níveis de prevalência e diversidade em diferentes latitudes, mas o modelo foi testado considerando-se que as amostras de sangue de garça vaqueira coletadas foram provenientes de localidades posicionadas em diferentes latitudes, desde a região acima do Equador (N14°43.653') no Senegal até a África do Sul (S34°03.759') (Tabela 2). A hipótese testada previa que a riqueza e a prevalência dos hemoparasitas tende a crescer conforme se diminui a latitude. A análise feita a seguir considerou as prevalências de *Plasmodium* e as diversidades das linhagens de *Plasmodium* e de *Haemoproteus*.

6.1.2.1 Prevalência dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*)

Com relação às prevalências, os maiores valores foram encontrados nos países com latitudes N14°43.653' e N11°15.827', ao norte do Equador, na região noroeste da África (Senegal e Guiné Bissau) (Figura 30). As diferenças entre as prevalências de Senegal e Guiné Bissau não foram estatisticamente significantes entre si, resultado que pode ser explicado pela proximidade entre os dois países (distância média de 300 km entre colônias). Quando se comparou as prevalências entre Senegal e Guiné Bissau com as da África do Sul, entretanto, as diferenças foram estatisticamente diferentes. Senegal e Guiné Bissau também se mostraram diferentes da Nigéria. Nenhuma diferença foi detectada entre as prevalências de Senegal e Guiné Bissau, em comparação com a de Gana.

Figura 30. Mapa da do continente africano com os locais de coleta e as prevalências encontradas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Segundo a hipótese testada, seria esperado que Gana e Nigéria apresentassem uma maior prevalência do que as encontradas para os outros países. No entanto, foram Senegal e Guiné Bissau (posicionados em latitudes maiores e no hemisfério norte) as localidades que apresentaram maiores prevalências em comparação com encontrada na Nigéria e, níveis comparáveis com os de Gana. Esse padrão pode ser diferente se cada linhagem for examinada separadamente. Como a abundância dos vetores é alta nas regiões próximas ao Equador, a proximidade de Senegal e Guiné

Bissau com o Equador pode explicar a falta de um gradiente latitudinal para alguns gêneros de parasita (MERINO et al, 2008) e uma não coincidência dos picos de riqueza com a linha do Equador (GASTON, 2000).

Mas como explicar que Nigéria apresentou menores índices de prevalência? A Nigéria é um dos países mais populosos da África (139 habitantes por km²) e a sua maior ocupação humana pode ter levado a destruição de habitats naturais e ao declínio da população de vetores. Essa hipótese foi levantada para explicar o declínio de vetores na Europa central (BENNETT et al, 1982; MERILÄ; BJÖRKLUND; BENNETT, 1995; MERINO et al, 2008) e pode explicar os achados porque apenas esse país diferiu de Senegal e Guiné Bissau, enquanto que Gana apresenta níveis não diferentes estatisticamente. Segunda essa hipótese, a garça vaqueira adaptou-se bem em ambientes modificados pelo homem e está presente em áreas degradadas e mais preservadas, porém suas chances de ser infectada pelos hemosporídeos seriam maiores em áreas mais preservadas onde os vetores estariam mais presentes em maior proporção. Essa suposição pode ser criticada porque alguns autores tem defendido que modificações antrópicas causam o aumento dos vetores. Um exemplo desse tipo de suposição explica porque em países tropicais o aumento da incidência de doenças transmitida por vetores dípteros aumenta com a degradação dos ambientes naturais, sendo exemplo desse padrão o espalhamento da doença da dengue (HAYES et al, 1996). No entanto, os vetores que são importantes para a dispersão nas aves desses hemoparasitas não foram suficientemente estudados para dar suporte a uma ou outra hipótese.

Outro fator que pode explicar a diferença encontrada da prevalência na Nigéria em relação aos outros países se deve às condições climáticas. O clima é semelhante entre os países do Senegal, Guiné Bissau e Gana (maiores prevalências), mas é diferente do clima das localidades amostradas na Nigéria (menor prevalência). Esses quatro países apresentam clima de savana equatorial com inverno úmido (KOTTEK et al, 2006). A região amostrada da Nigéria, entretanto, está localizada no interior do país, distante da costa e posicionada à 1000 m de altitude, fatores esses que podem ter influenciado as prevalências encontradas. As condições climáticas das colônias dos outros três países são diferentes e podem ser influenciadas pela proximidade do mar o

que resultou em condições mais favoráveis ao desenvolvimento dos vetores e parasitas, resultando numa maior prevalência.

As diferenças das prevalências em relação à reportada para a África do Sul estão concordantes com a hipótese de que em maiores latitudes é menor a prevalência e nesse caso o clima temperado deve ter sido o fator mais importante. Os invernos nessa região são muito mais rigorosos do que nas outras regiões amostradas. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por Cumming et al (2012) que estudaram o repertório de hemosporídeos em quatro gêneros de patos da família Anatidae, residentes em cinco diferentes localidades do sul da África. Esses autores encontraram uma menor prevalência do gênero *Plasmodium* no extremo sul do continente, na África do Sul (latitude aproximada S 34°01') e maior prevalência no ponto de coleta mais ao norte, no Zimbabwe (latitude aproximada S 17°56').

As baixas temperaturas que ocorrem na África do Sul podem limitar o desenvolvimento esporogônico do parasita no vetor. LA POINTE; GOFF; ATKINSON (2010) descobriram que o desenvolvimento de *P. relictum* no vetor natural *Culex quinquefasciatus* era completado em temperaturas entre 30 e 17°C. Esses autores estimam uma temperatura limitante mínima de 12,97 °C como requerimento térmico para que o desenvolvimento seja completado. Wojczulanis-Jakubas et al (2012) não encontraram parasitas sanguíneos na espécie *Alle alle*, cuja distribuição está restrita a regiões polares. Os autores sugeriram que a limitação térmica promoveria a não ocorrência do processo de esporogonia nos parasitas, um fator que resultaria na não ocorrência de parasitas nas espécies de hospedeiros nativos.

Os primers HaemF e HaemR₂, descritos a para detecção de *Plasmodium* e *Haemoproteus*, nas condições utilizadas nesse estudo permitiram a detecção de algumas das linhagens de *Leucocytozoon* nas populações estudadas de garça vaqueira. A infecção foi parcialmente confirmada com o uso dos primers HaemFL e HaemRL₂, específicos para o gênero (HELLGREN; WALDENSTROM; BENSCH. 2004). Como a análise não foi específica para detecção desse gênero e grande parte dos indivíduos infectados podem não ter sido detectados por esse protocolo, o resultado não foi reportado como prevalência nas populações onde o gênero foi detectado. Seis dos sete indivíduos infectados estavam na Nigéria cujas localidades amostradas apresentaram em média de 1000 metros de altitude. Alguns estudos defendem que a

prevalência do gênero *Leucocytozoon* é diretamente proporcional à altitude do local (MERINO et al, 2008, PÉREZ-RODRIGUES et al, 2013).

6.1.2.2 Diversidade dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*)

As maiores diversidades do gênero *Plasmodium* foram observadas na Nigéria e em Gana, um achado que está de acordo com o previsto pelo gradiente latitudinal de riqueza das espécies, conforme o modelo proposto por Gaston (2000).

A distribuição de parasitas sanguíneos ao longo do gradiente latitudinal ocorre provavelmente em função de um conjunto de condições bióticas e abióticas, as quais, por sua vez, influenciam a disponibilidade de vetores apropriados (GASTON, 2000; MERINO et al, 2008, LACORTE et al, 2013).

Nigéria e Gana são países de clima equatorial (KOTTEK et al, 2006), com uma temperatura média anual 26,0°C. A alta temperatura e a constância do clima ao longo do ano são condições propícias para o desenvolvimento de vetores, dos parasitas e de várias espécies de aves hospedeiras, fatores esses que podem contribuir para a explicação da maior riqueza de *Plasmodium* spp. nesses lugares. Assim, a Nigéria e Gana, mesmo não apresentando as maiores prevalências, foram as mais diversas em termos de linhagens de *Plasmodium*.

Como citado no subitem 5.1.3, as prevalências do gênero *Haemoproteus* são muito baixas e não permitiram inferências sobre os níveis de diversidade nos países onde foram encontrados.

Dois haplótipos de *Leucocytozoon* foram encontrados, usando-se o protocolo não padronizado para detecção desse gênero, mas essa avaliação não reflete a diversidade completa desse parasita nessa região.

A maioria dos haplótipos de *Plasmodium* e *Haemoproteus* encontrados na África não foram reportados previamente no banco de dados do GenBank. A exceção foram três haplótipos (HAP 8, 20 e 96) que apresentaram 100% de similaridade com linhagens depositadas nessa base.

O haplótipo 8 (encontrado em Guiné Bissau, Senegal e Nigéria) corresponde a uma linhagem do gênero *Plasmodium* que foi previamente encontrada em um vetor

(*Aedes esoensis*) e cuja distribuição se refere à região subártica do Japão (EJIRI et al, 2011). Os autores propõem que os mosquitos que apresentaram tal linhagem foram contaminados pela ingestão de sangue de aves infectadas que habitavam a área de estudo. A consulta no GenBank revelou que esse é o único registro de ocorrência dessa linhagem na literatura. Como já foram descritas rotas de migração de aves a partir das ilhas do Japão para a porção continental da Ásia (NEWMAN et al, 2009) e dessa região da Ásia para a África (BERND; PAILLAT; MEYBURGL, 2003), podemos supor que aves migratórias levaram o parasita entre essas regiões. Para confirmar essa hipótese só com a amostragem de populações nos pontos intermediários entre África e Japão e verificação da ocorrência desse haplótipo nas aves dessas áreas (RICKLEFS et al, 2005).

O haplótipo 20 corresponde a uma linhagem do gênero *Plasmodium* e foi encontrada previamente na espécie *Milvus migrans* (família Accipitridae) (linhagem P-MILANS05), uma ave de rapina, encontrada em todo o território do “Velho Mundo” que se reproduz em colônias e que possui hábitos gregários também fora do período de reprodução. Na Europa, *M. migrans* é conhecida como uma ave migratória de longas distâncias e grande parte da sua população migra para a África tropical para passar o período do inverno (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al, 2013). Os autores desse trabalho discutem que a migração e a invernada na África aumentam a exposição de *M. migrans* aos parasitas. O compartilhamento de uma linhagem de *Plasmodium* entre *M. migrans* e *B. ibis*, residente no continente africano, corrobora essa hipótese. Essa informação também indica que o haplótipo 20 corresponde provavelmente a uma linhagem generalista e poderá ser encontrado em outros gêneros de aves.

O haplótipo 96 (pertencente ao gênero *Leucocytozoon*) também foi descrito em *Milvus milvus* (L-CIAE02), uma espécie restrita ao oeste da região Paleártica. Em contraste com a espécie *M. migrans*, *M. milvus* é uma espécie residente e migra somente distâncias curtas, sendo que a maioria da população passa a temporada de invernada no sudoeste da Europa (Espanha). Essa espécie apresenta comportamento social somente durante sua temporada reprodutiva (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al, 2013). Os autores atentam para o fato de que as maiores prevalências detectadas do gênero *Leucocytozoon* foram reportadas para indivíduos juvenis do gênero *Milvus*, uma evidência (entre outras) de que a transmissão acontece na Europa, antes das aves começarem a migrar. O achado de uma linhagem do gênero *Leucocytozoon*

compartilhada entre ninhegos de *B. ibis* da Nigéria e da África do Sul, e juvenis residentes da Europa de *M. milvus*, sugere conexão entre essas populações. Uma possível migração de *B. ibis* para as regiões mediterrâneas poderia explicar o transporte de hemoparasitas consigo e a infecção da fauna nativa (TELFAIR, 1983), pois a garça vaqueira nidifica na Europa e é possível que parte da população do norte da África migre para essa região (GONZÁLES-MARTÍN; RUIZ, 1996). Essa linhagem (L-CIAE02) foi frequente nas amostras do estudo de Pérez-Rodrigues et al (2013) quanto em outras espécies de aves de rapina europeias, informação essa que sugere que o haplótipo 96 corresponde à uma linhagem generalista e que poderá ser encontrada em outros gêneros de aves. Esse dado nos leva a supor alternativamente que outras espécies de ave migratória podem estar migrando da Europa para a África e transportando as linhagens parasitas de um continente para o outro, conectando as duas populações (ao invés de *B. ibis* estar migrando para o norte). Algumas espécies de passeriformes europeus que migram longas distâncias para passarem a temporada de invernada na África (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al, 2013) poderiam viabilizar essa transmissão. Os achados de nosso estudo corroboram a hipótese de Pérez-Rodríguez et al (2013) de que a migração intercontinental é um fator importante para se explicar o repertório de parasitas de um hospedeiro numa determinada região.

6.1.3 Distribuição geográfica de linhagens

No clado 1 (Figura 15) estão agrupados haplótipos distribuídos na região de Guiné Bissau, Senegal, Nigéria e um haplótipo (AF257) encontrado em Gana. No clado 2 (Figura 16) estão agrupadas linhagens presentes em todas as regiões amostradas da África e, esse grupo, inclui o haplótipo mais prevalente do estudo (o haplótipo 22, Tabela 10). As redes em formato de “estrela” do clado 1, do clado 2 e do clado 3 sugerem uma rápida expansão populacional das linhagens de parasitas.

Apesar do histórico recente de expansão do hospedeiro (*B. ibis*) no continente africano (JOY et al, 2003), não se pode supor que o aparecimento de todas as mutações dos hemoparasitas (posicionadas nos terminais dessas redes) ocorreram

nesse período da expansão da distribuição da espécie na África porque o período é muito curto e as mutações são eventos raros.

A grande diversidade de linhagens dos hemoparasitas e uma distribuição geográfica ampla estão concordantes com características do hospedeiro (*B. ibis*) que é uma espécie com alta capacidade dispersora (TELFAIR, 1983). A migração de aves tem sido considerada como um fator que contribui para disseminar doenças causadas por protozoários, pois as aves podem funcionar como transportadoras de linhagens de parasitas, enquanto viajam entre seus locais de invernada e os locais onde se reproduzem (BORG⁵, 1992 *In* apud MERINO et al, 2008; WALDENSTRÖM et al, 2002; DURRANT et al, 2006; RICKLEFS et al, 2005). Quanto maior a distância pela qual a espécie de ave migra, maior será a chance de ser infectada por uma grande diversidade de linhagens (WALDENSTRÖM et al, 2002). A agregação de indivíduos em colônias é outro fator que pode facilitar a transmissão de parasitas sanguíneos em zonas tropicais, pois nessas regiões as taxas de umidades são altas, aumentando a densidade do gênero *Culex* ou de outros mosquitos vetores do gênero, facilitando assim a transmissão de parasitas como o *Plasmodium* spp. (DURRANT et al, 2006).

Outro fator que pode ter contribuído para essa ampla distribuição é o fato que muitas dessas linhagens dos hemoparasitas são generalistas e podem ter sido transportadas por outras aves, ou ainda que as duas hipóteses ocorram concomitantemente. Apesar dos estudos moleculares de protozoários parasitas aviários mostrarem que algumas linhagens são capazes de infectar aves de diferentes famílias (BENSCH et al, 2000), nem todas as interações ave-parasita detectadas são estáveis ao longo do tempo. O fato de um parasita ter sido encontrado em um hospedeiro pode não refletir, entretanto, o resultado de um tempo de co-evolução entre eles, mas pode ser mais indicativo dos hábitos alimentares dos vetores invertebrados (MERINO et al, 2008). As espécies migratórias, portanto, podem romper os padrões trabalhados pela coadaptação, espalhando ao longo de seu trajeto de migração linhagens que estão aptas a infectar outros hospedeiros. A especificidade do hemoparasita por uma determinada família e o espalhamento de uma linhagem de

⁵ Borg, K. Blood parasites and their mode of spread among birds. *Ornis Svec.* 2, 45–54.. 1992.

parasitas carregada por espécies migratórias pode depender, em última instância, da disponibilidade de vetores apropriados. A presença desses insetos (determinada pelos gradientes climáticos latitudinais) parece ser o fator mais importante na definição dos gradientes latitudinais de riqueza e prevalência observados para esses parasitas (MERINO et al, 2008).

Segundo esse raciocínio, as linhagens mais prováveis de serem parasitas específicos para *B. ibis* seriam os haplótipos reportados somente para essa espécie, mas como espécies de outras aves que vivem nas mesmas áreas não foram amostradas, não foi possível inferir quais parasitas são espécie-específicos. A verificação de que alguns haplótipos infectam outras espécies de aves (HAP 8, 20 e 96), por outro lado, indica que essas linhagens são generalistas.

6.2 Discussão dos dados brasileiros em comparação com os dados africanos

6.2.1 Identificação dos gêneros dos hemoparasitas encontradas no Brasil

A topologia da árvore da Figura 18 que incluiu as linhagens brasileiras e africanas foi semelhante à da árvore gerada pelos mesmos métodos para os dados africanos (Figura 11). O clado 2, o mais numeroso, apresentou linhagens provenientes de todas as áreas coletadas, menos do Pará. O indivíduo RS82 (haplótipo 95) também agrupou no clado 2, mas em posição mais basal em relação à grande parte dos haplótipos que formam esse grupo. No clado 1, quando comparado ao da árvore da Figura 11, percebe-se que foram adicionados haplótipos do Pará e Rio Grande do Norte. Um novo clado (número 5), basal ao clado 1, surgiu nessa árvore e é formado por um indivíduo do Rio Grande do Sul. O clado de número 3 ficou com um valor de suporte maior do que o da árvore da Figura 11, evidenciando com mais peso a identificação desse grupo como pertencente ao gênero *Haemoproteus*.

Se as linhagens encontradas na garça vaqueira no Brasil tiveram origem nas populações dessa garça na África, o esperado seria que elas se agrupassem em clados com as linhagens africanas já determinadas nas análises filogenéticas. A maioria das sequências brasileiras se comportou justamente dessa maneira. O clado 1 da Figura

11, formado por 10 haplótipos passou a ser composto por 14 haplótipos, depois da adição dos dados brasileiros; o clado 2 da Figura 11, formado por 62 haplótipos, passou a ter 81 haplótipos.

6.2.2 Prevalência e diversidade dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) nas amostras brasileiras e algumas comparações com os dados africanos

6.2.2.1 Prevalência dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) e algumas comparações com os dados africanos

Nos dados levantados nas populações brasileiras de garças vaqueiras, as maiores prevalências do gênero *Plasmodium* foram encontradas em São Paulo (51%) e no Rio Grande do Sul (46%) (Tabela 5). As menores prevalências foram encontradas no Rio Grande do Norte (5%) e no Pará (13%) (Tabela 5). Esses resultados contrariam o esperado segundo o modelo de gradiente latitudinal de prevalência (CUMMING, 2000; GASTON, 2000. NUNN et al, 2005; DURRANT et al, 2006; MERINO et al, 2008).

Dados concordantes com o gradiente latitudinal foram encontrados por Durrant et al (2006) que reportaram uma diferença significativa entre as prevalências de hemosporídeos em aves nativas da Guiana (posicionada ao norte da América do Sul: 07°22'N e 60°29'O) e do Uruguai (mais ao sudeste da América do Sul: 34°39'S e 54°07'O), sendo maior a prevalência das espécies e gêneros comuns na Guiana do que no Uruguai.

Dados discordantes da hipótese do gradiente latitudinal foram reportados por Ricklefs et al (2005) que descrevem uma menor incidência desses parasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) em áreas tropicais do que em áreas temperadas na América do Norte. Nessa região, o autor discute que um gradiente de prevalência aparentemente não existe, sendo a distribuição homogênea e dominante (MERINO et al, 2008). Nossos dados estão concordantes com o reportado por Ricklefs et al (2005), com uma maior prevalência nas regiões temperadas do que nas tropicais.

O gráfico da Figura 22 mostra que se a prevalência do gênero *Plasmodium* é maior nas latitudes menores da África (de 14°40' até 05°06' ao norte), no Brasil ocorre

o inverso com prevalências do gênero maiores nas latitudes maiores (de 22°30' até 30°01' ao sul). Seria esperado que no estado do Pará, na região norte do Brasil, onde foi feito o primeiro registro histórico da espécie no país, apresentasse a maior prevalência de hemoparasitas se todos os parasitas que vieram com o hospedeiro fossem mantidos no sítio mais remoto, onde a espécie se estabeleceu (SICK, 1997, CROSBY, 1972; WETMORE, 1963). No entanto, diversos outros fatores podem ter influenciado essa menor prevalência no norte-nordeste do que sul e sudeste do país.

Para explicar a baixa prevalências no Pará, Rio Grande do Norte e Fernando de Noronha pode-se supor que a invasão de *B. ibis* no continente americano foi relativamente recente e que houve uma “liberação de parasitas” na entrada dessa espécie no Brasil. As prevalências de Guiné Bissau e Senegal são estatisticamente maiores do que as prevalências do Pará, Rio Grande do Norte e Fernando de Noronha (todos $p < 0.005$). Esse achado, portanto, é esperado, mas cabe ainda explicar porque as populações de garças vaqueiras do sul e sudeste do Brasil foram mais infectadas por *Plasmodium*. Podemos apenas especular que nessas regiões devem existir fatores que estão favorecendo a infecção de um maior número de aves e favorecendo a ação dos vetores.

6.2.2.3 Diversidade dos hemoparasitas (*Plasmodium* e *Haemoproteus*) e algumas comparações com os dados africanos

No Brasil, a maior riqueza para o gênero *Plasmodium* foi encontrada no Rio Grande do Norte (4 haplótipos em 4 indivíduos), apesar desse ser um dos locais com a menor prevalência (Figura 19). A riqueza das linhagens do gênero decresce conforme a latitude aumenta, mas aumenta novamente na colônia do Rio Grande do Sul (8 haplótipos em 19 indivíduos). Esse padrão está concordante com os registros históricos: o Rio Grande do Norte está próximo ao Pará, local do registro da primeira colônia reprodutiva no país (SICK, 1965) e diversos registros de ocorrência no estado brasileiro do R. Grande do Sul foram feitos logo a seguir (BELTON, 1974).

Comparando-se os índices de riquezas do Brasil com as da África, temos que apenas São Paulo é estatisticamente diferente ($p < 0,05$) de quatro países africanos

(Guiné Bissau, Senegal, Nigéria e Gana). O restante das comparações não apresentou diferenciação estatística entre os índices de diversidade.

6.2.3 Distribuição geográfica das linhagens

Definiu-se como “linhagens brasileiras” de parasitas aquelas encontradas apenas nas populações brasileiras de garças. Se o padrão de gradiente de diversidade estivesse estabelecido nessas, o esperado seria encontrar um maior número de linhagens “brasileiras” na região equatorial do que no sul do país. Contudo, não foi esse o padrão observado: dos 20 haplótipos encontrados exclusivamente no Brasil, dez estão da região Norte/Nordeste do país (cinco estão localizados em Fernando de Noronha, três no Pará e dois no Rio Grande do Norte) e nove estão localizados na região Sul/Sudeste (seis no Rio Grande do Sul e três em São Paulo) (Tabela 8). Um desses haplótipos está presente em Fernando de Noronha e em São Paulo ao mesmo tempo.

O haplótipo 8 (citado no item 6.1.2.2), encontrado no Pará e em três países da África nesse estudo (item 5.1.3), foi previamente encontrado em *Aedes esoensis* na região subártica do Japão (EJIRI *et al*, 2011). Esse haplótipo é frequente na África e também no Brasil, e é possível que garça vaqueira tenha transportado essa linhagem a partir da área nativa, confirmando a origem africana da população brasileira estudada (Figura 24 e Tabela 10 do apêndice).

O haplótipo 19, presente no Rio Grande do Sul, foi descrito previamente na espécie *Phaeomyias murina* (família Tyrannidae), coletada na região sudeste do Brasil (LACORTE *et al*, 2013). Essa ave está amplamente distribuída pela América do Sul (LASCAS *et al*, 2012; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012).

Haplótipos de hemospórideos são frequentemente compartilhados entre regiões geográficas e, podem ter sido espalhados por aves migratórias enquanto elas viajam de seus locais de invernada para os sítios de reprodução (WALDENTRÖM *et al*, 2002; RICKLEFS *et al*, 2005; DURRANT *et al*, 2006). Aves encontradas em duas regiões geográficas e ecológicas separadas podem compartilhar linhagens de hemospórideos,

caso as condições para transmissão sejam similares em cada região (DURRANT et al, 2006).

Das 97 linhagens obtidas 17 delas (seja da África ou Brasil) apresentaram 97% de similaridade com uma única linhagem, a PAPOL06 (LACORTE et al, 2013) (GenBank access number JX029888.1) (Figura 29). Essa linhagem foi descrita em um indivíduo da espécie *Pachyramphus polychopterus* (Caneleiro-preto) coletado no cerrado, na região central de Minas Gerais durante a estação chuvosa. Como a ocorrência dessa linhagem foi detectada em muitos indivíduos tanto da África como do Brasil, é provável que ela esteja amplamente distribuída nos continentes.

Os hemosporídeos aviários podem ser classificados com base nos taxa dos hospedeiros infectados. Algumas espécies desses parasitas mostram ser hospedeiro-específica, de modo que pode se prever que quando espécies de hospedeiros ocorrem em duas regiões geográficas e ecológicas separadas, elas podem compartilhar parasitas filogeneticamente similares (DURRANT et al, 2006). No caso dos achados para *B. ibis* desse trabalho, a linhagem referente ao haplótipo 22 (representada pelo indivíduo FN073 na Figura 25) está amplamente distribuída ao longo das duas grandes regiões amostradas, mas não foi descrita em nenhum outro trabalho até agora. Esse achado sugere que essa linhagem apresente certa especificidade pela garça-vaqueira como hospedeira, mas esse fato só poderá ser confirmado após estudo das linhagens presentes nas aves de outras espécies, nas duas regiões estudadas.

6.3 Teste da Hipótese da Liberação do Inimigo

A análise de teste G par a par revelou que não há diferença estatística entre as prevalências nas populações de garças vaqueiras africanas e brasileiras (totais), tanto para o gênero *Plasmodium* quanto para o *Haemoproteus* ($p > 0,05$). Em relação às diversidades apresentadas nessas duas grandes áreas, entretanto, observou-se que a riqueza das linhagens do gênero *Plasmodium* apresentada na África ($N = 74$) foi estatisticamente maior do que a encontrada no Brasil ($N = 24$) ($p < 0,05$). Esse achado está de acordo com o previsto pela Hipótese da Liberação do Inimigo. Considerando-se as três predições de ERH (citadas no item 1.4), entretanto, verifica-se que a previsão

número 2 (item 1.4) parece não ter se confirmada porque os haplótipos encontrados em espécies nativas foram encontrados também na garça vaqueira introduzida (Tabela 7). A previsão número 1 não pode ser verificada porque não houve identificação de linhagens espécie-específicas na área colonizada e a previsão do item 3 não pode ser verificada porque não foram amostradas competidores nativos.

A redução no número de linhagens de parasitas observada nas populações introduzidas de garças vaqueiras seria explicada pela menor probabilidade de introdução de parasitas junto com a espécie exótica. As populações introduzidas por serem derivadas de uma amostra menor da população nativa grande, passariam por um “gargalo” que reduziria a probabilidade de introdução de todas linhagens parasitas presentes na espécie hospedeira na sua área nativa. Outra limitação para o estabelecimento de todos os parasitas introduzidos é a não adaptação de parte das linhagens trazidas para a área não nativa. Muitos dos parasitas têm um ciclo de vida complexo que requer mais de um hospedeiro; quando os organismos intermediários necessários para que o ciclo de vida seja completado não estão presentes no novo ambiente, o parasita não completa seu ciclo e não infecta os organismos invasores (BLACKBURN; LOCKWOOD; CASSEY, 2009; TORCHIN et al, 2003). Torchin et al (2003) ainda mencionam outros fatores como a ausência de hospedeiros em potencial na nova localidade e as limitações hospedeiro-específicas dos parasitas nativos para adaptação aos hospedeiros exóticos.

Nesse estudo Torchin et al (2003) compararam a ocorrência de parasitas em espécies exóticas no seu ambiente nativo e no ambiente onde foram introduzidas. Os autores reportam que o número de parasitas encontrado nas populações nativas de *S. vulgaris* foi duas vezes maior do que o encontrado nas populações exóticas, além dessas serem mais parasitadas em termos de prevalência. Nesse mesmo trabalho, o grupo ainda relata que, durante a transição de uma área para outra, apenas uma pequena porcentagem dos parasitas estudados acompanhou a migração do hospedeiro (cerca de 18,75%). Vinte e seis espécies foram incluídas no estudo, as quais pertencem a diversos tipos de organismos: moluscos, crustáceos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos.

Colautti et al (2004) questionam a validade da comparação de Torchin et al (2003) ao afirmar que os indivíduos liberados na América do Norte não representam

uma amostra aleatória das populações europeias de estorninho (*S. vulgaris*), uma vez que foram retiradas de poucas localidades (sendo o sudeste da Inglaterra a mais comum). Desse modo, a comparação só com essa amostra da população não daria suporte para a redução na riqueza nas espécies de parasitas durante a translocação para o novo ambiente. Além disso, alguns parasitas aviários nativos da América do Norte passaram a ter os estorninhos europeus como hospedeiros quando estes chegaram ao continente, de modo que quando esses novos parasitas são adicionados ao cálculo, o número de espécies que infectam *S. vulgaris* torna-se maior que em sua área nativa.

Lima et al (2010) relataram que as espécies de Passeriformes nativos do Brasil apresentaram uma prevalência de hemoparasitas significativamente maior do que a determinada para as populações de pardais (*Passer domesticus*), exóticos em território brasileiro. Também em concordância com a ERH, os pardais residentes na Europa apresentaram maior número de linhagens do que os amostrados no Brasil (MARZAL et al, 2010). Se a liberação dos parasitas naturais ocorreu na introdução dessa espécie, esse fato pode ter contribuído para a rápida dispersão dos pardais no Brasil e em outras áreas colonizadas.

6.4 Não identificação da fonte fundadora da população brasileira

As diversidades das linhagens do gênero *Plasmodium* apresentadas na África foram estatisticamente maiores do que as encontradas no Brasil, um achado concordante com o modelo que prevê ocorrência de um gargalo populacional do hospedeiro, com perda de riqueza de parasitas nas amostras brasileiras. O nível encontrado da diversidade de linhagens nas populações amostradas, entretanto, foi muito alto, e sua ampla distribuição dificultou a identificação de uma população fonte-fundadora africana, a qual tivesse contribuído mais para a formação da população brasileira de hemoparasitas da garça vaqueira. O haplótipo 1 do clado 3 (identificado na Figura 26 pelo indivíduo PA039), por exemplo, apresenta uma ampla distribuição, tanto na África (Guiné Bissau, Nigéria e África do Sul) quanto no Brasil (Pará, Fernando de Noronha, São Paulo, Rio Grande do Sul). Algumas evidências fracas, entretanto,

merecem ser enumeradas. O haplótipo 8 por exemplo, está presente em países africanos próximos à linha do Equador e no Brasil ocorre no Pará, estado em que o registro histórico aponta a primeira colônia reprodutiva de *B. ibis* no país (Figura 24).

7. CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, concluímos que:

- ✓ A identificação dos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* nas populações da África e do Brasil foi bem sucedida pelo método filogenético e as relações dentro dos clados de cada gênero foram clarificadas após construção da árvore.
- ✓ O uso do par de *primers* HaemF e HaemR₂ nas condições utilizadas nesse estudo permitiu o diagnóstico de dois haplótipos presentes de *Leucocytozoon* nessas populações.
- ✓ As maiores prevalências do gênero *Plasmodium* na África foram encontradas em Senegal e Guiné Bissau localizados ao norte do Equador. No Brasil as maiores prevalências do gênero foram encontradas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, posicionados em latitudes abaixo do Trópico de Capricórnio. Análise estatística não revelou diferença entre as prevalências das populações de garças vaqueiras africanas e brasileiras (totais), tanto para o gênero *Plasmodium* quanto para o *Haemoproteus*.
- ✓ As maiores diversidades do gênero *Plasmodium* na África foram observadas na Nigéria e em Gana, um padrão previsto pelo gradiente latitudinal de riqueza das espécies. No Brasil, a maior diversidade para o gênero *Plasmodium* foi encontrada no Rio Grande do Norte e o gradiente latitudinal não foi observado.
- ✓ A Hipótese da Liberação do Inimigo não foi completamente confirmada.
- ✓ O nível alto da diversidade das linhagens dos hemoparasitas e sua ampla distribuição dificultou a identificação da população fonte-fundadora africana de garças vaqueiras que colonizaram o Brasil. Há, no entanto, algumas evidências fracas que apontam para uma possível população fonte, presente em países africanos próximos e acima da linha do Equador.

8. REFERÊNCIAS

ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenecity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye, J. E. e Zuk, M. (eds) **Bird-parasite interactions**. Ecology, evolution, and behavior. Oxford University Press, New York, p. 19-48. 1991.

ATKINSON, C. T. Avian Malaria. In: C. T. Atkinson, N. J. Thomas, D. B. Hunter, eds) **Parasitic Diseases of Wild Birds**. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 2008.

ARAÚJO, H. F. P.; NISHIDA, A. K. Considerações sobre colônias de garças (Ciconiiformes, Ardeidae) no Estado da Paraíba, Brasil. **Ornithologia**, João Pessoa, 2 (1): 34-40. 2004.

AYRES, M., M. AYRES JR., D. L. AYRES, SANTOS, A. A. **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5ª ed. Belém, Pará, Brasil: MCT-CNPq Press. 2007. 364.

BARNES, R. D., FOX, R. S., RUPPERT, E. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. Tradução de Antonio Carlos Marques. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005, 1145.

BEADELL, J. S. et al. Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malária. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.273, n.1604, p.2935-2944, 2006.

BEADELL, J. S. et al. Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa. **International Journal for Parasitology**, v.39, p.257–266, 2009.

BELLA, S. D.; AZEVEDO-JR, S. M. Considerações sobre a ocorrência da garça-vaqueira, *Bubulcus ibis* (Linnaeus) (Aves, Ardeidae), em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, n.1, p.57-63, 2004.

BELTON, W. Cattle Egrets in Rio Grande do Sul, Brazil. **Bird Banding**, v.45, p. 59, 1974.

BENNETT, G. F. et al. Blood parasites of some birds from the Lorraine region, France. **Journal of Wildlife Diseases**, v.18, p.81–8, 1982.

BENSCH, S. et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. **Proc. R. Soc. Lond**, v.267, p.1583–1589, 2000.

BENSCH, S. et al. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**, v.58, p.1617–1621, 2004.

BENSCH, S. et al. Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. **Journal of Animal Ecology**, v.76, p.112–122. 2007.

BENSCH, S., HELLGREN, O., PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome *b* lineages. **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.1353-1358, 2009.

BENSON D. A. et al. GenBank: Update. **Nucleic Acids Res**, v.33, p.D34–D38, 2005.

BERND, U. M., PAILLAT, P., MEYBURG, C. Migration routes of steppe eagles between Asia and Africa: A study by means of satellite telemetry. **The Condor**, v.105, n.2, p.219-227, 2003.

BirdLife International 2012. *Phaeomyias murina*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: data de acesso. Downloaded on **01 March 2013**.

BLACKBURN, T. M.; LOCKWOOD, J. L.; CASSEY, P. **Avian Invasions, The Ecology and Evolution of Exotic Birds**. Oxford: Oxford University Press, 2009. 305 p.

BORDES, F. et al. Parasite diversity and latitudinal gradients in terrestrial mammals. In: MORAND, S.; KRASNOV, B. R. (Ed.) **The Biogeography of Host-Parasite Interactions**. Oxford: Oxford University Press, 2010. p. 89-98.

BURGER, J. Competition between Cattle Egrets and native north american herons, egrets, and ibises. **Condor**, California, v.80, p.15-23, 1978.

CLEMENT, M., POSADA, D., CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, n.10, p.1657-1660, 2000.

COLAUTTI, R. I. et al. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? **Ecology Letters**, v.7, p.721–733, 2004.

CROSBY, G. T. Spread of the cattle egret in the Western Hemisphere. **Bird-Banding**, v.43, p.205–212, 1972.

CUMMING, G. S. Using habitat models to map diversity: pan-African species richness of ticks (Acari: Ixodida). **Journal of Biogeography**, v.27, p.425-440, 2000.

CUMMING, G. S. et al. Host associations, biogeography, and phylogenetics of avian malaria in southern African waterfowl. **Parasitology**, v.12, p.1-9, 2012.

DAVIS, M. A. **Invasion Biology**. 1^a ed. Oxford: Oxford University Press, 2009. 243p.

DURRANT, K. L et al. Avian haematozoa in South America: A comparison of temperate and tropical zones. **Ornithological Monographs**, v.6, p.98-111, 2006.

EJIRI, H. et al. Blood Meal Identification and Prevalence of Avian Malaria Parasite in Mosquitoes Collected at Kushiro Wetland, A Subarctic Zone of Japan. **Journal of Medical Entomology**, v.48, n.4, p.904-908, 2011.

FELLOWS, D. P.; PATON, P. W. C. Behavioral response of cattle egrets to population control measures in Hawaii. In: Crabb, A.C. & R.E. Marsh (Eds.) **Proceedings of Vertebrate Pest Conference**. Davis: Univ. of California, 1988. p. 315-318.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other haemosporidia**. Oxford: Blackwell Scientific Publications Oxford, 1966. 1114.

GASTON, K. J. Global patterns in biodiversity. **Nature**, v.405, p.220-227, 2000.

GONZÁLEZ-MARTÍN, M., RUIZ, X. Brood parasitism in herons. **Colonial Waterbirds**, v.1, p.31-38, 1996

GREINER, E. et al. Distribution of the avian hematozoa of North America. **Canadian Journal of Zoology**, v.53, n. 12, p.1762-1787, 1975.

HAYES, C. G. et al. The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, p.459–463, 1996.

HAUSMANN, K.; HÜLSMANN, N.; RADEK, R. **Protistology**. 3^a ed. Berlim: Schweizerbartsche Verlagshuchhandlung, Stuttergt. 2003. 379.

HAYES, C. G. et al. The epidemiology of dengue virus infection among urban, jungle, and rural populations in the Amazon region of Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, p.459–463, 1996.

HELLGREN, O.; WALDENSTROM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium and Haemoproteus from avian blood. **Journal of Parasitology**, v.90, n.4, p. 797–802, 2004.

HELLGREN, O. et al. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian Haemoproteus (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v.93, n.4, p.889-896, 2007.

HUELSENBECK, J. P; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v.17, p.754–755, 2001.

JARVI, S. I., SCHULTZ; J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. **Journal of Parasitology**, v.88, n.1, p.153-158, 2002.

JOY D. A. et al. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. **Science**, v.300, p.318 – 321, 2003.

KEANE, R. M., Crawley, M. J. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. **Trends in Ecology & Evolution**, v.17, p.164-179, 2002.

KOLAR, C. S., LODGE, D. M. Progress in invasion biology: Predicting invaders. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, p.199-204, 2001.

KOTTEK, M. et al. World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Meteorologische Zeitschrift**, v.15, n.3, p.259-263, 2006.

LAPOINTE, D. A.; GOFF, M. L.; ATKINSON; C. T. Thermal constraints to the sporogonic development and altitudinal distribution of avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawai'i. **Journal of Parasitology**, v.96, n.2, p.318-324, 2010.

LACORTE, G. A. et al. Exploring the Diversity and Distribution of Neotropical Avian Malaria Parasites – A Molecular Survey from Southeast Brazil. **PLoS ONE**, v.8, n.3, p.e57770, 2013.

LAFFERTY, K. et al. The role of infectious diseases in natural communities: what introduced species tell us. (Sax, D.F.; Stachowicz, J.J.; Gaines, D.D. Eds.) **Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution, and Biogeography**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2005. pp. 111-134.

LAS-CASAS, A. et al. Community structure and Bird species composition in a caatinga of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.20, n.3, p.302-311, 2012.

Levine, N. D. **The protozoan phylum apicomplexa**. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1988. 154.

LEVIN, I. I. et al. Hippoboscid-transmitted *Haemoproteus* parasites (Haemosporida) infect Galapagos Pelecaniform birds: Evidence from molecular and morphological studies, with a description of *Haemoproteus iwa*. **International journal for parasitology**, v.41, n.10, p.1019-1027, 2011.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009

LIMA, M. R. et al. Low prevalence of haemosporidian parasites in the introduced house sparrow (*Passer domesticus*) in Brazil. **Acta Parasitologica**, v.55, n.4, p.297–303, 2010.

LIMA, M. R. et al. Diversity, loss, and gain of malaria parasites in a globally invasive bird. **PloS one**, v.6, n.7, p.e21905, 2011.

LOCKWOOD, J.; HOOPES, M.; MARCHETTI, M. **Invasion ecology**. 1^a ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2009. 577.

MARTINEZ-DE LA PUENTE, J. et al. On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges. **Journal of Molecular Ecology**, v.20, n.15, p.3275-3287, 2011.

MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.47, n.1, p.261-273, 2008.

MARZAL, A. et al. Breeding biology of five species of herons in coastal Florida. **Auk**, Lawrence: v.94, p.689-700, 1977.

MERILÄ, J.; BJÖRKLUND, M.; BENNETT, G. F. Geographic and individual variation in haematozoan infections in the green-finch, *Carduelis chloris*. **Canadian Journal of Zoology**, v.73, p.1798–804, 1995.

MERINO, S. et al. Haematozoa in forest birds Southern Chile: Latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. **Austral Ecology**, v.33, p.329-340, 2008.

MERINO, S. et al. Infection by *Haemoproteus* parasites in four species of frigatebirds and the description of a new species of *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v.98, n.2, p.388 – 397, 2012.

MITCHELL, C. E., POWER, A. G. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. **Nature**, v.421, p.625-627, 2003.

MIURA, O. et al. Introduced cryptic species of parasites exhibit different invasion pathways. **PNAS**, v.103, p.19818-19823, 2006.

NELSON, J. B. **The Sulidae – gannets and boobies**. 1ª ed. Londres: Oxford University Press, 1978. 1012.

NEWMAN, S. H. et al. Migration of Whooper Swans and Outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus in Eastern Asia. **PLoS ONE**, v.4, n.5, p.1-11, 2009.

NUNN, C. L. et al. Latitudinal gradients of parasite species richness in primates. **Divers. Distrib**, v.11, p.249-56, 2005.

OUTLAW, D. C., RICKLEFS, R. E. Rerooting the evolutionary tree of malaria parasites. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v.108, p.13183–13187, 2011.

PARAENSE, W. L. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio. **Méd. Cirúr. Farmácia**, v.108, p.1-26, 1945.

PÉREZ-TRIS, J. et al. What are malaria parasites? **Trends in parasitology**, v.21, n.5, p.209, 2005.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Molecular characterization of haemosporidian parasites from kites of the genus *Milvus* (Aves: Accipitridae). **International Journal of Parasitology**, v.43, n.5, p.381-387, 2013.

PERKINS, S. L., SCHALL, J. J. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal of Parasitology**, v.88, p.972–978. 2002.

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v.25, p.1253-1256, 2008.

RICHARDSON, D. M. et al. Plant invasions: The role of mutualisms. **Biological Reviews**, v.75, p.65-93, 2000.

RICHARDSON, D. M. et al. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. **Diversity and Distributions**, v.6, p.93-107, 2000.

RICKLEFS, R. E, FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proc. R. Soc. B**, v.269, p.885–892, 2002.

RICKLEFS, R. E et al. Migrants and their parasites: a bridge between two worlds. In: Birds of two worlds. MARRA, P.; Greenberg, R.). **The Ecology and Evolution of Migration**. Baltimore: John Hopkins University Press. 2005. 210-21.

SAMBROOK J., RUSSEL D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997. 912.

STRANGE, I. J. Distribution of cattle egrets (*Bubulcus ibis*) to the Falkland Islands. **Gerfaut**, v.69, p.397-401, 1979.

TELFAIR, R. C. II. **The Cattle Egret: A Texas Focus and World View**. 1^a ed. Texas: The Texas Agricultural Experiment Station, 1983. 144.

TELFAIR P. C., BISTER T. J. Long-term breeding success of the cattle egret in Texas. **Waterbirds**, v.27, p.69–78, 2004.

THOMPSON, C. F.; LANYOU, S. M.; THOMPSON, K. M. The influence of foraging benefits on association of cattle egrets with Cattle. **Oecologia**, Berlon: v.52, n.2, p167-170, 1982.

THOMPSON, J. D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v25, p.4876-4882, 1997.

TORCHIN, M. E. et al. Introduced species and their missing parasites. **Nature**, v.421, p.628-630, 2003.

TORCHIN, M.; MITCHELL, C. Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.2, p.183-190, 2004.

VALKIUNAS, G. **Avian malaria and other haemosporidia**. 1^a ed. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2005. 932.

VALKIUNAS, G. et al. Linkage between mitochondrial cytochrome b lineages and morfoespécies of two avian malaria parasites, with a description of *Plasmodium* (*Novyella*) *ashfordi* sp. nov. **Parasitology Research**, v.100, p.1311-1322, 2007.

VILLAR, C. M. et al. Blood Parasites in Nestlings of Wood Stork Populations from Three Regions of the American Continent. **The Journal of parasitology**, v. 99, n.3, p. 522-527, 2013.

WALDENSTRÖM, J. et al. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. **Molecular Ecology**, v.11, p.1545–1554, 2002.

WETMORE, A. An early record of the Cattle Egret in Colômbia. **Auk**, Lawrence: v.80, n.3, p.547, 1963.

WILLIAMSON, M. **Biological invasions**. 15^a ed. Londres: Chapman & Hall, 240. 1996.

WOJCZULANIS-JAKUBAS, K. et al. Blood parasite infestation and the leukocyte profiles in adult and immature reed warblers (*Acrocephalus scirpaceus*) and sedge warblers (*Acrocephalus schoenobaenus*) during autumn migration. **Annales Zoologici Fennici**, v.49, n. 5, p. 341-349, 2012.

9. Apêndice

9.1 Haplótipos encontrados

Tabela 10. Haplótipos encontrados e os hospedeiros correspondentes onde foram identificados. As cores representam os países africanos e a regiões brasileiras amostradas.

| | | | | | | | | | | |
|-------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Hap1 | AF015 | Hap22 | AF061 | Hap22 | AF459 | Hap22 | SP031 | Hap60 | AF228 | |
| | AF025 | | AF062 | | AF491 | | SP032 | | Hap61 | AF178 |
| | AF329 | | AF066 | | AF516 | | SP033 | | Hap62 | AF107 |
| | AF404 | | AF072 | | B1.1 | | SP034 | | Hap63 | AF487 |
| | AF510 | | AF074 | | B10.1 | | SP035 | | Hap64 | B75.2 |
| | FN078 | | AF075 | | B4.2 | | SP036 | | | FN104 |
| | FN080 | | AF080 | | B68.2 | Hap23 | AF251 | Hap65 | RS080 | |
| | PA022 | | AF087 | | B68.3 | Hap24 | AF356 | Hap66 | SP011 | |
| | PA039 | | AF110 | | B74.1 | Hap25 | AF181 | Hap67 | RS013 | |
| | RS018 | | AF122 | | B74.2 | Hap26 | AF493 | Hap68 | AF196 | |
| Hap2 | PA011 | B74.3 | Hap27 | B10.3 | Hap69 | AF067 | | | | |
| Hap3 | SP010 | B75.3 | | AF267 | Hap70 | AF213 | | | | |
| Hap4 | AF115 | B76.3 | Hap28 | AF258 | Hap71 | AF137 | | | | |
| Hap5 | PA004 | FN011 | Hap29 | AF083 | Hap72 | AF069 | | | | |
| Hap6 | AF108 | FN014 | Hap30 | AF145 | Hap73 | AF262a | | | | |
| Hap7 | AF257 | FN021 | Hap31 | AF156 | Hap74 | AF262b | | | | |
| Hap8 | AF027b | FN047 | Hap32 | FN075 | Hap75 | AF065 | | | | |
| | AF033 | FN073 | Hap33 | AF473 | Hap76 | AF038 | | | | |
| | AF059 | FN076 | Hap34 | AF253 | Hap77 | AF152 | | | | |
| | AF068 | FN081 | Hap35 | AF146 | Hap78 | FN084 | | | | |
| | AF086 | FN087 | Hap36 | AF283 | Hap79 | AF052 | | | | |
| | AF158 | FN094 | Hap37 | SP009 | Hap80 | AF013 | | | | |
| | AF426 | PE004 | Hap38 | AF214 | Hap81 | AF474 | | | | |
| | PA006 | PE010 | Hap39 | RS017 | Hap82 | AF275 | | | | |
| | PA010 | PE020 | Hap40 | AF270 | Hap83 | AF121 | | | | |
| | PA019 | PE022 | Hap41 | AF232 | Hap84 | AF074 | | | | |
| PA024 | RN037 | Hap42 | AF401 | Hap85 | FN100 | | | | | |
| PA031 | RS001 | Hap43 | AF472 | Hap86 | RS084 | | | | | |
| Hap9 | AF122 | RS002 | Hap44 | AF265a | Hap87 | AF368 | | | | |
| Hap10 | AF027a | RS004 | Hap45 | AF367 | Hap88 | AF167 | | | | |
| Hap11 | RN054 | RS005 | Hap46 | FN069 | Hap89 | AF243 | | | | |
| Hap12 | PA012 | RS015 | Hap47 | FN019 | Hap90 | AF127 | | | | |
| Hap13 | AF030 | RS020 | | AF465 | Hap91 | FN005 | | | | |
| Hap14 | AF081 | RS023 | Hap48 | AF218 | Hap92 | AF184 | | | | |
| Hap15 | RN005 | RS024 | Hap49 | RN004 | Hap93 | AF073 | | | | |
| Hap16 | AF111 | RS025 | | AF092 | Hap94 | AF447 | | | | |
| Hap17 | AF017 | RS074 | Hap50 | AF170 | Hap95 | RS082 | | | | |
| Hap18 | AF091 | RS075 | Hap51 | AF369 | Hap97 | AF331 | | | | |
| Hap19 | RS073 | RS079 | Hap52 | RS016 | | AF494 | | | | |
| Hap20 | AF293 | SP005 | | AF113 | | AF502 | | | | |
| | AF062 | SP007 | AF159 | AF506 | | | | | | |
| Hap21 | AF154 | SP008 | Hap53 | AF248 | | AF514 | | | | |
| Hap22 | AF004 | SP020 | Hap54 | AF248 | AF515 | | | | | |
| | AF005 | SP024 | Hap55 | AF489 | AF513 | | | | | |
| | AF007 | SP026 | Hap56 | AF169 | | | | | | |
| | AF054 | SP027 | Hap57 | AF082 | | | | | | |
| | AF058 | SP028 | Hap58 | AF151 | | | | | | |
| | | | Hap59 | AF227 | | | | | | |

| LEGENDA | |
|---------------|-------------------|
| Guiné Bissau | Rio Grande do Sul |
| Senegal | São Paulo |
| Gana | Nordeste BR |
| Nigéria | Norte BR |
| África do Sul | |

9.2 Análise morfológica

Esses dados pertencem a Francisco Carlos Ferreira Júnior do Laboratório de Malária da UFMG. Durante as coletas de sangue das aves, algumas lâminas de esfregaço sanguíneo foram confeccionadas. Essas lâminas foram examinadas e o diagnóstico morfológico foi comparado com o obtido pela metodologia molecular. Segundo a abordagem proposta, somente foram analisadas os esfregaços de indivíduos previamente diagnosticados positivamente pelo método molecular.

No geral, os indivíduos analisados apresentaram baixa parasitemia (menos de 3 formas parasíticas em cerca de 200 campos do microscópio em aumento de 1000 vezes). A convenção para identificação dos parasitas, e o posterior diagnóstico da infecção, estão exemplificados na Tabela 11.

Tabela 11. Convenção adotada para identificação morfológica de hemoparasitas.

| Forma(s) parasitária(s), e quantidade visualizada | Diagnóstico |
|--|--|
| 1 trofozoíto | <i>Plasmodium</i> putativo |
| 2 ou mais trofozoítos | <i>Plasmodium</i> confirmado |
| 1 gametócito | <i>Plasmodium</i> ou <i>Haemoproteus</i> |
| 2 ou mais gametócitos e 2 ou mais trofozoítos | <i>Plasmodium</i> confirmado |
| 2 ou mais gametócitos, ausência de trofozoítos | <i>Haemoproteus</i> confirmado |

Na amostra de Guiné Bissau foram analisadas 17 lâminas entre os 43 indivíduos infectados (N total = 104). Em seis esfregaços foram encontrados mais de um trofozoíto, confirmando a presença do gênero *Plasmodium*. Em 10 esfregaços foram encontrados somente uma forma semelhante a um trofozoíto. Esse último caso aconteceu com o indivíduo código AF025, cujo diagnóstico molecular aponta para a presença de infecção por *Haemoproteus*, mas não foi possível a confirmação pela lâmina, de forma que não foi possível afirmar se tratava-se realmente de um trofozoíto (confirmando a infecção por *Plasmodium*) ou se é um gametócito imaturo e não totalmente desenvolvido (abrindo a possibilidade do diagnóstico de infecção pelo gênero *Haemoproteus*). Em um dos esfregaços não foi observado nenhum parasita.

Na amostra de Senegal (N total = 131) foram analisados 34 esfregaços entre os 53 indivíduos infectados. Em 16 esfregaços foram encontrados mais de um trofozoíto, confirmando-se a presença do gênero *Plasmodium*; em dois desses 16 esfregaços mais uma forma do desenvolvimento do parasita foi encontrada: um deles portava um gametócito e o outro um meronte. Nos 10 esfregaços foi encontrado somente uma forma semelhante a um trofozoíto. Duas lâminas apresentaram somente um meronte e em seis esfregaços nada foi observado.

Na amostra de Gana foram analisadas 12 lâminas entre os 17 infectados (N total = 65). Em seis esfregaços foram encontrados mais de um trofozoíto, confirmando a presença do gênero *Plasmodium* e um deles ainda continha um meronte. Em três lâminas foi visualizada apenas uma forma semelhante a um trofozoíto. Apenas um meronte foi encontrado em duas lâminas e, nada foi observado em uma das lâminas analisadas.

Nove lâminas foram analisadas na amostra da África do Sul, dentre os 13 infectados (N total = 89). Em nove esfregaços encontrou-se mais de um trofozoíto e em uma delas (AF338) havia também um meronte, identificado morfológicamente como o subgênero *Plasmodium (Novyella) ashfordi* (Valkiunas *et al*, 2007). O indivíduo AF331 apresentou o que parecia ser uma infecção dupla, pois foram encontrados quatro trofozoítos e algumas formas estranhas que se assemelhavam à forma eritrocítica do gênero *Leucocytozoon*. Molecularmente, o diagnóstico dessa ave era de infecção por *Leucocytozoon*, todavia, a qualidade do esfregaço era baixa e não foi possível confirmar essa suspeita através do diagnóstico morfológico.