UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

Pesquisa de infecções por *Flavivirus* sp. em aves silvestres provenientes das áreas verdes do município de São Paulo

Lilian Dias Orico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

SÃO PAULO
2013

Pesquisa de infecções por *Flavivirus* sp. em aves silvestres provenientes das áreas verdes do município de São Paulo

Lilian Dias Orico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

SÃO PAULO
2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter dado toda a força e determinação para concluir mais esta etapa.

Agradeço a Airte e Nicolau, meus pais, por terem feito meu sonho realidade, e por toda a motivação. Amo vocês!

Ao meu noivo, Flávio, por estar comigo em todas as horas, por ter suportado meus momentos de nervosismo, e por me dar toda a tranqüilidade e apoio necessário para a conclusão desta dissertação. Minha vida, amo você!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Marrelli, por ter me dado toda a autonomia e suporte necessário.

Ao Dr. José Eduardo Levi, por todo o conhecimento passado e toda a colaboração durante esteprojeto.

À Licia Natal Fernandes, por todas as horas que reservou pra me ajudar, em todos os passos desta dissertação!

À Gabi Carvalho (Gabrisa) e à Denise (DeniseJam) pela ótima companhia durante os almoços no bandejão, durante as aulas e pela diversão durante os dois últimos anos.

À Dra. Roseli Malafronte, por todas as discussões a respeito dos resultados.

À Juliana Summa (Juju), por ter me dado todo o apoio necessário, e por me acompanhar nas coletas nos fins de semana, mesmo tendo que acordar às 4 da manhã! Você é demais!

Ao Marcos Melo, por toda a disponibilidade em me ajudar, e por ter identificado todas as espécies capturadas.

À equipe da Biologia (DEPAVE-3): Meia, Anelisa, Luana (estagiária), Bruna (estagiária), Sóstenes (estagiário) pela contribuição em fazer este trabalho dar certo!

Aos meninos do Setor de Preventiva: Beth, Clarinha, Leiloca, Marcellinho, Roberta, Marcão, Regina, Hiroe por todo o apoio antes e durante a realização desta dissertação! Obrigada pela oportunidade!

Às meninas do Laboratório: Tici, Thaís e Alice, por terem me ajudado nas coletas!

Ao Sérgio e Diogo: sempre juntos, obrigada pela grande amizade!

À toda a equipe de DEPAVE-3, por todo o apoio e colaboração, e permissão para realizar o Mestrado!

Às meninas da Virologia: Cris Centrone, Cris Oliveira, Clara e Renata, por terem me ajudado nas técnicas que eu não fazia idéia de como realizar! Obrigada!

Aos meninos do Laboratório de Entomologia, por todo o apoio, ajuda e diversão.

À Dra. Camila Romano, por ter me ajudado na interpretação dos resultados.

Ao pessoal do LABZOO (CCZ) pelos abonos concedidos para que eu pudesse concluir este trabalho.

À FAPESP, pelo essencial apoio financeiro.

Ao Dr. Jansen de Araújo, por ter me passado seus conhecimentos, e me ajudado desde o início deste trabalho! Obrigada!

“Se os pássaros falassem,
Talvez os teus ouvidos escutassem
Este cativo pássaro dizer:
“Não quero o teu alpiste!
Gosto mais do alimento que procuro
Na mata livre em que a voar me viste;
Tenho água fresca num recanto escuro
Da selva em que nasci;
Da mata entre os verdores,
Tenho frutos e flores,
Sem precisar de ti!”

O Pássaro Cativo – Olavo Bilac

RESUMO

ORICO, L.D.. **Pesquisa de infecções por *Flavivirus* sp. em aves silvestres provenientes das áreas verdes do município de São Paulo.** 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

INTRODUÇÃO: Em grandes cidades, como São Paulo, a pequena porcentagem de matas existentes é representada pelos parques municipais. Estas áreas, além de representarem ambientes de lazer para as pessoas, albergam uma enorme diversidade biológica, desde mosquitos até aves e mamíferos. A interação destas espécies favorece a circulação de *Flavivirus*, causadores de importantes doenças humanas, que têm nas aves um importante reservatório. Atribui-se às aves migratórias o papel de carreadoras dos vírus, já que as mesmas percorrem longas distâncias para completar seu ciclo biológico. A chegada de aves do Hemisfério Norte ocorre em alguns Parques, o que favoreceria a dispersão de alguns vírus, como o Vírus do Nilo Ocidental, já que nestas áreas estão presentes mosquitos potencialmente vetores. **OBJETIVOS:** identificar infecção por *Flavivírus* nas aves dos parques municipais de São Paulo. **MÉTODOS:** De Março de 2012 a Janeiro de 2013, foram coletadas amostras de *swab* de cloaca, orofaringe e sangue de aves capturadas em redes de neblina de duas áreas do município de São Paulo: Parque Anhanguera e Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia. As aves foram anilhadas e liberadas após a coleta do material. Foi realizada técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando iniciadores genéricos que amplificam fragmento do gene NS5 de *Flavivirus*. Amostras positivas foram encaminhadas para sequenciamento. **RESULTADOS:** Foi capturado um total de 231 aves, em sua maioria da Ordem Passeriformes. De um total de 463 amostras, nenhuma amostra apresentou presença de RNA viral. **DISCUSSÃO:** Em se tratando de alguns *Flavivírus*, os passeriformes são considerados os reservatórios mais competentes no ciclo de transmissão, pois atingem altos níveis de viremia. Cabe ressaltar que algumas espécies desta ordem, de ocorrência na cidade de São Paulo, já foram identificadas como portadoras dos vírus Rocio e Ilhéus. A ausência de positividade é esperada, pois embora altamente sensível, a técnica de PCR depende do estado de viremia das aves, que é curta. **CONCLUSÃO:** Os parques municipais são áreas que aproximam aves, mosquitos e humanos, pelo papel ambiental e de lazer que os mesmos representam. Este fato classifica estas áreas como locais com potencial de transmissão de *Flavivirus*, o que torna importante a continuação este estudo, aumentando as áreas de abrangência, para conhecer os *Flavivírus* circulantes e realizar vigilância para vírus que podem ocasionar problemas de Saúde Pública.

Palavras-chave: parques, *Flavivirus*, aves, RT-PCR em tempo real.

ABSTRACT

ORICO, L.D.. **Searching for Flavivirus infection in wild birds from São Paulo city green areas.** 2013. 94pp. Dissertation (Master) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

INTRODUCTION: In big cities, as São Paulo, the little percentage of existing forests is represented by the municipal parks. These áreas, besides acting as entertainment environments to the users, promote a huge biodiversity, including mosquitoes, birds and mammals. These species interaction promotes Flavivirus circulation, viruses responsible for important human diseases. The avian species are important reservoirs for these viruses, specially the migrating birds that can fly for long distances, carrying these viruses to several areas. In some parks, the arrival of migrating birds from the North Hemisphere is documented, fact that can support some viruses dispersion, for example, the West Nile Vírus, considering that in these areas potencial vector for this virus can be found. **OBJECTIVES:** detect Flavivirus infection in birds captured in municipal parks of São Paulo city. **METHODS:** from March, 2012 to January, 2013, oropharyngeal and cloacal swabs, and blood samples were collected from birds captured in mist-net webs located in two municipal areas: Anhanguera Park and Castanheiras Farm/APA Bororé Colônia. The birds were ringed and released after samples collection. The real time RT-PCR was performed, using generic primers which amplify NS5 gene fragment. Positive samples were forwarded to sequence analysis. **RESULTS:** a total of 231 birds were capture, in which the majority belongs to Passeriforms order. Of 463 samples collected, all samples were negative for the viral RNA presence. **DISCUSSION:** when talking about Flaviviruses, the passeriforms are considered the most competent reservoirs in the transmission cycle, because they can achieve great viremia levels. Some passeriforms species, endemic in São Paulo city, were identified as Rocio and Ilhéus viruses carriers in previous studies. The negativity is expected, once the Real Time RT-PCR, although highly sensitive, depends on the viremia duration, which is short in avian species. **CONCLUSION:** the public parks are areas which encloses birds, mosquitoes and the human being, for the environmental and entertainment role they play. This fact classifies these parks as areas with great potencial of Flavivirus transmission, ressalting the great importance to continue this study, increasing the number of areas, to detect the circulating Flavivirus and to perform surveillance for viruses which can cause public health problems.

Keywords: parks, *Flavivirus*, birds, real time RT-PCR.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 URBANIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO 17

1.2 PARQUES NA CIDADE 20

1.3 BIODIVERSIDADE DAS ÁREAS VERDES 22

1.4 ARBOVIROSES 24

1.4.1 Flavivirus 27

1.4.2 Técnicas sorológicas de diagnóstico de Flavivirus 30

1.4.3 Técnicas moleculares de diagnóstico de Flavivirus 33

1.4.4 Flavivirus no Brasil 35

1.5 AVES SILVESTRES E FLAVIVIRUS 40

2 OBJETIVOS 47

2.1 OBJETIVO GERAL 47

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 47

3 MÉTODOS 48

3.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO 48

3.1.1 Parque Anhanguera 49

3.1.2 Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia 51

3.2 CAPTURA DAS AVES 52

3.3 COLETA DE MATERIAL OROFARÍNGEO E CLOACAL 56

3.4 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA 58

3.5 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS 60

3.6 TRANSCRIÇÃO DAS AMOSTRAS 61

3.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) E SEMI-NESTED PCR 62

3.8 PURIFICAÇÃO DO MATERIAL AMPLIFICADO 65

3.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO 65

4 RESULTADOS 67

4.1 AVES CAPTURADAS 67

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE OROFARINGE, CLOACA E SANGUE 71
4.3 AMOSTRAS ANALISADAS 71
4.3 RESULTADOS DAS REAÇÕES DE qPCR 72
4.3.1 Viabilidade das Amostras 72
4.3.2 Análises das Amostras 74
4.4 RESULTADOS DAS REAÇÕES DE SEMI-NESTED PCR 78
4.5 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO 79
5 DISCUSSÃO 82
6 CONCLUSÃO 88
7 REFERÊNCIAS 89
APÊNDICES 106
APÊNDICE 1 – Ficha de Campo 106
CURRÍCULUM LATTES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das aves capturadas em redes de neblina Parque Anhanguera e Fazenda Castanheiras, São Paulo, no período de junho de 2012 a janeiro de 2013 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Avanço da mancha urbana sobre a cidade de São Paulo e a conseqüente diminuição da cobertura vegetal.	19
Figura 2 -	Localização das Áreas de Proteção Ambiental do município de São Paulo.	21
Figura 3 -	Mapa dos parques municipais do município de São Paulo.	23
Figura 4 -	Ciclos de manutenção das arboviroses, de maneira geral.	26
Figura 5 -	Estruturas do virion de Flavivirus.	28
Figura 6 -	Genoma do Flavivirus e expressão e proteínas.	28
Figura 7 -	Replicação dos Flavivírus na célula hospedeira.	29
Figura 8 -	Esquema do tempo de produção de anticorpos apos infecção dos Flavivirus, juntamente com os protocolos diagnósticos que devem ser utilizados em cada estágio da infecção.	30
Figura 9 -	Principais rotas migratórias utilizadas por aves migratórias oriundas no Hemisfério Norte.	43
Figura 10 –	Rota de migração de *Falco peregrinus*.	44
Figura 11 -	Rota de migração de *Pandion haliateus*.	44
Figura 12 -	Níveis e período de viremia das diferentes ordens de aves	45
Figura 13 -	Localização das áreas escolhidas no estudo.	49
Figura 14 -	Foto aérea do Parque Anhanguera.	50
Figura 15 -	Redes ornitológicas tipo “mist-net” utilizadas na captura das aves – Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia.	54

Figura 16 - Redes colocadas na área 2 do Parque Anhanguera. 54

Figura 17 - Sacos de pano utilizados para minimizar o stress e impedir a fuga das aves capturadas. 55

Figura 18 - Biometria realizada nas aves capturadas. 57

Figura 19 - Realização dos swabs nas aves capturadas. 58

Figura 20 - Amostras produto da reação de PCR convencional para o gene cyt B de aves. Apenas a banda do controle positivo é visualizada (seta) 59

Figura 21 - Método de extração pelo extrator NucliSENS®EasyMAG® Biomérieux 61

Figura 22 - Alguns exemplares capturados nas redes de neblina. 70

Figura 23 - Curva de amplificação do vírus da Dengue do tipo 4 (DENV-4) utilizado como controle positivo nas reações de PCR em tempo real. 72

Figura 24 - Quantidade das amostras consideradas inviáveis, positivas e negativas à reação de PCR em tempo real e ilustrações das espécies positivas 75

Figura 25 - Curva de amplificação e temperatura de Melting da amostra 230 SG, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo. 76

Figura 26 - Curva de amplificação e temperatura de Melting da amostra 87 OF, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo. 76

Figura 27 - Curva de amplificação e temperatura de Melting da amostra 211 OF, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo. 77

Figura 28 - Curva de amplificação e temperatura de Melting da amostra 232 SG, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo. 77

Figura 29 - Amostras produto da reação de PCR em tempo real, visualizadas à eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. 78

Figura 30 - Amostras produto da reação de semi-nested PCR apos eletroforese em gel de agarose 2,5%

corado com brometo de etídeo. 79

Figura 31 - Alinhamento da sequencia amplificada (230 SG) com *Gallus gallus* RNA pseudoridylate synthase domain containing 2 (RPUSD2), mRNA. 80

Figura 32 - Alinhamento da sequencia amplificada (87 OF) com *Ficedula albicollis* RNA pseudoridylate synthase domain containing 2 (RPUSD2), mRNA. 81

Figura 33 - Alinhamento da sequencia amplificada (211 OF) com *Ficedula albicollis* RNA pseudoridylate synthase domain containing 2 (RPUSD2), mRNA. 81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Complexos antigênicos dos Flavivirus, definidos pela relação em testes de neutralização cruzada com anticorpos policlonais.	31
Quadro 2 -	Iniciadores utilizados para detecção do DNA de aves	60
Quadro 3 -	Lista de referencia dos Flavivirus transmitidos por mosquitos	63
Quadro 4 -	Iniciadores utilizados para detecção de RNA de Flavivirus.	64
Quadro 5 -	Lista dos animais cujas amostras foram consideradas inviáveis.	73
Quadro 6 -	Lista dos animais cujas amostras foram consideradas positivas à qPCR	74

SIGLAS UTILIZADAS

APA -	Área de Proteção Ambiental
APP -	Área de Proteção Permanente
BSQV –	Vírus Bussuquara
CPCV -	Vírus Cacipacoré
DENV -	Vírus da Dengue
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
ELISA -	ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da America
FAV -	vírus da Febre Amarela
HI -	Inibição da Hemaglutinação
IgG -	imunoglobulina G
IgM -	imunoglobulina M
IGUV -	vírus Iguape
ILHV -	vírus Ilhéus
JEV -	vírus da Encefalite Japonesa
Km -	kilômetros
NJLV -	vírus Naranjal
nm -	nanômetros
PRNT -	teste de neutralização por redução em placa
qPCR -	PCR em tempo real
RT-PCR -	reação em cadeia pela polimerase por transcrição reversa

RPPN - Reserva Particular do Patrimônio Natural

RNA - ácido ribonucléico

ROCV - vírus Rocio

SLEV - vírus da encefalite de Saint Louis

UC - unidade de conservação

VEEV - vírus da encefalite eqüina venezuelana

VNO - vírus do Nilo Ocidental

1 INTRODUÇÃO

No final do último século, a população mundial triplicou, de 2,5 para 7 bilhões de pessoas e calcula-se que, em 2050, a população mundial passe da marca de 10 bilhões (REISEN, 2012). A concentração da população em aglomerados urbanos do continente Americano intensificou-se nas últimas décadas, tornando-o um dos mais urbanizados do globo (WHATELY *et al*., 2008). As mudanças demográficas ocorridas nos países subdesenvolvidos, a partir da década de 60, consistiram em intensos fluxos migratórios rurais-urbanos, resultando num “inchaço” das cidades (TAUIL, 2001).

Nos últimos 40 anos, a proporção da população rural da América Latina caiu de 50% para menos de 25%, pois a maioria das pessoas migra para grandes cidades à procura de melhores condições de vida (AIDE e GRAU, 2004). O crescimento populacional gera a necessidade por espaço, e as áreas vegetadas e florestadas são direcionadas para outros usos (CROPPER e GRIFFITHS, 1994).

A devastação das florestas traz consequências ecológicas importantes, como altas emissões de carbono, perda de biodiversidade (AIDE e GRAU, 2004) e fragmentação da paisagem, criando habitats antropogênicos adequados para um número limitado de espécies comensais. Juntamente com o aumento da população humana e perda de ecossistemas, houve um aumento considerável de espécies comensais domésticas e peridomésticas (REISEN, 2012).

Muitas arboviroses têm as aves como reservatório principal. Em ambientes que dão condições para manutenção destes animais, juntamente com a presença do vetor, é importante realizar pesquisas relacionadas a estas doenças. Em grandes cidades, como São Paulo, que sofrem com a pressão antrópica e demonstram a sobrevivência da biodiversidade nas poucas áreas verdes restantes, é necessário conhecer as doenças

circulantes e entender o potencial das mesmas em invadir novas áreas e tornarem-se importantes problemas de saúde pública.

1.1 URBANIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO

Juntamente com Cidade do México, Nova Iorque, Shanghai e Buenos Aires, São Paulo faz parte das dez cidades mais populosas do mundo, ocupando o 3º lugar, perdendo apenas de Tóquio e Délhi (UNITED NATIONS, 2009). Segundo o IBGE (2010), São Paulo tem uma população de 11.253.503 habitantes, em uma área de 1.521,10 km^2. Em grandes metrópoles mundiais, os problemas ambientais são uma constante, agravados pela falta de infraestrutura e devastação das áreas verdes (MELLO-THÉRY, 2011) resultante da intensa urbanização.

Segundo USTERI (1911), a região onde se insere atualmente a cidade de São Paulo era composta basicamente por vegetação de várzea, campos e florestas. Em 1890, São Paulo tinha cerca de 65000 habitantes. No ano de 1900, houve um crescimento vertiginoso da população com aumento contínuo da área urbana; o número de habitantes passa a ser de 240000 e, nos anos 50, atinge a marca de 3,5 milhões (PMSP, s/d c) devido ao processo de periferização, que consolidou São Paulo como metrópole industrial. O processo de ocupação do espaço periférico torna-se deletério principalmente para a vegetação, tanto pública quanto particular. A maioria das favelas existentes hoje ocuparam as áreas livres públicas, principalmente as destinadas à implantação de áreas verdes (figura 1) (PMSP, 2000).

Entre os anos de 1991 e 2000, o município perdeu 5.345 ha de cobertura vegetal, o que ocorreu de forma intensiva nos distritos periféricos, muitos dos quais abrigavam paisagem rural no início da década de 90

(PMSP, 2000).

A Região Metropolitana de São Paulo encontra-se na região ecológica Sudeste do Estado de São Paulo, compreendida pelo Complexo Cristalino e Vale do Paraíba. São Paulo localiza-se na Bacia Hidrográfica do Alto Tietê (BARBOSA e MARTINS, 2003) e é o município com maior área de vegetação remanescente (SÃO PAULO, 2005).

Hoje, a cobertura vegetal da cidade é constituída por fragmentos da vegetação natural secundária (floresta ombrófila densa, floresta ombrófila densa alto montana, floresta ombrófila densa sobre turfeira e campos naturais), que ainda resistem ao processo de expansão urbana. Esta resistência dá-se em porções mais preservadas no extremo sul, na Serra da Cantareira ao Norte e em manchas isoladas, como as Áreas de Preservação Ambiental (APAs) do Carmo e Iguatemi (zona leste), em ambientes implantados nas áreas urbanizadas (parques e praças municipais), e por conjuntos ou espécimes isolados em terrenos particulares (PMSP, 2000).

As áreas de Mata Atlântica preservada em seus diversos estágios de regeneração e as áreas com vegetação significativa, dentro ou fora da área urbana de São Paulo, são essenciais para o bem estar da população e cumprem inúmeras funções que melhoram este ambiente excessivamente impactado pela ação humana. Dentre suas funções, destacam-se: ecológicas, climáticas, sociais, paisagística e educativa (WHATELY et al., 2008).

Figura 1 Avanço da mancha urbana sobre a cidade de São Paulo e consequente diminuição da cobertura vegetal.
Fonte: PMSP, 2000.

Tais funções reforçam a importância dos parques e áreas com vegetação significativa para a manutenção da qualidade de vida das grandes metrópoles, reforçando a necessidade de proteção destas áreas, estejam elas demarcadas como parques municipais, estaduais, Unidades de Conservação (UCs), Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPNs), Áreas de Preservação Permanentes (APPs) e mesmo como áreas vegetadas que ainda não possuem respaldo especial de proteção. Para essas áreas é de fundamental importância a criação de mecanismos de proteção, que, entre outros aspectos, são importantes instrumentos para evitar o desmatamento, com a consequente destruição de habitats, e para estimular uma convivência mais harmoniosa entre o desenvolvimento urbano e a preservação ambiental (WHATELY et al., 2008).

1.2 PARQUES NA CIDADE

A evidência mais tangível do rápido crescimento da consciência de conservação e da ciência da conservação no Brasil desde o início da década de 70, pode ser vista na proliferação dos parques e reservas. No Brasil, de 1976 até a década de 1990, houve um grande investimento em parques e outras unidades de conservação federais, estaduais, municipais e privadas – bem maior que qualquer outro país tropical e comparável ao de países em desenvolvimento (MITTERMEIER et al., 2005).

Em grandes cidades, estas áreas, alem de representarem locais fundamentais para a visitação, lazer e recreação das comunidades, são os últimos refúgios para a proteção e conservação da biodiversidade (MAZZEI et al., 2007; WHATELY *et al*., 2008).

As unidades de conservação (UCs) são definidas por espaço territorial e seus recursos ambientais, incluindo as águas jurisdicionais, com características naturais relevantes, legalmente instituído pelo Poder Público, com objetivos de conservação e limites definidos, sob regime especial de administração, ao qual se aplicam garantias adequadas de proteção (BRASIL, 2000) e podem ser federais, estaduais ou municipais. A cidade de São Paulo conta com nove UCs, todas geridas pela Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente (SVMA); dentre elas, há duas APAs: APA Capivari-Monos e APA Bororé-Colônia (ambas localizadas na Zona Sul), consideradas UCs de uso sustentável, ou seja, tem como objetivo a conservação da natureza, considerando o uso direto e sustentável de parcela de seus recursos naturais (figura 2).

Os parques municipais também podem ser considerados unidades de conservação, já que representam importantes áreas de lazer e/ou

significativas áreas de preservação de vegetação nativa, banco genético e refúgio para a fauna urbana (PMSP, 2000).

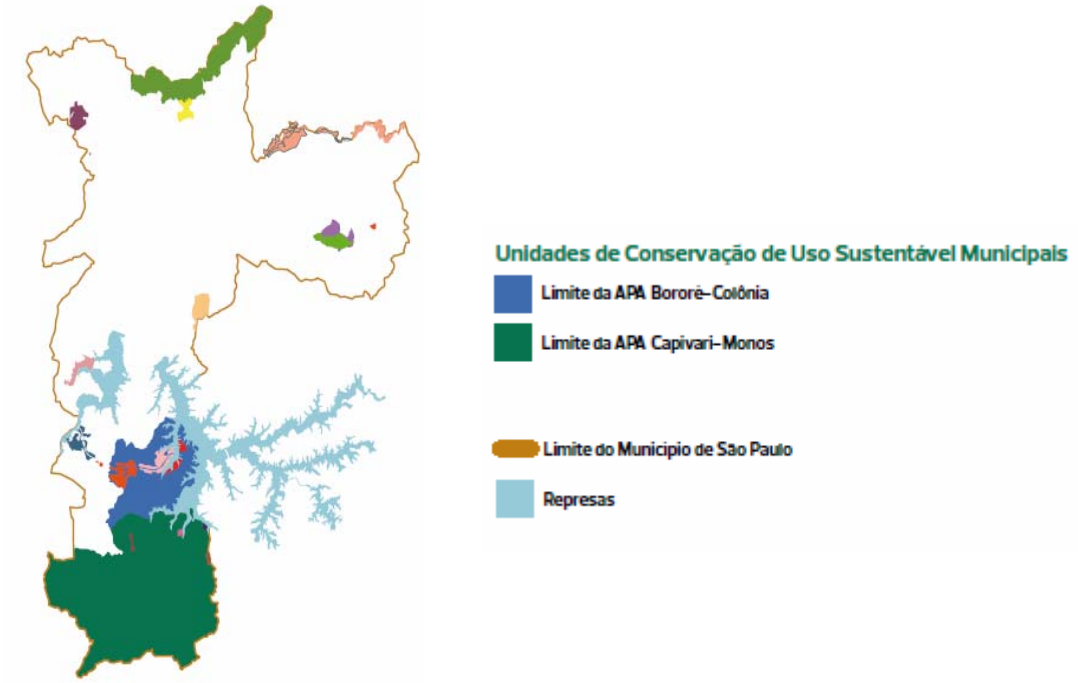


Figura 2 Localização das Áreas de Proteção Ambiental do Município de São Paulo. Fonte: SÃO PAULO, 2012.

Podemos classificar o surgimento dos parques em três movimentos. O primeiro deles, concentrado entre o final do século XIX e início do século XX, foi marcado pelo incremento da economia cafeeira e pela transformação do antigo burgo nesta grande cidade. Naquele momento, os parques, de inspiração largamente francesa, eram criados como locais de cultura, pontos de encontro para a sociedade paulistana. Um segundo movimento, detectado quando a cidade já alterara significativamente sua fisionomia e transformara-se, de fato, numa metrópole,coloca a criação de parques a partir de remanescentes de grandes fazendas, chácaras e propriedades da elite paulistana. Por fim, o movimento atual traz a real necessidade de proporcionar a criação de novas áreas, em especial nas periferias da cidade, onde ela continua a crescer. É neste ponto que detectamos o surgimento de

parques muitas vezes pequenos, no entanto profundamente necessários para proporcionar melhor qualidade de vida aos paulistanos (WHATELY et al., 2008)

A ocorrência de áreas com vegetação no município é fator fundamental para a saúde ambiental e elemento estruturador da paisagem, exercendo papel fundamental na manutenção da biodiversidade e na amenização dos problemas ambientais. A riqueza de espécies vegetais, sobretudo das nativas, é fundamental para programas de conservação de patrimônio genético, como formação de corredores ecológicos e proteção da fauna (PMSP, 2000). A implantação destes corredores para interligar as áreas verdes da cidade é fundamental para reverter os efeitos negativos decorrentes da fragmentação e do uso inadequado dos recursos naturais (KORMAN, 2003).

Hoje, São Paulo conta com 105 parques, representados por 75 Parques Urbanos, 21 Parques Lineares e 9 Parques Naturais (figura 3) (PMSP, 2000).

1.3 A BIODIVERSIDADE NAS ÁREAS VERDES

A biodiversidade compreende uma diversidade de espécies e ecossistemas. O aumento da população humana resultou em uma perda da biodiversidade sem precedentes (KEESING et al., 2010), bem como a fragmentação da paisagem urbana, apresentada em um mosaico de diferentes ambientes, com mudanças na vegetação (MENDONÇA e dos ANJOS, 2005). Como parte desta mudança, alguns hábitats e suas comunidades animal e vegetal associadas foram eliminados, enquanto outros expandiram-se e alguns novos foram criados, ou intencionalmente (parques municipais), ou consequentemente (lixo, águas paradas, etc) (ROBINSON, 2005).

Parques Municipais
1 Parque Aclimação
2 Parque das Águas
3 Parque Alfredo Volpi
4 Parque Alto da Boa Vista
5 Parque Anhanguera
6 Parque Buenos Aires
7 Parque Burle Marx e Arredores
8 Parque do Carmo
9 Parque Cemiterio Vila Formosa
10 Centro Mun.Campismo - CEMUCAM
11 Parque Chácara das Flores
12 Parque Chico Mendes
13 Parque Cidade de Toronto
14 Parque da Ciência
15 Parque Colinas de São Francisco
16 Parque Consciência Negra
17 Parque do Cordeiro
18 Parque Darcy Silva
19 Parque Embu Mirim
20 Parque Ermelino Matarazzo
21 Parque dos Eucaliptos
22 Parque Guarapiranga
23 Parque do Ibirapuera
24 Parque Independência
25 Parque Jacintho Alberto
26 Parque Jacques Costeau
27 Parque Jardim Felicidade
28 Parque Lajeado
29 Parque Lina e Paulo Raia
30 Parque Linear Castelo Dutra
31 Parque Linear Caulim
32 Parque Linear Cipoaba
33 Parque Linear do Bispo
34 Parque Linear Guaratiba
35 Parques Linear Nove de Julho e Linear São José
36 Parque Linear Oratorio
37 Parque Linear Pires/Caburé
38 Parque Linear Sapopemba
39 Parque Linear Taboão
40 Parque Lions Club Tucuruvi
41 Parque Luis Carlos Prestes
42 Parque da Luz
43 Parque M'Boi Mirim
44 Parque Nabuco
45 Parque Nair Belo
46 Parques Pinheirinho D´água e Linear do Fogo
47 Parque Piqueri e Arredores
48 Parque do Povo
49 Parque Previdência
50 Parque Raposo Tavares
51 Parque Raul Seixas
52 Parque Rodrigo de Gaspari
53 Parque Santa Amélia
54 Parque Santo Dias e Arredores
55 Parque São Domingos
56 Parque Severo Gomes
57 Parque Shangrila
58 Parque Tenente Brigadeiro Faria Lima
59 Parque Tenente Siqueira Campos
60 Parque Vila do Rodeio
61 Parque Vila dos Remédios
62 Parques Vila Guilherme e do Trote
63 Parque Vila Prudente (Lidia Natalizio Diogo)
APA Municipal Bororé-Colônia
64 Fazenda Castanheiras
APA Municipal Capivari-Monos
65 Bairro Gramado
66 Clube Campestre de São Paulo
67 Estação Evangelista
68 Fazenda Capivari (SABESP) e Arredores
69 Parque Natural Municipal da Cratera de Colônia
70 Sitio Bordim
Areas Verdes Significativas
71 Clube da Varig
72 Clube de Campo São Paulo
73 Clube Hípico de Santo Amaro
74 Fazenda Mutinga
75 Jardim Herculano e arredores
76 Sitio Margarida
77 Sitio Roda D'Água
Parques e Unidades de Conservação Estaduais
78 APA Estadual do Carmo
79 Fazenda Tizo
80 Núcleo Curucutu - Parque Estadual da Serra do Mar
81 Villa Lobos

Figura 3 Mapa dos Parques Municipais do Município de São Paulo.
Fonte: SÃO PAULO, 2010a (com modificações).

Estima-se que, em 50 anos, a taxa de extinção esteja 10 a 100 vezes maior do que a atual, que está em torno de 1000 a 10000 vezes a taxa de extinção natural, que é a que ocorreria sem a interferência humana (SITE WWF). Uma grande proporção de espécies estão ameaçadas de extinção (12% de aves, 23% dos mamíferos, 32% de anfíbios, 31% dos gimnospermas e 33% de corais) e a melhor estimativa da população dos animais indica que, desde 1970, a população global decaiu quase 30% (KEESING et al., 2010).

De acordo com MAGALHÃES e VASCONCELLOS (2007), a pequena porcentagem de matas existentes na cidade são, em grande parte, responsáveis pela biodiversidade registrada na cidade. Segundo o Inventariamento de Fauna do Município de São Paulo (SÃO PAULO, 2010),

que analisou 81 áreas verdes da cidade, foram catalogadas 700 espécies de animais (2 da Classe Malacostraca (caranguejo e lagostim), 9 da Classe Arachnida (aranhas), 126 da Classe Insecta (borboletas e grilo), 23 da Classe Osteichthyes (peixes), 45 da Classe Amphibia (rãs, sapos e pererecas), 40 da Classe Reptilia (cágados, crocodilos, lagartos e cobras), 372 da Classe Aves e 83 da Classe Mammalia), além das 41 categorias taxonômicas de mosquitos identificadas em 35 dos 105 parques municipais de são Paulo (MEDEIROS-SOUZA et al., 2013), ressaltando a importância da conservação destas áreas para a manutenção de sua biodiversidade, já que a relação de espécies que ocorrem num ambiente é indicativo do grau de preservação do mesmo (SÃO PAULO, 2010).

Neste contexto, a pesquisa de arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) nestes ambientes faz-se necessária, uma vez que os parques promovem contatos estreitos entre reservatório (aves), vetores e o homem, o que propicia a circulação destes microorganismos causadores de importantes doenças humanas e animais.

1.4 ARBOVIROSES

A diversidade biológica promovida por estes ambientes pode representar impactos para a população humana, como, por exemplo, os riscos decorrentes da interação mosquito-homem (URBINATTI et al., 2001), pelo papel que estes artrópodes desempenham na transmissão de doenças ao homem e a outros vertebrados (MONTES, 2005).

Os arbovírus, ou *arthropod-borne viruses* (vírus transmitidos por artrópodes) são vírus mantidos na natureza por meio da transmissão biológica entre artrópodes hematófagos (mosquitos, carrapatos) e hospedeiros vertebrados susceptíveis (CDC, 2005). Requerem um

reservatório (usualmente uma ave ou um pequeno mamífero), e um vetor, como o mosquito, para ser transmitido a outros organismos (WEAVER e BARRETT, 2004).

É transmitido biologicamente, e devem replicar no vetor antes da transmissão (WEAVER, 1997), que pode ser vertical, quando uma fêmea de mosquito infectada transmite para seus ovos; ou horizontal, tanto por transmissão venérea de um macho infectado para uma fêmea, quanto por transmissão oral, de uma fêmea infectada para um hospedeiro vertebrado durante sua hematofagia (WEAVER e BARRETT, 2004; WEAVER e REISEN, 2010). Uma vez infectado, o artrópode, após o período de incubação extrínseca, torna-se apto a transmitir os arbovírus durante toda sua vida (figura 4), e é então considerado um vetor (CORDELLIER e DEGALLIER, 1992).

Os arbovírus distribuem-se em três famílias: Togaviridae (gênero Alphavirus), Flaviviridae e Bunyaviridae, e todos têm uma distribuição global (CDC, 2005).

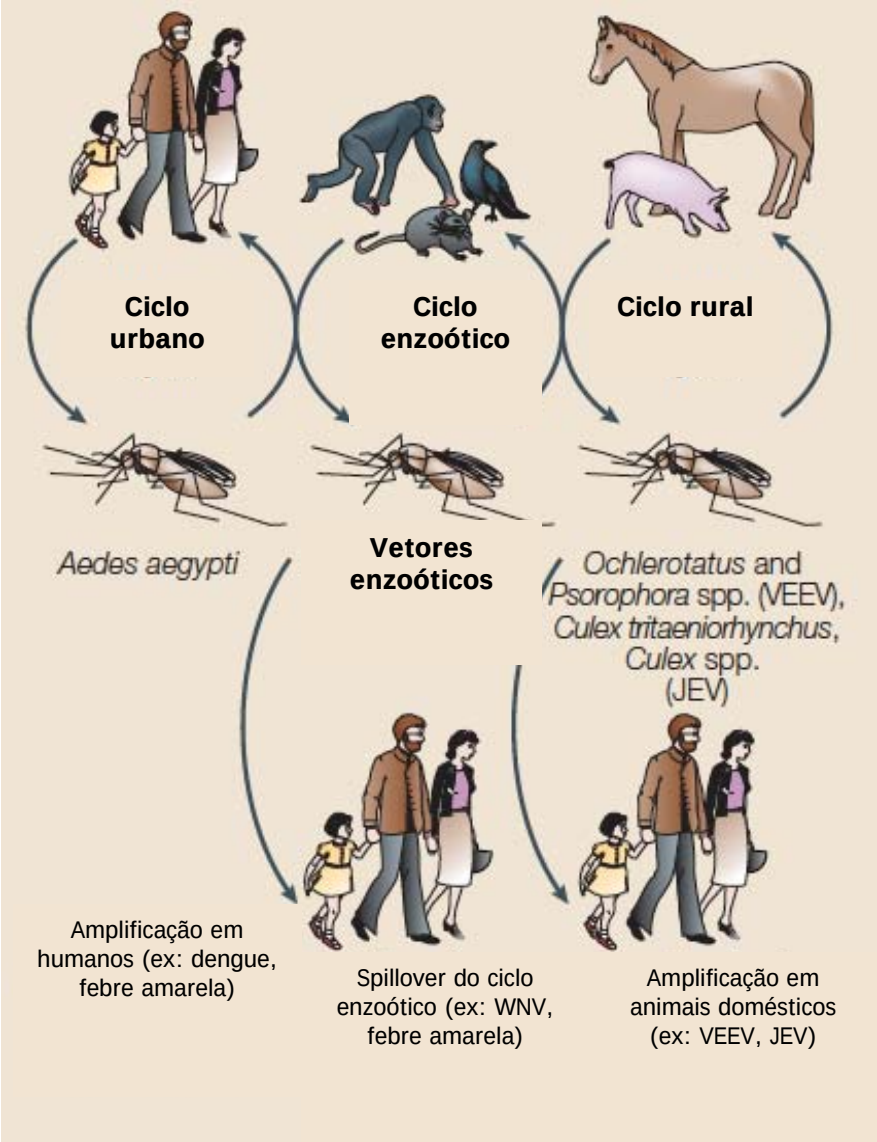


Figura 4 Ciclos de manutenção das arboviroses, de maneira geral (VEEV – vírus da encefalite equina venezuelana; JEV – vírus da Encefalite Japonesa).
Fonte: WEAVER e BARRETT, 2004 (com modificações).

1.4.1 Flavivirus

O nome da família Flaviviridae é derivado da febre amarela, uma doença causada por um *Flavivirus* que tem a icterícia como principal sintoma (QUINN et al., 2005). Apesar de biologicamente similares, os membros desta família consistem numa grande variedade de vírus que diferem quanto à patogenicidade e ecologia (MONATH, 1990).

A família Flaviviridae divide-se em três gêneros: *Flavivirus, Pestivirus* e *Hepacivirus* (QUINN et al., 2005; LOBO et al., 2009), que variam quanto aos hospedeiros, especificidade e sintomas (LOBO et al., 2009).

O gênero *Flavivirus* comporta aproximadamente 70 vírus (LOBO et al., 2009) e consiste em quatro grupos de vírus, cada um com uma associação entre hospedeiros diferente: vírus de insetos (mosquito), que não têm a capacidade de replicar-se em vertebrados; vírus de vertebrados que não necessitam de vetor; vírus transmitidos por carrapatos, que replicam-se em carrapatos e vertebrados; e vírus transmitidos por mosquitos, que replicam em mosquitos e vertebrados (KUNO e CHANG, 2005).

Consistem em partículas esféricas de 37 a 50 nm de diâmetro, que contem uma ribonucleoproteína circundada por uma membrana lipídica proveniente da célula hospedeira (MONATH, 1990). O vírion contém três proteínas estruturais, como indica a figura 5: C (nucleocapsídeo), M (proteína de membrana) e E (proteína do envelope). A fita de RNA simples sentido positivo codifica sete outras proteínas não estruturais, que participam da replicação viral (LUDWIG e IACONO-CONNORS, 1993). Algumas são expostas na membrana plasmática, deixando o vírion susceptível a anticorpos e eliminação mediada por células imunes (MONATH, 1990).

As proteínas não estruturais são codificadas logo após as estruturais e nesta ordem: NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (figura 6), e participam de processos de replicação viral e modulação na permeabilidade de membrana, dentre outros. As proteínas NS1, NS3 e NS5 são grandes e altamente conservadas; já as proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são menores e de característica hidrofóbica (LINDENBACH e RICE, 2003).

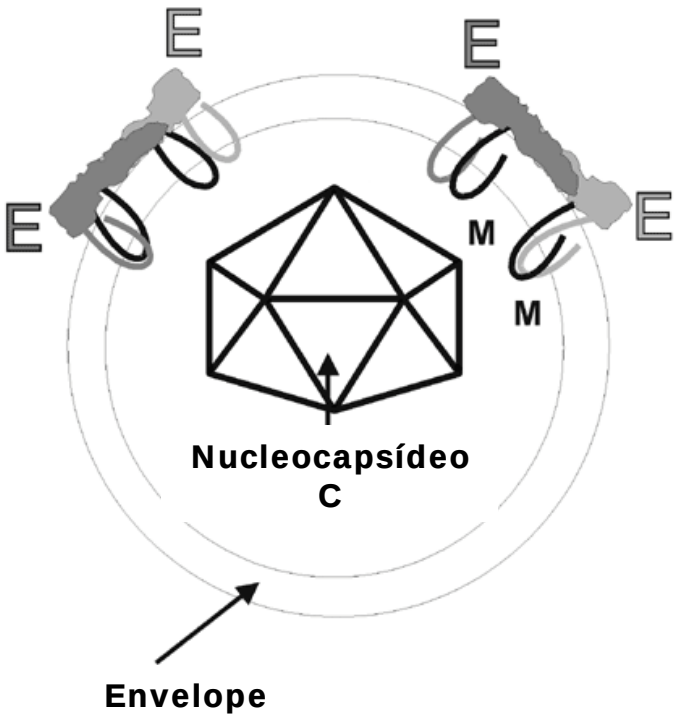


Figura 5 Estruturas do virion de *Flavivirus*: C (nucleocapsídeo), M (proteína de membrana) e E (proteína do envelope)
Fonte: PETERSEN e ROEHRIG, 2001 (com modificações).

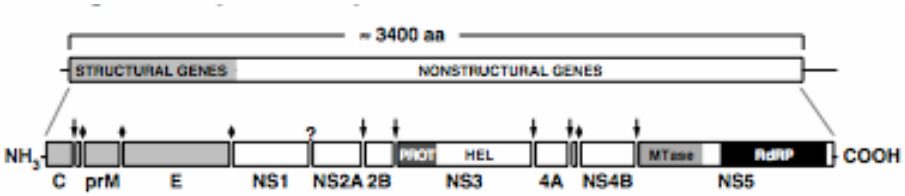


Figura 6 Genoma do *Flavivirus* e expressão de proteínas.
Fonte: LINDENBACH e RICE, 2003. (com modificações).

A infecção começa com a ligação do vírion às proteínas de superfície da célula hospedeira, e penetram na mesma por endocitose. Ocorre a

liberação do material genético viral para o citoplasma, e inicia-se o processo de replicação e tradução das proteínas estruturais e não estruturais virais. Um precursor da poliproteína é traduzido a partir do RNA viral, que será utilizada como molde para a produção das proteínas. O genoma viral é, então, replicado pela RNA-polimerase-RNA-dependente. Os novos vírions produzidos são encapsidados com a proteína C e, nesta fase, são partículas imaturas, compostas apenas de proteínas virais de membrana (prM e E) ligadas à membrana do retículo endoplasmático. Estas partículas produzidas são, então, liberadas da célula hospedeira, e tornam-se maduras neste processo, quando há a clivagem do "pr" da partícula viral, como mostra a figura 7 (MAEDA e MAEDA, 2012).

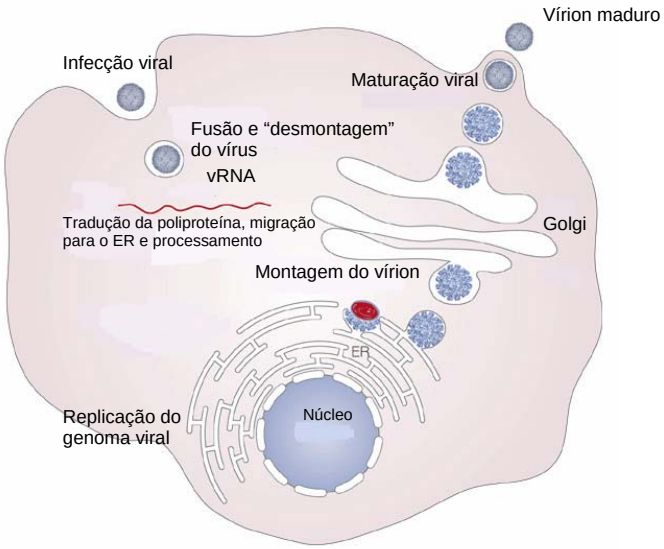


Figura 7 Replicação dos Flavivirus na célula hospedeira.
Fonte: MUKHOPADHYAY et al., 2005 (com modificações).

A resposta imune do animal inicia-se logo após a infecção por Flavivirus. No estágio inicial da infecção, o vírus replica-se e a viremia desenvolve-se. Neste estágio é possível detectar os RNAs por RT-PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*). Depois dos primeiros sintomas, o organismo passa a produzir IgM. Neste estágio, técnicas sorológicas como IgM-ELISA (ensaio imunoenzimático para IgM), Inibição da

Hemaglutinação (HI) ou Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT) podem ser aplicados. Nos estágios finais da infecção, os níveis de IgG no sangue começam a subir e persiste nos animais infectados. Para detectá-la, utiliza-se o IgG-ELISA (ensaio imunoenzimático para IgG), HI e PRNT (figura 8) (MAEDA e MAEDA, 2012). As técnicas diagnósticas serão abordadas no tópico a seguir.

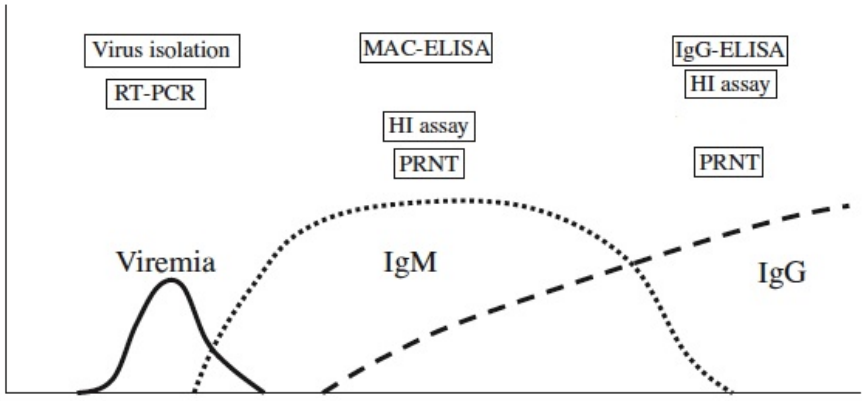


Figura 8 Esquema do tempo de produção de anticorpos após infecção por Flavivirus, juntamente com os protocolos diagnósticos que devem ser utilizados em cada estágio da infecção (RT-PCR: reação em cadeia pela polimerase com transcrição reversa; MAC-ELISA: IgM-ELISA; HI: inibição da hemaglutinação; PRNT: neutralização por redução em placa)
Fonte: MAEDA e MAEDA, 2012 (com modificações).

1.4.2 Técnicas sorológicas de diagnóstico

O diagnóstico sorológico é realizado com três objetivos principais: a) diagnóstico laboratorial de um paciente doente; b) estudo de soroprevalência em uma investigação epidemiológica; c) avaliar resposta imune em humanos e animais, incluindo os testes vacinais e experimentos em animais (KUNO, 2003) e d) avaliar a resposta imune de doadores de sangue previamente positivos para infecções por *Flavivirus* (PRINCE et al., 2005).

A partir dos testes sorológicos, os *Flavivírus* foram classificados em oito complexos antigênicos, baseados nos determinantes antigênicos da proteína E. Vírus relacionados, mas diferentes, constituem um complexo antigênico, e há oito complexos existentes (Quadro 1) (MONATH, 1990).

As técnicas mais praticadas são o teste de inibição da hemaglutinação (HI), teste de neutralização (NT), IgM-ELISA e IgG-ELISA, embora existam outras técnicas.

Quadro 1 Principais complexos antigênicos dos *Flavivirus* definidos pela relação em testes de neutralização cruzada com anticorpos policlonais[a].

Vetor principal	***Complexo antigênico***	***Virus***
Carrapato	Encefalite transmitida por artrópodes	febre hemorrágica Omsk
Mosquito	Encefalite japonesa	Encefalite japonesa, encefalite de Saint Louis, Encefalite do vale do Murray, *West Nile Virus* , Kunjin, Usutu, Koutango
	Grupo ainda não definido [b]	Rocio, Ilhéus, Naranjal, Bussuquara, Iguape, Cacipacoré
	Dengue	Den 1, Den 2, Den 3 e Den4

Fonte: MONATH, 1990 (traduzida e modificada); KUNO e CHANG (1998).
Notas: a) os complexos descritos correspondem à associação ao vetor. Existem outros *Flavivirus* não descritos neste quadro que são suficientemente diferentes dos aqui relatados; b) vírus que compõem o grupo de *Flavivirus* transmitidos por mosquitos, porém não se agrupam em um complexo antigênico definido; c) apenas os complexos de interesse estão descritos no quadro.

O teste de HI é realizado baseado na capacidade de alguns *Flavivirus* de aglutinar hemácias de certos animais. A presença de anticorpos específicos neutraliza esta capacidade viral, inibindo a hemaglutinação que ocorreria pela ligação do virion com a hemácia (KUNO, 2003). A técnica mede anticorpos totais, incluindo IgM e IgG (MAEDA e MAEDA, 2012). As maiores vantagens são: i) não requerer equipamentos de alto custo; e ii) não ser espécie-específica, podendo ser usada para testar soro de qualquer animal, sendo útil em estudos de vigilância.; porém, é a técnica que mais

apresenta reação cruzada para Flavivirus (KUNO, 2003; MAEDA e MAEDA, 2012).

O teste de neutralização mede todas as imunoglobulinas neutralizantes, como IgM e IgG (KUNO, 2003). O mais utilizado é o “teste de neutralização por redução em placa” (PRNT), além de ser o teste sorológico mais específico para diferenciar infecções por *Flavivirus* (CALISHER et al., 1989). Nesta técnica, o soro é diluído em várias concentrações e misturado com vírus de titulação conhecida. Caso haja, no soro, anticorpos neutralizantes, ocorrerá interação entre vírus e anticorpo. O resultado da técnica mostra a inibição da infectividade viral como redução na ligação do vírus à célula e formação de placa por ligação espécifica do anticorpos às partículas virais (KUNO, 2003; MAEDA; MAEDA, 2012). Nesta técnica, é possível diferenciar anticorpos tipo-específicos para *Flavivirus* (JOHNSON et al., 2009). Porém, em países como o Brasil, onde um grande número de *Flavivirus* foi descrito, esta técnica não oferece a capacidade de diferenciar os anticorpos específicos para cada *Flavivirus*, havendo resultados inespecíficos devido à reatividade cruzada. É importante também considerar a existência de *Flavivirus* ainda não conhecidos, que podem contribuir para este processo.

Já os testes de ELISA (ensaio imunoenzimático) podem detectar tanto IgM quanto IgG; são mais utilizados para o vírus da Dengue, com o intuito de distinguir infecções primárias de infecções secundárias, pela relação dada entre IgM e IgG (KUNO e GUBLER, 1991; VAUGHN et al., 1999) e também para distinguir infecção por WNV de outros vírus pertencentes ao complexo sorológico da encefalite japonesa. Na Austrália, também foi utilizada para diferenciar infecções por *Flavivirus* endêmicos em humanos (TAYLOR et al., 2005).

1.4.3 Técnicas moleculares de diagnóstico de Flavivirus

Até 1985, a detecção viral era realizada a partir do isolamento em cultura de células ou em camundongos (LANCIOTTI, 2003), considerada a técnica “gold-standard” para obtenção de um diagnóstico confirmado de infecção por Flavivirus (DOMINGO et al., 2011), seguido de imunofluorescência, microscopia eletrônica ou ELISA. Porém, eras técnicas demoradas e de difícil realização (LANCIOTTI, 2003).

Nos anos 90, várias técnicas de reação em cadeia pela polimerase (PCR) começaram a ser descritas na literatura. Comparada ao isolamento viral em cultura de células, a PCR ofereceu maior sensibilidade, além de maior rapidez. O DNA amplificado poderia então, ser sequenciado, removendo toda a ambigüidade na identificação de vírus (LANCIOTTI, 2003). O diagnóstico molecular passou a ser priorizado para detectar infecções em sua fase aguda (DOMINGO et al., 2011).

O uso da amplificação molecular é crucial na identificação de novos *Flavivirus* (MOUREAU et al., 2007). Os métodos convencionais de PCR (Reverse Transcriptase - PCR) são os mais usados; contudo, há o risco de contaminação, principalmente em Nested-PCR, apesar de oferecer maior sensibilidade (DOMINGO et al., 2011).

As técnicas convencionais de PCR possuem métodos que necessitam de intensa manipulação do material amplificado, o que aumenta a chance de contaminação do laboratório, bem como de resultados “falso-positivos” em testes subseqüentes (HIGUCHI et al., 1992).

Nos anos de 1992 e 1993, HIGUCHI et al. (1992 e 1993) desenvolveram uma técnica de PCR, hoje chamada de *Real Time* PCR (qPCR), cujas amplificação e detecção do material amplificado ocorrem simultaneamente, dentro de um equipamento fechado, diminuindo consideravelmente os riscos de contaminação.

Os produtos de PCR são detectados a partir da fluorescência emitida

pelos corantes utilizados, e está relacionada à concentração do produto. O SYBR Green® é amplamente utilizado como fluoróforo, e possui alta afinidade por moléculas de DNA fita dupla (dsDNA) (WITTWER et al., 1997), incluindo primer-dimers e produtos não específicos, o que faz da reação ter baixa especificidade (ESPY et al., 2006). Suas vantagens incluem estabilidade térmica e alta sensibilidade (ZIPPER et al., 2004).

A formação de primer-dimers interfere na formação de produtos específicos devido à competição das duas reações pelos reagentes disponíveis, e pode levar à leituras errôneas. Para controlar a formação destes dímeros, é realizada a análise da curva de *Melting*, ou curva de dissociação, ao final da reação. A fluorescência é medida em função da temperatura; à medida que a temperatura aumenta, a fluorescência diminui. A molécula de dsDNA separa-se do fluoróforo a uma determinada temperatura (temperatura de *Melting* - Tm), momento no qual a fluorescência decai abruptamente. Como os primer-dimers são tipicamente mais curtos que o produto alvo, eles separam-se a uma temperatura mais baixa, e sua presença é facilmente identificada pela análise da curva de dissociação (KUBISTA et al., 2006).

A quantificação da carga viral das amostras é dado pelo *cycle threshold* (Ct), que é definido como o ciclo da reação no qual o sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo ultrapassa o limiar estabelecido. Analisando os valores de Ct, é possível garantir que o PCR está na fase exponencial de amplificação. O valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade de amplicons na reação (quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade de amplicons) (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

1.4.4 Flavivirus no Brasil

No Brasil mais de 200 arbovírus foram descritos sendo que, aproximadamente, 30 foram relacionados à doença humana. Dentre os arbovírus que ocorrem no Brasil, os *Flavivirus* produziram o maior número de infecções e doenças humanas de alta gravidade (FIGUEIREDO, 2010).

Em território brasileiro, já foram descritos os *Flavivirus*: vírus da Febre Amarela (FAV), Bussuquara (BSQV), Cacipacoré (CPCV), Iguape (IGUV), Ilhéus (ILHV), Rocio (ROCV), e encefalite de Saint Louis (SLEV), Naranjal (NJLV), além dos quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV), que têm causado epidemias urbanas no Brasil desde a década de 80 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 1998;). Os vírus IGUV e NJLV não foram isolados de seres humanos e nem são relacionados a infecções humanas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997). Até 2011, não havia nenhum relato de infecção humana pelo CPCV no Brasil; o primeiro relato ocorreu em Rondônia, em um paciente que tinha suspeita de infecção pelo FAV (BATISTA et.al., 2011).

Os vírus da Dengue e da Febre Amarela foram os primeiros microorganismos a serem denominados vírus. Existem quatro sorotipos do vírus da Dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 E DENV-4 (BARRETO e TEIXEIRA, 2008).

Os quatro sorotipos têm origem em macacos e, de forma independente, passaram aos humanos, tanto na África quando na Ásia, há cerca de 100 a 800 anos (CDC, 2012).

No Brasil, os primeiros casos de dengue ocorreram em 1923 em Niterói, no Rio de Janeiro. A partir de novembro de 1981 até o mês de março de 1982, ocorreu uma epidemia na cidade de Boa Vista, Território de Roraima (na região norte da Amazônia Brasileira), com circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-4. Provavelmente tratava-se da expansão da onda epidêmica que atingiu vários países da América Central e do norte da

América do Sul nos finais da década de 70 (OSANAI, 1982; PONTES e RUFFINO-NETTO, 1994).

Assim como o vírus da Dengue, o vírus da Febre Amarela (FA) também é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* e afeta principalmente humanos e macacos (MONATH, 2001). O vírus circula amplamente na América do Sul e África (CDC, 2011), e pode ser transmitido por ciclos urbano, silvestre e intermediário. No Brasil ocorrem apenas os ciclos urbano e o silvestre (WHO, 2013). Em locais de mata, como florestas, o vírus circula entre primatas não-humanos e mosquitos. Os humanos expõem-se esporadicamente ao vírus quando adentram estes locais, na maioria das vezes por lazer, caracterizando o ciclo silvestre. Em locais com alta densidade de mosquitos, os vetores transmitem o vírus dos macacos para os humanos, iniciando o ciclo urbano, onde o próprio homem torna-se fonte de infecção para os mosquitos (MONATH, 2001; WHO, 2013).

No Brasil, a FA ocorre de forma esporádica, com registros de casos isolados na região Amazônica (área endêmica), e na forma de surtos na região extra-amazônica. Entre 1999 e 2001, foram registrados 402 casos humanos, com 186 óbitos. Em 2011, foram notificados os últimos dois casos, todos na região da Amazônia, área endêmica para a FA (BRASIL, s/d).

O vírus BSQV foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1959. O isolamento viral ocorreu a partir do sangue de um macaco sentinela próximo a Belém, no Pará (GOMES e CAUSEY, 1959). Apenas um relato de infecção humana foi descrito por SRIHONGSE e JOHNSON (1971).

O vírus Rocio foi primeiramente identificado durante uma epidemia no Vale do Ribeira entre 1975 e 1978, com constatação de 465 casos humanos, com 61 óbitos. Apesar da taxa de letalidade ter sido calculada em 13%, o número de mortes diminuiu marcadamente após cuidados médicos (LOPES et al., 1978). Acredita-se que o ROCV mantenha-se em um ciclo envolvendo aves silvestres, já que LOPES et. al. (1981) conseguiu isolar o vírus tanto de exemplares da espécie de mosquito *Psorophora ferox,* quanto

de um indivíduo de *Zonotrichia capensis,* ave popularmente conhecida como tico-tico.

Estudos sorológicos posteriores detectaram anticorpos para o ROCV em humanos do Vale do Ribeira, região na qual o vírus foi identificado pela primeira vez (ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000), e em Ribeirão Preto (FIGUEIREDO e al., 1986). Além disso, em uma pesquisa realizada em 2010, foram encontrados anticorpos neutralizantes em cavalos dos estados de São Paulo, Paraíba, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul (SILVA, 2010), constatando a ampla circulação do vírus e possibilidade de novas epidemias.

Em 1979, um novo Flavivírus (IGUV) foi identificado a partir de isolamento em camundongos sentinela numa área florestal em Iguape (SP). Anticorpos neutralizantes para o vírus foram encontrados em aves capturadas em anos posteriores na mesma área, sugerindo a participação destes animais no ciclo de transmissão deste Flavivirus (COIMBRA et al., 1993). Para o vírus Ilhéus, a participação das aves também já foi constatada em uma investigação liderada por PEREIRA *et al.* (2001) realizada no Parque Ecológico do Tietê (São Paulo). Duas espécies de aves silvestres (*Sporophila caerulescens* - coleirinho-paulista e *Molothrus bonariensis* - chopim) apresentaram soropositividade para duas cepas distintas deste arbovírus.

O vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) encontra-se amplamente distribuído nas Américas, do Canadá à Argentina (FIGUEIREDO, 2010). O vírus foi primeiramente identificado como causador de encefalites humanas em 1933, em St. Louis, MO. Posteriormente, uma epidemia ocorreu em Washington, em 1941 e 1942, na qual houve a constatação de que os vetores do vírus seriam mosquitos do gênero *Culex*, e que as aves do peridomicílio manteriam e amplificariam o vírus (HOFMEISTER, 2011).

No Brasil, o vírus de Saint Louis (SLEV) foi primeiramente isolado em 1960, de um *pool* de *Sabethes belisarioi* coletados na estrada Belém-Brasília. Posteriormente, determinou-se que SLV possui aves selvagens, primatas, preguiças, tamanduás e marsupiais como reservatórios, e *Culex*

declarator e *Culex coronator* como vetores (VOGEL *et al.,*2005). No estado de São Paulo, entre 1967 e 1969, oito isolamentos do vírus de *Saint Louis* (SLEV) foram obtidos de roedores, aves e ratos sentinela (LOPES *et al.,* 1979). Posteriormente, na cidade de São Paulo, o vírus foi isolado de um humano, cujos sintomas levaram ao diagnóstico incorreto de Dengue. Por análises moleculares, foi comprovada a infecção por SLEV (ROCCO *et al*., 2005).

Em 1999, em Nova Iorque, teve início uma epidemia de encefalite humana associada a mortes de aves que, no início, achou-se ser causada pelo SLEV, vírus de ocorrência regular nos EUA. Porém, este vírus, apesar de ter as aves como reservatório, não leva a óbito indivíduos desta classe de animais (McLEAN et al., 2001). Apos sequenciamento das amostras provenientes da necropsia das aves encontradas mortas, comprovou-se que o vírus causador da epidemia era o *West Nile Virus* (WNV) (LANCIOTTI et al., 1999).

O WNV foi identificado como causador de doenças humanas na África, no distrito de West Nile, em Uganda, em 1937. Foi identificado em aves (corvos e columbiformes) na região delta do Nilo em 1953. Antes de 1997, o WNV ainda não era considerado patogênico para aves, até que uma linhagem mais patogênica apareceu em Israel, que causou mortalidade em aves, que apresentaram sinais de encefalite e paralisia (WHO, 2011).

Na epidemia de Nova Iorque, todos os infectados apresentaram quadros de encefalite. Na investigação epidemiológica realizada, constatou-se que todos os pacientes, rotineiramente, saíam de casa no fim de tarde para realizar atividades no jardim. Uma investigação ambiental revelou a presença de criadouros com fases larvárias do mosquito *Culex* nos jardins das casas dos pacientes e também de vizinhos (NASH et al., 2001).

O WNV está mais frequentemente associado com mosquitos ornitofílicos do gênero Culex, que amplificam o vírus e transmitem-no à aves residentes e migratórias (GOULD e HIGGS, 2009). De setembro a outubro de 1999, na epidemia de Nova Iorque, o vírus foi isolado de nove pools de mosquitos, todos do gênero Culex, alem de evidências desta infecção terem

sido detectadas em aves silvestres mortas e vivas (KULASEKERA et al., 2001).

Grandes epidemias ocorreram na Grécia, Israel, Romênia, Rússia e EUA, todos locais de rotas migratórias de aves. O WNV estabeleceu-se na África, Europa, Oriente Médio, oeste da Ásia e Austrália (WHO, 2011). Desde sua introdução em Nova Iorque, em 1999, o vírus disseminou-se amplamente, tendo sido constatado em Montana (KALBFLEISCH, 2011), Virgínia (JOYNER et al., 2006), com confirmação da infecção por técnicas moleculares, California (REISEN et al., 2004) e outros estados norte-americanos. A maioria dos estudos constatou a circulação do vírus realizando técnicas sorológicas em aves e mamíferos e também pelo teste de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) realizado em amostras provenientes de doadores de sangue, que detecta o RNA viral. Esta técnica surgiu em 2002, com a possibilidade de transmissão do vírus por transfusão de sangue, o que demonstrou ser uma ferramenta importante em saúde pública (BUSCH et al., 2006).

Na Europa, o vírus foi detectado em vários países, como Portugal, em 2006 (FORMOSINHO et al., 2006), com soropositividade em aves e equinos, e em 2007, na Alemanha (LINKE et al., 2007), com sorologia positiva apresentada em aves silvestres capturadas.

A circulação do WNV na América do Sul não havia sido descrita até 2005, quando MORALES et al. (2006) reportou soropositividade em 4,8% dos equídeos colombianos avaliados e, de 2004 a 2006 a detecção de aves e equinos soropositivos residentes na Venezuela por BOSCH et al. (2007) sugere a circulação do vírus na América do Sul.

DIAZ et al. (2008a) realizaram estudo sorológico em aves no ano de 2005, em Córdoba, no México, os quais constataram soropositividade para WNV em várias famílias de aves. Um ano mais tarde, MORALES et al. (2006) isolaram o vírus de cérebros de equinos que foram a óbito por encefalite em San Antonio de Areco, cidade próxima de Buenos Aires. Na província de Santa Fé, uma prevalência de 16,2% foi encontrada em equinos para o WNV (TAURO et al., 2012).

No Brasil, a primeira evidência do WNV foi detectada por PAUVOLID-CORRÊA et al. (2011), os quais constataram sorologia positiva em equinos do Pantanal, Brasil. De 168 cavalos testados, cinco foram soropositivos para o WNV. O Pantanal brasileiro foi escolhido neste estudo por ser uma área de movimentação de aves migratórias e por ter tido evidências da circulação de outros arbovírus, em um estudo liderado por IVERSSON et al. (1993). A detecção do vírus não foi possível, mas os resultados deste estudo sugerem que o WNV iniciou sua circulação em território brasileiro.

A maioria dos estudos que buscam evidências da circulação do WNV também realizam testes para o SLEV, pois os dois vírus apresentam reação cruzada no teste de neutralização.

O conjunto de determinados fatores como: presença de aves migratórias; alta densidade populacional equina; e condições ambientais e climáticas favoráveis à proliferação dos artrópodes, podem resultar em epidemias de encefalomielite por WNV no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA e VARELLA, 2008).

1.5 AVES SILVESTRES E FLAVIVIRUS

Todas as aves realizam algum tipo de deslocamento, seja por longas ou curtas distâncias. Até as aves mais sedentárias movem-se, muitas vezes, cerca de 50 a 100km, identificando o movimento e a migração das aves como um fenômeno importante (HUBÁLEK, 2004).

A migração é um fenômeno que ocorre em muitas espécies de aves que, com a aproximação do outono, deixam suas frias áreas de reprodução em busca de locais com temperaturas mais amenas e com maior disponibilidade de alimento (áreas de invernada), para depois retornarem às

suas áreas de origem durante a primavera e verão, completando assim seu ciclo biológico (NUNES et al., 2006).

As migrações podem ser intercontinentais ou num mesmo continente (SICK, 1983). Além da migração, as aves realizam outros movimentos, como a) movimentos rotineiros diários, no qual se deslocam diariamente em áreas próximas aos sítios de alimentação e nidificação; b) deslocamentos de dispersão, realizados pelas aves jovens à procura de novos territórios, que pode ser em áreas próximas ao local de nascimento ou a quilômetros de distância; c) os deslocamentos dispersivos, que envolvem movimentos pós-reprodutivos em todas as direções, não havendo um retorno em direção ao ponto inicial; d) a irrupção ou invasão, que ocorrem em associação com a oferta de alimento, e por fim, e) nomadismo, que ocorre em áreas onde o alimento é temporariamente abundante, e as aves, por vezes se reproduzem nessas áreas (NEWTON, 2010).

Os habitats selecionados pelas aves migratórias ao longo de suas rotas são relacionados aos seus hábitos alimentares, disponibilidade de recursos e táticas de forrageamento. As espécies migrantes geralmente se concentram em áreas específicas, de importância fundamental para conservação dessas espécies, uma vez que, ao realizarem grandes migrações, elas necessitam de locais para trocarem as penas, alimentarem-se e adquirir energia necessária para a continuação das longas viagens (NUNES et al., 2006).

As aves utilizam a gordura armazenada como energia para migrações de longas distâncias; viajam à noite, quando o ar é mais frio e a atmosfera é mais calma. Param por dias nas chamadas “*staging areas*”, onde as mesmas descansam e repõem as energias, além de encontrarem outras espécies de aves. Esse fator é importante quando pensamos na transmissão das doenças infecciosas, principalmente as veiculadas por aves migratórias (REED et al., 2003).

Cerca de aproximadamente cinco bilhões de aves, representantes de mais de 300 espécies, migram da América do Norte para as Américas Central e do Sul (figura 9) (REED et al., 2003). Segundo o Inventariamento

de Fauna do Município de São Paulo (SÃO PAULO, 2010), constatou-se que, na cidade há chegada de 35 espécies de aves migratórias, que vêm tanto do Hemisfério Sul, durante o inverno austral, quanto do Hemisfério Norte, durante o inverno boreal. A extensão das migrações é variável e característica para cada espécie; enquanto algumas desviam apenas um pouco, outras atravessam todo o continente (SICK, 1983).

Dentre as migrantes listadas no município de São Paulo, três espécies são provenientes do Hemisfério Norte, que partem dos EUA e Canadá em agosto e setembro e retornam em abril e maio: águia-pescadora (*Pandion haliaetus*), falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) e maçarico-de-perna-amarela (*Tringa flavipes*) (CBRO, 2010). A espécie *Vireo olivaceus* (juruviara), é considerada como espécie residente segundo CBRO (2010), ou seja, sem características migratórias para o Brasil. Porém, segundo SICK (1983), a espécie *Vireo olivaceus chivi*, sedentária em grandes regiões da América do Sul, recebe, no norte do continente, a visita de *Vireo olivaceus olivaceus*, oriundo do Hemisfério Norte.

O falcão-peregrino detém-se anualmente, de outubro a abril, no Rio de Janeiro, onde pôde ser observado frequentemente nos últimos 25 anos (figura 10). Evidenciou-se, em 1968, que esta espécie não é proveniente dos Estados Unidos (EUA), e sim da tundra do alto norte, que domina praticamente todo o topo da América do Norte, Europa e Ásia. A águia-pescadora ocorre regularmente na América do Sul, onde comparece tanto nos lagos e na zona costeira, como também no interior do continente (Rio Xingu) (figura 11) (SICK, 1983).

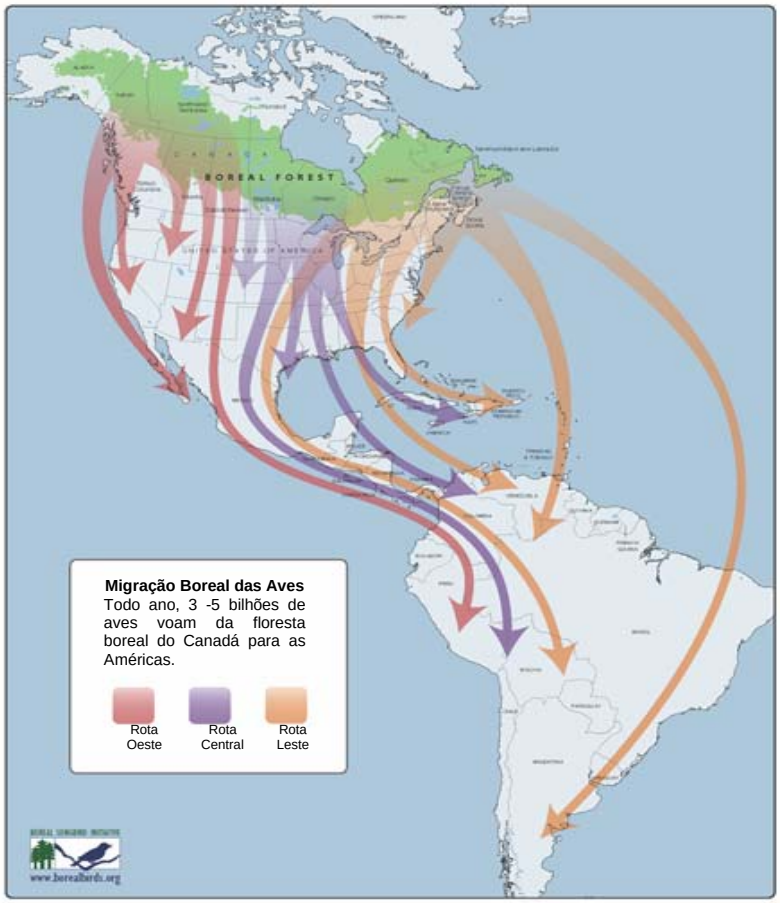


Figura 9 Principais rotas migratórias utilizadas por aves migratórias oriundas do Hemisfério Norte.
Fonte: www.borealbirds.org

As aves podem disseminar muitos patógenos, podendo utilizar-se de três mecanismos para realizar esta ação: a) biológicos, quando o patógeno multiplica-se no organismo da ave, podendo causar infecções agudas, crônicas ou assintomáticas; b) mecânicos, quando não há replicação do patógeno no organismo da ave; c) carreadoras de ectoparasitas hematófagos que, muitas vezes, agem como vetores de doenças importantes (HUBÁLEK, 2004).

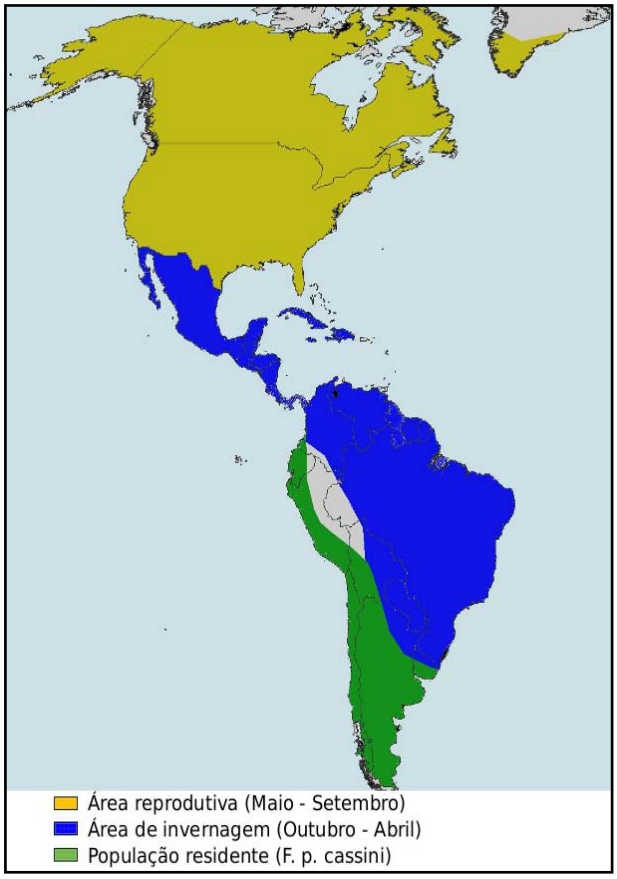


Figura 10 Rota de migração de *Falco peregrinus*
Fonte: www.avesderapina.com.br

Figura 11 Rota de migração de *Pandion haliaetus*.
Fonte: CORNELL UNIVERSITY, s/d.

No caso de alguns *Flavivirus*, como WNV e SLEV, o principal reservatório são as aves migratórias (HUBÁLEK, 2004; PETERSON et al., 2004), que dispersam o vírus utilizando-se do mecanismo biológico (HUBÁLEK, 2004). O WNV, principalmente em relação à linhagem encontrada na epidemia de Nova Iorque ocorrida em 1999 (LANCIOTTI et al., 1999), está relacionado à extensa mortalidade de aves, o que já não ocorre em infecções pelo SLEV. Porém, no caso do WNV, alguns indivíduos não apresentam sintomatologia e sobrevivem à infecção, apresentando níveis detectáveis de anticorpos anti-WNV (PETERSON et al., 2004), o que também pode significar infecções prévias por outros membros da família *Flaviviridae* (MALE, 2003).

As aves picadas por mosquitos infectados pelo WNV também tornam-se infectadas e com potencial para transmitir o vírus. Os passeriformes aparentam ser as aves mais competentes na transmissão do WNV pois atingem altos picos de viremia, num periodo de aproximadamente 7 dias (figura 12) (KOMAR et al., 2003; KILLPATRICK et al., 2007).

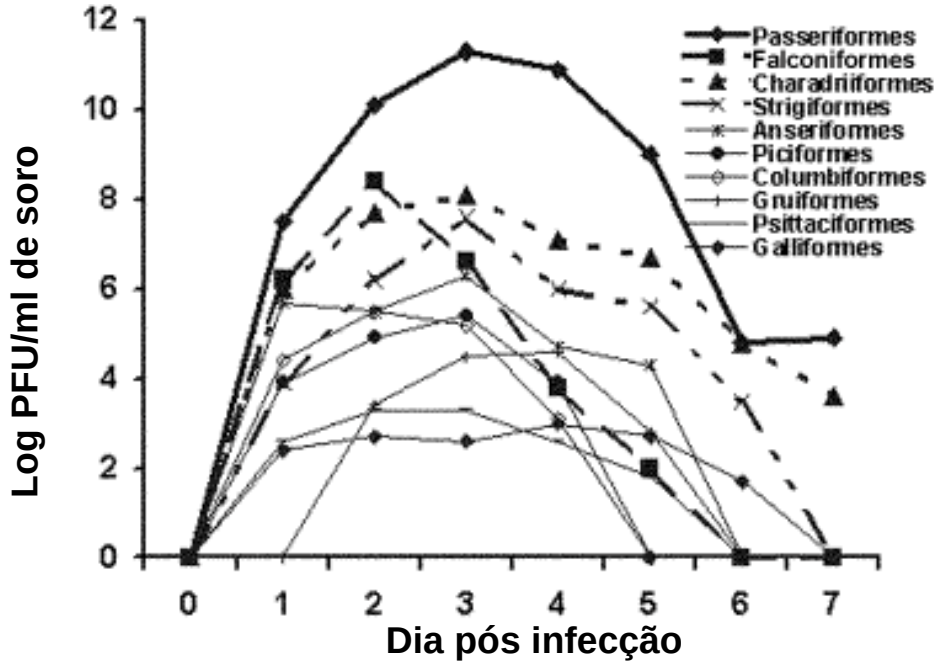


Figura 12 Níveis e período de viremia nas diferentes ordens de aves amostradas.
Fonte: KOMAR et al., 2003.

Considerando o curto período virêmico, ainda não é possível afirmar que as aves migratórias carreiam o vírus durante toda a sua rota de migração. Para determinar se este fator é possível, é necessário monitorar uma ave sabidamente virêmica durante todo o seu percurso migratório (KILLPATRICK et al., 2007).

Apesar dos mosquitos serem considerados os principais vetores, outros artrópodes já foram descritos como transmissores de alguns *Flavivirus*. O WNV já foi isolado de carrapatos do gênero *Amblyomma*, capturados alimentando-se em algumas aves, e outros indivíduos

demonstraram ser capazes de transmissão, como os carrapatos dos gêneros *Argas, Ornithodoros* e *Dermacenter* (ANDERSON *et al*., 2003).

A transmissão do vírus sem a participação de um vetor já foi documentada entre as aves. KOMAR *et al.* (2003) relatou a infecção por via oral, salientando a importância de espécies que alimentam-se de animais mortos ou doentes que podem portar o vírus. Já BANET-NOACH *et al.* (2003) detectaram, em condições experimentais, a transmissão direta do vírus entre indivíduos da mesma espécie, neste caso, os gansos, sugerindo a produção de aerossóis pelos animais infectados.

No Brasil, existem propostas para o monitoramento da emergência do WNV, sugerindo-se a vigilância em aves silvestres migratórias e residentes em áreas ao longo das rotas migratórias (LUNA, et al., 2003). Em 2004, em Galinhos/RN, foram coletadas amostras de sangue de aves residentes e migratórias capturadas em redes ornitológicas, que foram testadas para o WNV; porém, nenhuma amostra apresentou-se positiva ao teste da inibição da hemaglutinação (BRASIL, 2004).

Diante do exposto, justifica-se a realização de pesquisa de infecções por *Flavivirus* nas aves presentes nos Parques Municipais de São Paulo, dada a importância das doenças causadas por estes vírus, que podem afetar a população de aves silvestres e domésticas presentes nestas áreas, ressaltando o risco de transmissão destes agentes à população humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar infecção por *Flavivirus* em aves silvestres residentes e migratórias provenientes de áreas verdes do Município de São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar presença de *Flavivirus* ainda não conhecido ou pouco comum causando infecção em aves.
2. Conhecer a diversidade genética de *Flavivirus* encontrados em aves.

3 MÉTODOS

A pesquisa contemplou a coleta de amostras de aves silvestres residentes e migratórias capturadas em duas áreas verdes de soltura e monitoramento de animais silvestres no município de São Paulo, segundo autorização emitida pela Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente (SVMA/PMSP) pelo processo nº 2013-0.127.624-0. Segundo SÃO PAULO (2010a), em ambas as áreas há chegada de aves migratórias oriundas do Hemisfério Norte.

O material foi coletado por equipe da Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna (DEPAVE-3), do Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE), da Secretaria do Verde e do Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de São Paulo (SVMA/PMSP) e enviado ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT/USP). Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP, sob o processo número 2010/51230-8.

3.1 DESCRIÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Foram escolhidas duas áreas verdes municipais para captura das aves silvestres, demonstradas na figura 13: o Parque Anhanguera, localizado no Distrito de Perus, zona oeste do Município (Coordenadas: UTM Córrego Alegre - 23 S X-317.106 Y-7.409.705), e a Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia, localizada no Distrito do Grajaú, Península do Bororé, zona sul da cidade (Coordenadas: UTM Córrego Alegre - 23S X-331.691 Y-7.365.989).

3.1.1 Parque Anhanguera

O Parque Anhanguera, localizado à Avenida Fortunato Tadiello Natucci, 1000, Distrito de Perus, possui uma área de 9.500.000 m^2 (figura 14). É um remanescente do Sítio Santa Fé, antiga fazenda de reflorestamento, sendo o maior parque municipal de São Paulo (SÃO PAULO, 2012).

Apresenta vegetação composta predominantemente por eucaliptal, com subbosque com espécies nativas como o camboatá e o tapiá-guaçu. Pode-se observar remanescentes da Mata Atlântica, como jerivá, paineira e tipuana ao longo de cursos d'água, campos secos, brejos, orquidário e áreas ajardinadas (SÃO PAULO, 2012).

Figura 13 Localização das áreas escolhidas no estudo (em rosa: Parque Anhanguera e Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia; em preto: demais áreas verdes do município de São Paulo).
Fonte: SÃO PAULO, 2010a (com modificações).

Possui elevada riqueza de fauna (SÃO PAULO, 2012), com cerca de 224 espécies registradas, sendo 146 de aves (SÃO PAULO, 2010a). Dentre as aves endêmicas de Mata Atlântica ocorrem papa-taoca-do-sul, arapaçu-rajado, tangará e sanhaçu-de-encontro-amarelo. Há o registro de mais de 15 espécies de anfíbios anuros, como o sapo-martelo e a perereca-cabrinha. Serpentes, cágado-pescoço-de-cobra e lagarto-teiú estão entre os répteis observados. Mais de vinte espécies de mamíferos foram assinaladas, incluindo morcegos, furão, quati, veado-catingueiro, capivara, tatus, preá, tapiti, cuícas e caxinguelês. Recentemente foram registradas a jaguatirica e a suçuarana, espécies ameaçadas de extinção, além do cachorro-do-mato (SÃO PAULO, 2012).

Neste parque, localiza-se o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS), pertencente à Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3), cuja principal função é a reabilitação dos animais silvestres atendidos na sede do Parque Ibirapuera e posterior soltura em suas áreas de ocorrência.

Figura 14 Foto aérea do Parque Anhanguera (A – entrada do Parque; B – entrada do CRAS; verde – pico do Jaraguá).
Fonte: GOOGLE EARTH.

3.1.2 Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia

A APA Municipal Bororé-Colônia foi criada pela Lei nº 14.162, de 24 de maio de 2006 (PMSP, s/d a) e, com uma área de 9000ha (90 km2) (SÃO PAULO, 2010b), tem como objetivo promover a proteção da diversidade biológica, dos recursos hídricos e do patrimônio histórico da região (PMSP, s/d a), alem de manter o caráter rural e a qualidade ambiental do local, através de projetos de manejo florestal sustentável, agricultura orgânica e educação ambiental com envolvimento da comunidade (SÃO PAULO, 2010b).

Localiza-se no sul do município de São Paulo, distando cerca de 25 Km do centro de SP. A APA possui inúmeras nascentes, córregos e ribeirões que drenam para as Bacias Guarapiranga e Billings, ambas pertencentes à Bacia do Alto Tietê, contribuindo de forma essencial com a formação dos mananciais e recursos hídricos que abastecem cerca de 30% da região metropolitana de São Paulo estando também inserida na Área de Proteção e Recuperação de Mananciais da Bacia Hidrográfica do Reservatório Billings - APRM-B (PMSP, s/d a). Como destaque, abriga a Ilha do Bororé (palavra tupi-guarani usada para denominar o veneno que os índios usavam na ponta das flechas para anestesiar a caça) e monumentos histórico provenientes da colonização alemã no século XIX (SÃO PAULO, 2010b).

A APA Bororé Colônia, em sua extensão, possui algumas propriedades particulares, sendo uma delas a Fazenda Castanheiras, área contemplada pelo Inventariamento de Fauna do Município de São Paulo (SÃO PAULO, 2010a). Com o registro de 237 espécies de animais, dentre elas 191 aves, é notoria a alta relevância ecológica da região, sendo uma das últimas grandes áreas verdes da cidade de São Paulo; porém, encontra-se bastante ameaçada pelo processo de crescimento desordenado da metrópole, o que faz com que a proteção da região seja extremamente importante no sentido

de garantir a preservação desses importantes recursos naturais (PMSP, s/d a).

3.2 CAPTURA DAS AVES

A equipe de Inventariamento de Fauna da Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3) já realiza monitoramento das aves nestes locais, realizando captura das mesmas em parques municipais, mediante autorização nº 1267/8 emitida pelo Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres (SNA), do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), do Ministério do Meio Ambiente (MMA), expedida com base na IN-IBAMA 27/2002 de 23/12/2002, dado o potencial de manutenção das espécies silvestres soltas no local e sua provável recaptura.

Esta Divisão, do Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE), da Secretaria do Verde e do Meio Ambiente (SVMA/PMSP), é o órgão municipal responsável pelo Manejo da Fauna Silvestre de parques e áreas verdes, a partir de atendimento veterinário, com suporte laboratorial, aos animais silvestres trazidos por munícipes, Corpo de Bombeiros, Polícia Ambiental, Ibama, Centro de Controle de Zoonoses, entre outros. Para tratamento, os animais recebem cuidados veterinários com acompanhamento clínico, cirúrgico, biológico e nutricional de acordo com as necessidades próprias de cada espécie (PMSP, s/d b).

Apos o tratamento e reabilitação os animais são destinados, conforme suas condições físicas e/ ou comportamentais, visando, primordialmente, a soltura em áreas definidas após processos de avaliação. Caso a soltura não seja possível, os animais são encaminhados para criadouros. Os animais

soltos, devidamente anilhados, são monitorados através de busca ativa (redes ornitológicas e avistamento e/ou escuta) e ou por monitoramento passivo, quando os mesmos retornam a Divisão.

Para cada local foi traçado um itinerário que engloba a maior diversidade de ambientes possíveis, considerando a cobertura vegetal, relevo e a presença de água (WILLIS e ONIKI, 1981). Foram realizadas incursões a campo com frequência mensal em cada uma das áreas verdes, sempre procurando percorrer o mesmo itinerário continuadamente, e/ou determinando pontos de parada com tempo pré-estabelecido. Os espécimes foram capturados com auxílio de seis redes ornitológicas (tipo *"mist-net"*) (figura 16) de malha 36mm para avifauna em cada local. As redes foram armadas em estações pré-estabelecidas de forma a abranger diferentes ambientes e área de transição. O tempo de permanência das redes em cada estação foi de 30 horas por mês, no período da manhã e/ou no entardecer.

No Parque Anhanguera, as redes foram colocadas em duas áreas diferentes: 1) próximo à Administração do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS/DEPAVE-3), junto aos recintos, com apenas uma rede colocada; e 2) próximo à área de mata, junto a um comedouro, com colocação de cinco redes ornitológicas (figura 16).

Na Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colônia, foram escolhidos dois locais, ambos próximos de comedouros artificiais para aves (figura 15).

A colocação das redes iniciou-se antes do nascer do sol, por volta das 5h30, para que já estivessem armadas ao amanhecer, período de maior movimentação das aves. A cada 30 minutos, as redes eram verificadas para a presença de aves presas em suas malhas e, caso positivo, o animal era retirado cuidadosamente e colocado em sacos de pano, para minimizar o stress (figura 17).

Figura 15 Redes ornitológicas tipo “mist-net”utilizadas na captura das aves – Fazenda Castanheiras/APA Bororé Colonia.
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 16 Redes colocadas na área 2 do Parque Anhanguera.
Fonte: Arquivo pessoal.

Foi realizada a biometria das aves capturadas pelos biólogos de DEPAVE-3 (figura 18), segundo os seguintes parâmetros: comprimento total

(CT), largura do tarso (LT), peso (P), comprimento do bico (CB) e largura do bico (LB). A maioria recebeu anilha CEMAVE (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres) em seu tarso: direito, se for fêmea, e esquerdo para os machos. Os dados foram anotados em planilha, como consta no Apêndice 1.

Figura 17 Sacos de pano utilizados para minimizar o stress dos animais e impedir a fuga.
Fonte: Arquivo pessoal.

Muitas aves foram soltas por técnicos de DEPAVE-3 nestas áreas, apos tratamento veterinário e estudo das áreas de soltura. As aves são liberadas após colocação de anilha do tipo PMSP (padrão da Prefeitura do Município de São Paulo), para que seja possível realizar o monitoramento pós soltura. Algumas aves capturadas neste estudo portavam esta anilha e, nestes casos, não foi colocada a anilha tipo CEMAVE.

3.3 COLETA DE MATERIAL OROFARÍNGEO E CLOACAL

Para a pesquisa de *Flavivirus* nos indivíduos capturados, material da cavidade oral e cloacal foi coletado por meio de *swabs* estéreis e descartáveis (figura 20). Após a coleta, os *swabs* foram colocados em criotubos devidamente identificados, contendo 300ul de Meio de Transporte Viral (albumina bovina 5% em PBS, solução penicilina/estreptomicina, glicerol e anfotericina B), que garante a integridade do material até seu processamento.

Para algumas aves, foi possível realizar coleta de sangue, a partir da veia ulnar dos animais. Foi necessária apenas uma gota de sangue, coletada com auxílio de um capilar, e seu conteúdo foi colocado em criotubo contendo o mesmo meio para realização de teste molecular.

Os tubos foram embalados em sacos plásticos, bem vedados com barbante, colocados imediatamente em nitrogênio líquido e transportados até o laboratório, onde foram armazenados em freezer -80°C até o processamento das amostras.

Nos casos de recaptura, as aves tiveram material coletado novamente.

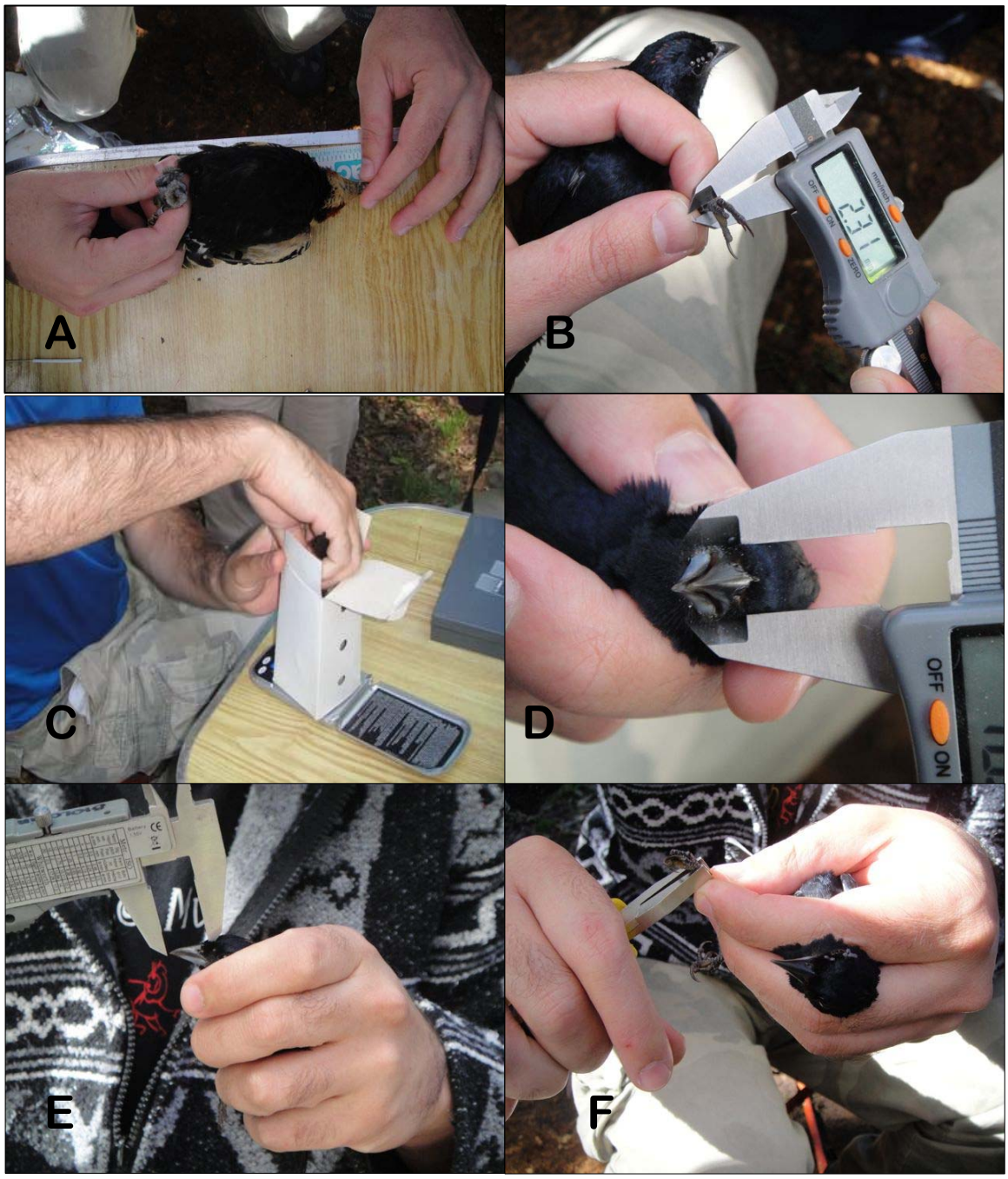


Figura 18 Biometria realizadas nas aves capturadas pelos biólogos de DEPAVE-3 (A: comprimento total; B: largura do tarso, C: pêso, D: largura do bico, E: comprimento do bico e F: anilhamento).
Fonte: Arquivo pessoal.

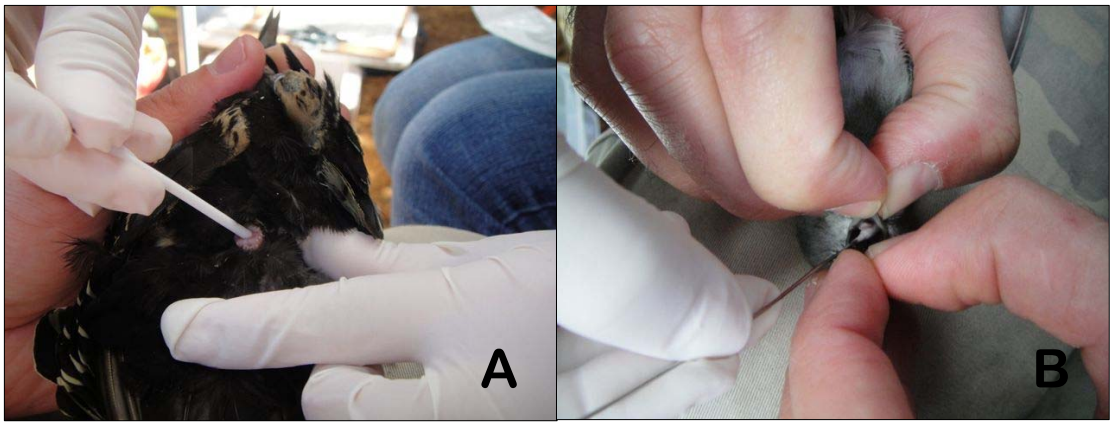


Figura 19 Realização de *swabs* nas aves capturadas (A: cloacal, B: oral).
Fonte: Arquivo pessoal.

3.4 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

A princípio, todas as amostras extraídas seriam submetidas à tratamento com DNAse (Turbo DNAse-free™ Ambyon®) para eliminar o DNA contaminante presente. O cDNA, obtido após a transcrição reversa, seria encaminhado para reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de fragmento de aproximadamente 629pb do gene mitocondrial *cyt b* de aves. A sequência de nucleotídeos do gene *cyt b* contém informações espécie-específicas e é usada em estudos filogenéticos (PARSON et al., 2000).

Iniciadores desenhados por CÍCERO e JOHNSON (2001) foram adotados, com algumas modificações. A sequência dos mesmos aparece no Quadro 2. Essa reação seria realizada para controle de todas as etapas descritas anteriormente, desde a coleta do material até a PCR, para garantir que os resultados negativos são verdadeiramente negativos, excluindo a

possibilidade de, por mal amazenamento da amostra, o material genético viral presente ter sido degradado, levando a um resultado falso negativo.

Esta técnica foi realizada com apenas algumas amostras. Quando visualizadas em gel de agarose a 1,5%, apenas arrastes eram identificados (figura 20). Mesmo alterando o tempo de ação da DNAse, o mesmo resultado era visualizado.

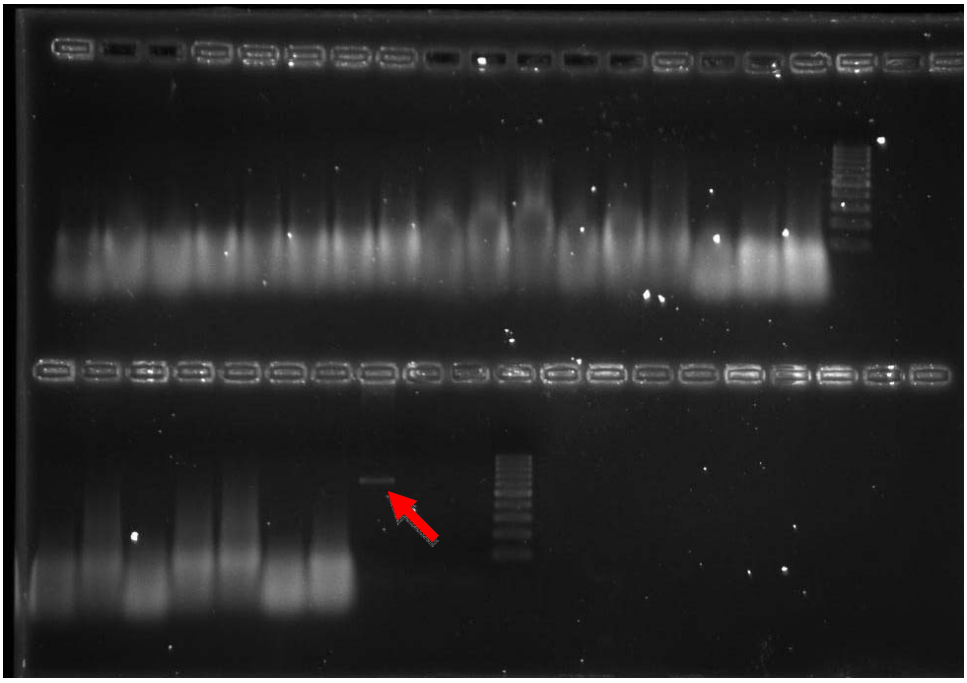


Figura 20 Amostras produto da reação de PCR convencional para o gene *cyt B* de aves. Apenas a banda do controle positivo é visualizada (seta).

Devido a estes resultados, 10 ul de sobrenadante de cultura do vírus da dengue tipo 2 foi adicionado a 75ul de duas amostras, logo apos a extração. Cada amostra foi dividida em duas alíquotas. A primeira foi submetida à tratamento com DNAse, com posterior transcrição. A segunda não foi tratada com DNAse, sendo submetida diretamente à transcrição reversa. Todas as alíquotas foram encaminhadas para reação de PCR em tempo real, que será explicada a seguir.

Foi constatado que nas amostras tratadas com DNAse não houve amplificação do material genético. O mesmo só foi amplificado nas alíquotas não tratadas pela enzima. Devido a este fato, comprovou-se qua a DNAse

degradou todo o material genético presente; por isso, nenhuma das amostras viáveis restantes recebeu tratamento por esta enzima.

Quadro 2 Iniciadores utilizados para detecção de DNA de Aves.

Reação	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento
PCR Aves	Aves F Aves R	CAAATATCNTTCTGAGGNGCYAC GGGTGTTCDACDGGTTGGCTNCC	629bp

3.5 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os ácidos nucléicos (DNA e RNA) das amostras de sangue e de swabs de orofaringe e cloaca, após descongelamento, foram extraídos pelo extrator NucliSENS®EasyMAG® Biomérieux, baseado na tecnologia de extração com sílica.

Primeiramente, as amostras são incubadas com tampão de lise para que haja liberação dos ácidos nucléicos. Ao final da incubação, a sílica magnética é adicionada com a função de capturar os ácidos nucléicos presentes. O dispositivo magnético do equipamento atrai a sílica, permitindo a purificação dos ácidos nucléicos por meio de múltiplas lavagens. Uma vez purificado, os ácidos nucléicos são liberados da sílica magnética por aquecimento. Ao final do processo, a sílica é separada do material eluído em tampão de eluição (figura 21).

As amostras de cloaca e orofaringe foram extraídas conforme o protocolo Generic 2.0.1. As amostras de sangue foram extraídas conforme o protocolo Specific B. Este último protocolo realiza mais lavagens que o primeiro.

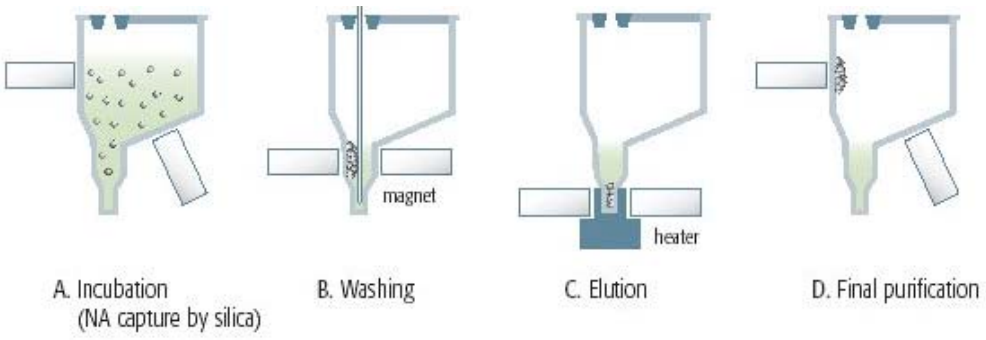


Figura 21 Método de extração pelo extrator NucliSENS®EasyMAG® Biomérieux.
Fonte: BIOMÉRIEUX, s/d.

3.6 TRANSCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra extraída foi dividida em duas alíquotas de 14ul; à primeira, adicionou-se 2ul de RNA extraído de sobrenadante de cultura do vírus da Dengue tipo 2 em concentração 1:500. A segunda manteve-se intacta. Esta etapa foi realizada com o intuito de verificar a existência de inibidores na amostra, que impossibilitasse a transcrição do RNA viral. A amostra na qual foi adicionado o vírus da dengue será indicada pelo termo alíquota correspondente.

Todas as alíquotas, após a extração, foram submetidas à transcrição reversa, com o auxílio do kit SuperScript® VILO™, composto pela enzima Transcriptase Reversa SuperScript® III e pelo mix de reação VILO™, composto de primers, $MgCl_2$ e dNTPs. A enzima tem alta estabilidade térmica, podendo ser incubada de 42^o a 60^o C.

Foi realizada uma reação de volume final de 20ul, sendo 4ul de Mix de Reação VILO™, 2ul do mix da enzima Transcriptase Reversa SuperScript® III e 14ul da amostra extraída (ou amostra correspondente). A incubação foi feita a 25^o C por 10 minutos, 42^o C por 120 minutos e 85^o C por 5 minutos.

3.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) E REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR

O cDNA, obtido após a transcrição reversa, foi encaminhado para PCR em tempo real para pesquisa de *Flavivirus*. Tal reação amplifica fragmento de 200pb do gene *NS5* de *Flavivirus* e foi realizada segundo JOHNSON *et al*. (2010).

A sequência alvo foi amplificada numa reação com volume final de 25 µl, contendo 2,5µl de cDNA, 12,5µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1µl de cada iniciador (em concentração inicial de 10µM) e 8µl de H_2O DEPc. Os parâmetros para o termociclador (ABI Prism®7500 HT SDS, *Applied Biosystems*) foram: 95°C por 15min, 40 ciclos de 94°C por 30s/60°C por 1min e uma curva de dissociação ao final. Para análise da curva de *Melting*, utilizou-se comparação com os dados descritos por MOUREAU et al. (2007), apontados no quadro 3.

O RNA extraído de cultura do vírus da dengue tipos 2, 3 e 4 foram utilizados como controle positivo para as reações de PCR, e uma amostra na qual colocou-se água no lugar de DNA foi utilizada como controle negativo.

As amostras positivas à reação de qPCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo, e visualizadas em luz ultravioleta, para confirmar os resultados. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificado foi determinado com auxílio de um marcador de 50pb (Invitrogen®) e, caso as bandas fossem observadas, as amostras foram submetidas à uma *semi-nested* PCR que amplifica fragmento de 200pb do gene NS5 de *Flavivírus*, para descartar a possibilidade de que o material amplificado correspondesse ao DNA do hospedeiro.

Quadro 3 Lista de referência dos Flavivirus transmitidos por mosquitos

Vírus	***Abreviação***	***Linhagem***	***Temperatura de Melting (Tm)***	**Número GenBank Ac**
Dengue tipo 1	DENV-1	CY436 DI 606	79,4	EU073979
Dengue tipo 1	DENV-1	Indonésia 1186 TVP 949	79,5 – 80,1	EU074031
Dengue tipo 2	DENV-2	Central Java JKT 85-544	80,8 – 81,1	EU074032
Dengue tipo 2	DENV-2	H/IMTSSA-MART/98 703	81,4	EU073980
Dengue tipo 2	DENV-2	Papete 341.175 17/12/96	80,1 – 80,5	EU074033
Dengue tipo 2	DENV-2	Trinidad 1751	80,8 – 81,1	EU073981
Dengue tipo 3	DENV-3	H87 prototype	81,4 – 81,7	EU073982
Dengue tipo 4	DENV-4	Dak HD 34 460	81,4 – 81,7	EU073983
Dengue tipo 4	DENV-4	BeH403714	81,5 – 81,7	EU073984
Febre Amarela	YFV	17D vacinal	81,8	EU074025
Bussuquara	BSQV	Be An 4073	81,7	EU073977
Iguape	IGUV	SP An 71686	83,5	EU074054
Naranjal	NJLV	25008	81,5	EU074003
Cacipacoré	CPCV	Be An 327600	82,2	EU073978
Encefalite Japonesa	JEV	SA-14	81,7	EU073992
Encefalite de Saint Louis	SLEV	MSI-7	81,5	EU074012
West Nile Vírus	WNV	NY 385-99	82,8 – 83,1	EU074024
West Nile Vírus	WNV	An B 3573/82	82,4 – 82,8	EU074034
West Nile Vírus	WNV	PaAn 001	82,5	EU074023
Ilhéus	ILHV	PE 20545	81,2	EU073990
Rocio	ROCV	SPH 34675	81,5	EU074009

Fonte: MOUREAU et al., 2007 (com modificações).

Para a primeira reação, segundo MOUREAU (2007), a sequência alvo foi amplificada numa reação de volume final de 25ul, contendo 2,5ul de cDNA, 16,2ul de H_2O de injeção, 2,5ul de PCR Buffer, 1,5ul de MgCl 50mM, 0,5ul de dNTP 10mM, 0,75ul de cada iniciador a 10uM e 0,3ul de Taq Platinum 5U/ul (Invitrogen®). Os parâmetros para o termociclador foram: 95^{o}C por 10 minutos, 40 ciclos de 94^{o}C por 30s/50^{o}C por 30s/72^{o}C por 45s e 72^{o}C por 10 minutos.

O produto desta reação foi submetido a uma segunda reação de PCR conforme COOK et al. (2009), tanto puro quanto nas diluições 1:10 e 1:100, em água de injeção. A reação tem volume final de 25ul, contendo 2,5ul de cDNA, 16,95ul de H_2O para injeção, 2,5ul de PCR Buffer, 0,75ul de MgCl 50mM, 0,5ul de dNTP 10mM, 0,75ul de cada iniciador a 10uM e 0,3ul de *Taq Platinum* 5U/ul (Invitrogen®). Os parâmetros para o termociclador foram: 94^{o}C por 2 minutos, 30 ciclos de 94^{o}C por 30s/50^{o}C por 45s/72^{o}C por 1 minuto e 72^{o}C por 10 minutos. As sequências dos iniciadores encontram-se no quadro 4.

Quadro 4 Iniciadores utilizados para detecção de RNA de *Flavivirus.*

Reação	**Iniciador**	**Sequência (5' – 3')**	**Tamanho do fragmento**
PCR em tempo real *Flavivirus (*JOHNSON et al., 2010)	Flavi-For Flavi-Rev	GCMATHTGGTWCATGTGG GTRTCCCAKCCDGCNGTRTC	200pb
Nested PCR para *Flavivirus* -1^a Reação (MOUREAU et al., 2007)	PF1S (For) PF2R-bis (Rev)	TGYRTBTAYAACATGATGG GTGTCCCAICCNGCNGTRTC	272pb
Nested PCR para *Flavivirus* - 2^a Reação (COOK et al., 2009)	PF3S (For) PF2R-bis (Rev)	ATHTGGTWYATGTGGYTDGG GTGTCCCAICCNGCNGTRTC	200pb

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2,5% e visualizadas à luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo para visualização das bandas esperadas. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificado foi determinado com auxílio do marcador de 50pb (Invitrogen®).

3.8 PURIFICAÇÃO DO MATERIAL AMPLIFICADO

Caso as bandas esperadas fossem visualizadas à reação de semi-nested PCR, as amostras foram purificadas com auxílio do kit Invisorb® Fragment CleanUp®, segundo o protocolo de purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose. Na sequência, foi realizada a semiquantificação do produto de PCR purificado em gel de agarose 1,5%, utilizando como marcador o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®). A intensidade da banda apresentada pela amostra indicou a quantidade de DNA purificado a ser adicionado na reação de Seqüenciamento.

Caso houvesse aparecimento da banda alvo em baixa concentração, ou juntamente com bandas inespecíficas, o material seria purificado a partir do produto da qPCR, com auxílio do kit QiAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®). A purificação elimina primers, nucleotídeos, enzimas, sais, agarose, brometo de etídeo e outras impurezas das amostras de DNA.

3.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Apos purificação, as amostras foram encaminhadas para a reação de Seqüenciamento, com auxílio do kit *BigDye Terminator ready reaction*. Esta reação tem 20ul de volume final, contendo: 8ul de Mix *Big Dye*, 5ul de cDNA, 5,9ul de H2O e 1,1ul dos iniciadores utilizados na reação segundo COOK et al. (2009), em concentração de 3,2pmol. Os parâmetros para o termociclador foram 96^{o} C por 1 minuto, 25 ciclos de 96^{o}C por 10s/50^{o}C por 5min/60^{o}C por 4 min.

O mix Big Dye contem dNTPs, ddNTPs, Amplitaq DNA polimerase, MgCl2 e tampão Tris-HCl. As ddNTPs carreiam cores diferentes de corantes

(*dye*). O corante utilizado no BigDye é a diclororodamida (dRhodamida), que produz sinal mais claro à reação.

Após precipitação com isopropanol 75%, as amostras foram encaminhadas para o sequenciador automático da *Applied Biosystems* para obtenção das sequências e posteriormente analisadas para a definição da espécie viral através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool, do site NCBI) e do programa BioEdit (HALL, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 AVES CAPTURADAS

De março de 2012 a janeiro de 2013, foram capturadas 231 aves silvestres, pertencentes a quatro Ordens e 14 Famílias, sendo 111 no Parque Anhanguera, e 120 na Fazenda Castanheiras (tabela 1). Algumas espécies estão ilustradas na figura 22.

Tabela 1 Relação das aves capturadas em redes de neblina no Parque Anhanguera e na Fazenda Castanheiras, São Paulo, no período de junho de 2012 a Janeiro de 2013 [a].

Nome Científico	Nome Popular	Local de Captura				Total	
		Pq. Anhanguera		Fazenda Castanheiras			
		n	%	n	%	n	%
Attila rufus (Vieillot, 1819)	capitão-de-saíra	-	-	2	100,0	2	100,0
Basileuterus culicivorus (Deppe, 1830)	pula-pula	5	62,5	3	37,5	8	100,0
Celeus flavescens (Gmelin, 1788)	pica-pau-joão-velho	3	11,5	23	88,5	26	100,0
Chiroxiphia caudata (Shaw & Nodder, 1793)	tangará	-	-	1	100,0	1	100,0
Coereba flaveola (Linnaeus, 1758)	cambacica	7	100,0	-	-	7	100,0
Columbina talpacoti (Temminck, 1811)	rolinha-roxa	-	-	3	100,0	3	100,0
Conopophaga lineata (Wied, 1831)	chupa-dente	1	100,0	-	-	1	100,0
Cyclarhis gujanensis (Gmelin, 1789)	pitiguari	3	60,0	2	40,0	5	100,0
Dacnis cayana (Linnaeus, 1766)	saí-azul	-	-	4	100,0	4	100,0
Discosura longicaudus (Gmelin, 1788)	bandeirinha	1	100,0	-	-	1	100,0
Lanio melanops (Vieillot, 1818)	tiê-de-topete	1	6,2	15	93,8	16	100,0
Lathrotriccus euleri (Cabanis, 1868)	enferrujado	-	-	1	100,0	1	100,0

continua

continuação

Leptopogon amaurocephalus Tschudi, 1846	cabeçudo	1	20,0	4	80,0	5	100,0
Leptotila rufaxilla (Richard & Bernard, 1792)	juriti-gemedeira	-	-	3	100,0	3	100,0
Leptotila verreauxi Bonaparte, 1855	juriti-pupu	-	-	1	100,0	1	100,0
Melanerpes candidus (Otto, 1796)	pica-pau-branco	-	-	1	100,0	1	100,0
Mionectes rufiventris Cabanis, 1846	abre-asa-de-cabeça-cinza	-	-	1	100,0	1	100,0
Pachyramphus castaneus (Jardine & Selby, 1827)	caneleiro	-	-	1	100,0	1	100,0
Phaethornis eurynome (Lesson, 1832)	rabo-branco-de-garganta-rajada	1	100,0	-	-	1	100,0
Pipraeidea melanonota (Vieillot, 1819)	saíra-viúva	2	100,0	-	-	2	100,0
Pitangus sulphuratus (Linnaeus, 1766)	bem-te-vi	-	-	3	100,0	3	100,0
Platyrinchus mystaceus Vieillot, 1818	patinho	1	100,0	-	-	1	100,0
Ramphastus dicolorus Linnaeus, 1766)	tucano-de-bico-verde	-	-	2	100,0	2	100,0
Synallaxis ruficapilla Vieillot, 1819	pichororé	2	66,7	1	33,3	3	100,0
Synallaxis spixi Sclater, 1856	ié - teneném	-	-	1	100,0	1	100,0
Tachyphonus coronatus (Vieillot, 1822)	ié-preto	29	72,5	11	27,5	40	100,0
Tangara cayana (Linnaeus, 1766)	saíra-amarela	3	100,0	-	-	3	100,0
Tangara ornata (Sparrman, 1789)	sanhaçu-do-encontro-amarelo	3	60,0	2	40,0	5	100,0
Tangara sayaca (Linnaeus, 1766)	sanhaçu-cinzento	18	60,0	12	40,0	30	100,0
Thamnophilus caerulescens Vieillot, 1816	choca-da-mata	2	100,0	-	-	2	100,0
Tolmomyias sulphurescens (Spix, 1825)	bico-chato-de-orelha-preta	-	-	1	100,0	1	100,0
Troglodytes musculus Naumann, 1823	corruíra	2	100,0	-	-	2	100,0
Turdus albicollis Vieillot, 1818	sabiá-coleira	2	40,0	3	60,0	5	100,0

continua

continuação

Turdus leucomelas Vieillot, 1818	sabiá-barranco	4	44,4	5	55,6	9	100,0
Turdus rufiventris Vieillot, 1818	sabiá-laranjeira	8	47,1	9	52,9	17	100,0
Vireo olivaceus (Linnaeus, 1766)	juruviara	3	75,0	1	25,0	4	100,0
Xiphorhynchus fuscus (Vieillot, 1818)	arapaçu-rajado	-	-	1	100,0	1	100,0
Zonotrichia capensis (Statius Muller, 1776)	tico-tico	9	75,0	3	25,0	12	100,0
TOTAL		**111**	**48,0**	**120**	**52,0**	**231**	**100,0**

a) Nomenclatura segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2010).

A maioria das aves capturadas pertence à Ordem Passeriformes (84%), seguida das Ordens Piciformes (12,6%), Columbiformes (3%) e Apodiformes (0,4%).

De todas as espécies amostradas, apenas uma possui características migratórias (*Vireo olivaceus*), sendo as outras consideradas residentes e/ou endêmicas para a região.

Do total de aves capturadas, 196 (84,8%) foram capturadas pela primeira vez, e 35 (15,2%) foram recuperadas em meses posteriores (12 exemplares foram recapturados uma vez, 7 exemplares foram recapturados duas vezes, e 3 exemplares foram recapturados três vezes) sendo sete exemplares de tiê-preto, dois exemplares de sabiá-laranjeira, cinco exemplares de pica-pau-joão-velho, cinco exemplares de tiê-de-topete, dois exemplares de pula-pula e um exemplar de sanhaçu-cinzento. Considera-se recuperada a ave que foi capturada por mais de uma vez em meses diferentes.

Segundo a idade estimada dos animais, pôde-se determinar que 209 (90,5%) eram adultas e 18 (7,8%) eram jovens. Não foi possível determinar a idade das aves em 4 (1,7%) exemplares.

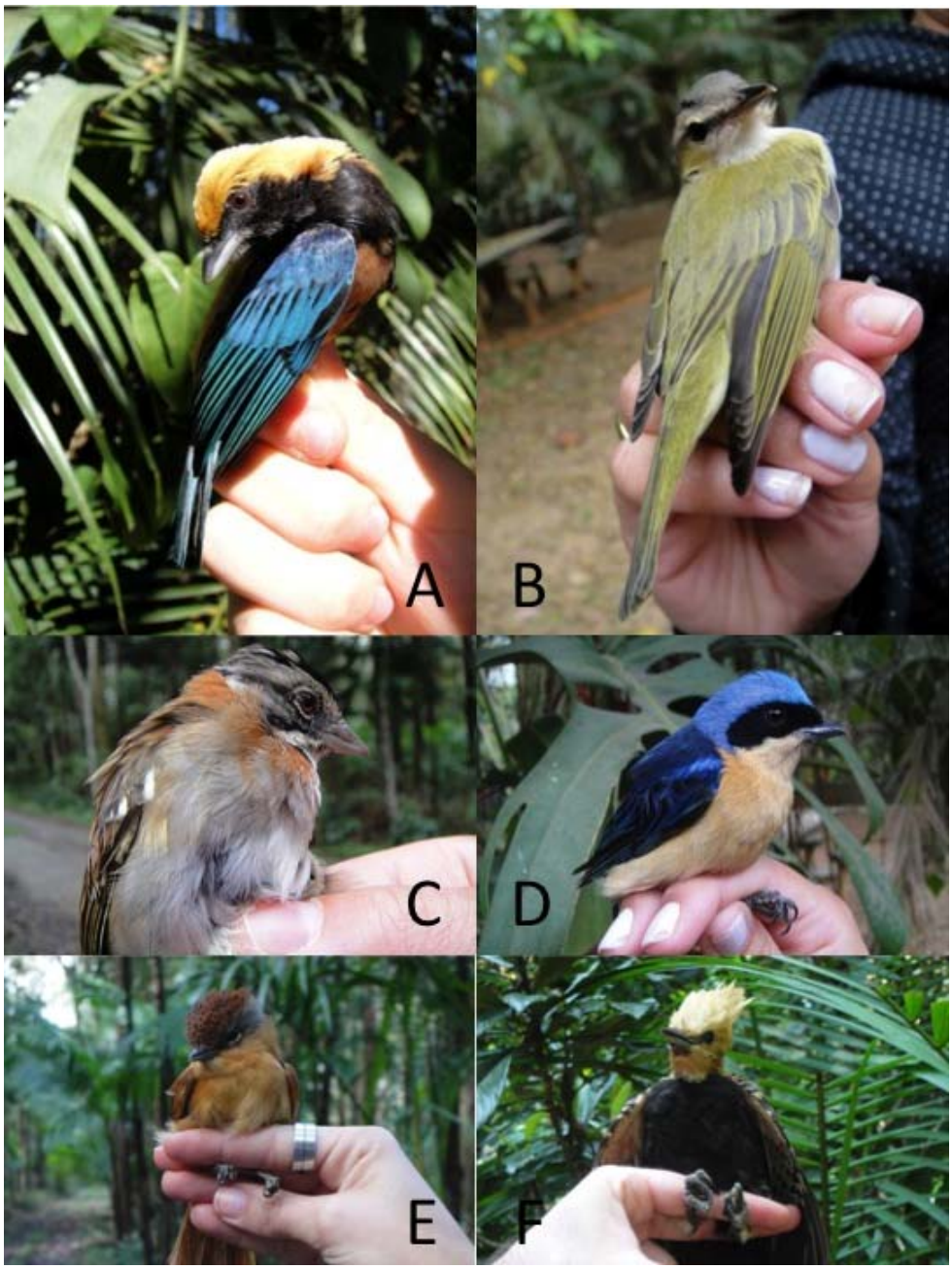


Figura 22 Alguns exemplares capturados nas redes de neblina (A – macho de saíra-amarela; B – juruviara; C – tico-tico; D – macho de saíra-viúva; E – caneleiro; F – fêmea de pica-pau-joão velho).
Fonte: Arquivo pessoal

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE OROFARINGE, CLOACA E SANGUE

Um total de 463 amostras foram coletadas, dentre elas 227 (49,1%) de orofaringe, 214 (46,1%) de cloaca e 22 (4,8%) de sangue.

É recomendada a retirada de um volume sanguíneo correspondente a 1% do peso total da ave; assim, para uma ave de 50g, apenas 0,05ml de sangue pode ser puncionado seguramente (HARRISON e LIGHTFOOT, 2006). Para evitar a exposição da ave ao risco de óbito, amostras de sangue foram coletadas de poucos indivíduos.

Não foram realizadas coletas de alguma amostra quando: a) o tamanho da abertura da cloaca e/ou orofaringe eram menores que o diâmetro do *swab*; b) os animais apresentaram sinais de stress devido à manipulação; c) o diâmetro da veia ulnar era pequeno demais para possibilitar a coleta de uma gota de sangue; e d) fuga.

4.3 AMOSTRAS ANALISADAS

Das 463 amostras coletadas, 114 (pertencentes a 61 animais) foram excluídas do estudo. Deste número, a) houve descongelamento de 101 amostras ainda não extraídas, devido a problemas no galão de nitrogênio líquido; b) 10 amostras tiveram todo o seu conteúdo extraído utilizado como teste (adição de vírus ao material extraído), c) uma amostra não produziu material extraído suficiente para análise, devido a um erro no processo de extração.

4.4 RESULTADOS DAS REAÇÕES DE qPCR

4.3.1 Viabilidade das Amostras

As amostras foram consideradas viáveis se, à reação de PCR em tempo real, a alíquota correspondente a qual foi adicionado o vírus da Dengue, demonstrasse amplificação do material genético, ou seja, sua curva de amplificação ultrapassasse o *threshold* e mantivesse a temperatura de *Melting* (Tm) entre torno de 80º C (79,4^{o}C a 83,7^{o}C), padrão para o vírus da Dengue (figura 22). Também são analisados os valores do *cycle threshold* (Ct), que é o ciclo no qual a fluorescência ultrapassa o baseline.

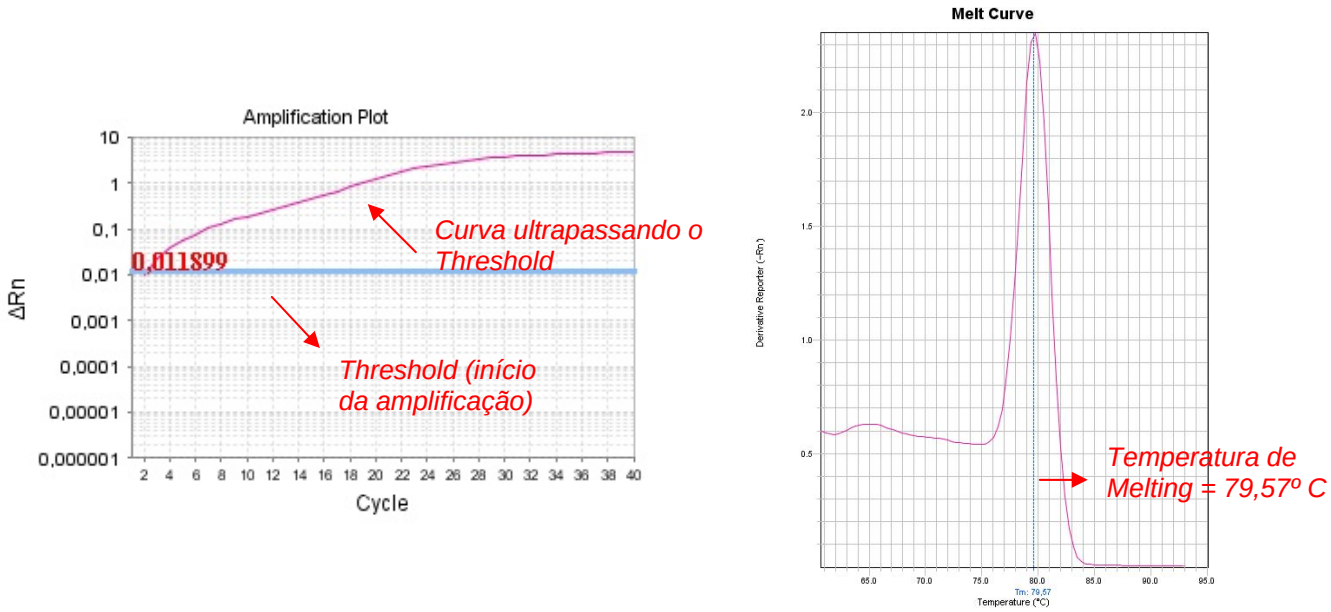


Figura 23 Curva de amplificação do vírus da Dengue do tipo 4 (em rosa) utilizado como controle positivo nas reações de PCR em tempo real.

Das 349 amostras processadas, nove (2,0%) amostras, mesmo após repetição, não amplificaram o material genético de sua alíquota correspondente, sendo consideradas inviáveis para o estudo (quadro 2). Deste total, apenas uma é proveniente da Fazenda Castanheiras; as oito restantes foram capturadas no Parque Anhanguera. Nota-se também que o sangue foi o material biológico que mais inibiu a amplificação do material genético presente.

Quadro 5 Lista dos animais cujas amostras foram consideradas inviáveis para o estudo.

Id.	Animal	Amostras coletadas	Amostra	Anilha	Local de Captura
209	*Tangara sayaca* (Linnaeus, 1766)	Cloaca (CL) e orofaringe (OF)	Cloaca (CL)	F27192	Faz. Castanheiras
224	*Zonotrichia capensis* (Statius Muller, 1776)	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	s/n	Pq. Anhanguera
			Orofaringe (OF)	s/n	Pq. Anhanguera
235	*Coereba flaveola* (Linnaeus, 1758)	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	D79896	Pq. Anhanguera
236	*Turdus rufiventris* Vieillot, 1818	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	H-PMSP-1123	Pq. Anhanguera
237	*Tachyphonus coronatus* (Vieillot, 1822)	Cloaca (CL) e sangue (SG)	Sangue (SG)	F27197	Pq. Anhanguera
238	*Tachyphonus coronatus* (Vieillot, 1822)	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	F27198	Pq. Anhanguera
239	*Phaethornis eurynome* (Lesson, 1832)	Orofaringe (OF)	Orofaringe (OF)	s/n	Pq. Anhanguera
240	*Troglodytes musculus* Naumann, 1823	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	D79897	Pq. Anhanguera

4.3.2 Análise das Amostras

Confirmada a viabilidade da amostra, a amostra foi considerada positiva se também apresentasse curva de amplificação ultrapassando o *threshold* e o mesmo padrão da Tm.

Amostras foram consideradas negativas quando: a) tivessem valores indeterminados de Ct; b) tivessem valores de Ct abaixo do estabelecido; c) mesmo com valores de Ct dentro do estabelecido, não alcançasse a temperatura de *Melting* determinada.

Do total de amostras processadas, 336 foram negativas, inclusive todas as amostras das aves recuperadas. Apenas quatro amostras, de diferentes animais, foram positivas à reação de qPCR (quadro 6 e figura 24).

Quadro 6 Lista dos animais cujas amostras foram positivas à qPCR.

Id.	**Animal**	**Amostras coletadas**	**Amostra Positiva**	**Anilha**	**Local de Captura**
87	*Pitangus sulphuratus* (Linnaeus, 1766)	Cloaca (CL) e orofaringe (OF)	Orofaringe (OF)	G93147	Faz. Castanheiras
211	*Pitangus sulphuratus* (Linnaeus, 1766)	Cloaca (CL) e orofaringe (OF)	Orofaringe (OF)	G109512	Faz. Castanheiras
230	*Leptopogon amaurocephalus* Tschudi, 1846	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	s/n	Pq. Anhanguera
232	*Zonotrichia capensis* (Statius Muller, 1776)	Cloaca (CL), orofaringe (OF) e sangue (SG)	Sangue (SG)	E130524	Pq. Anhanguera

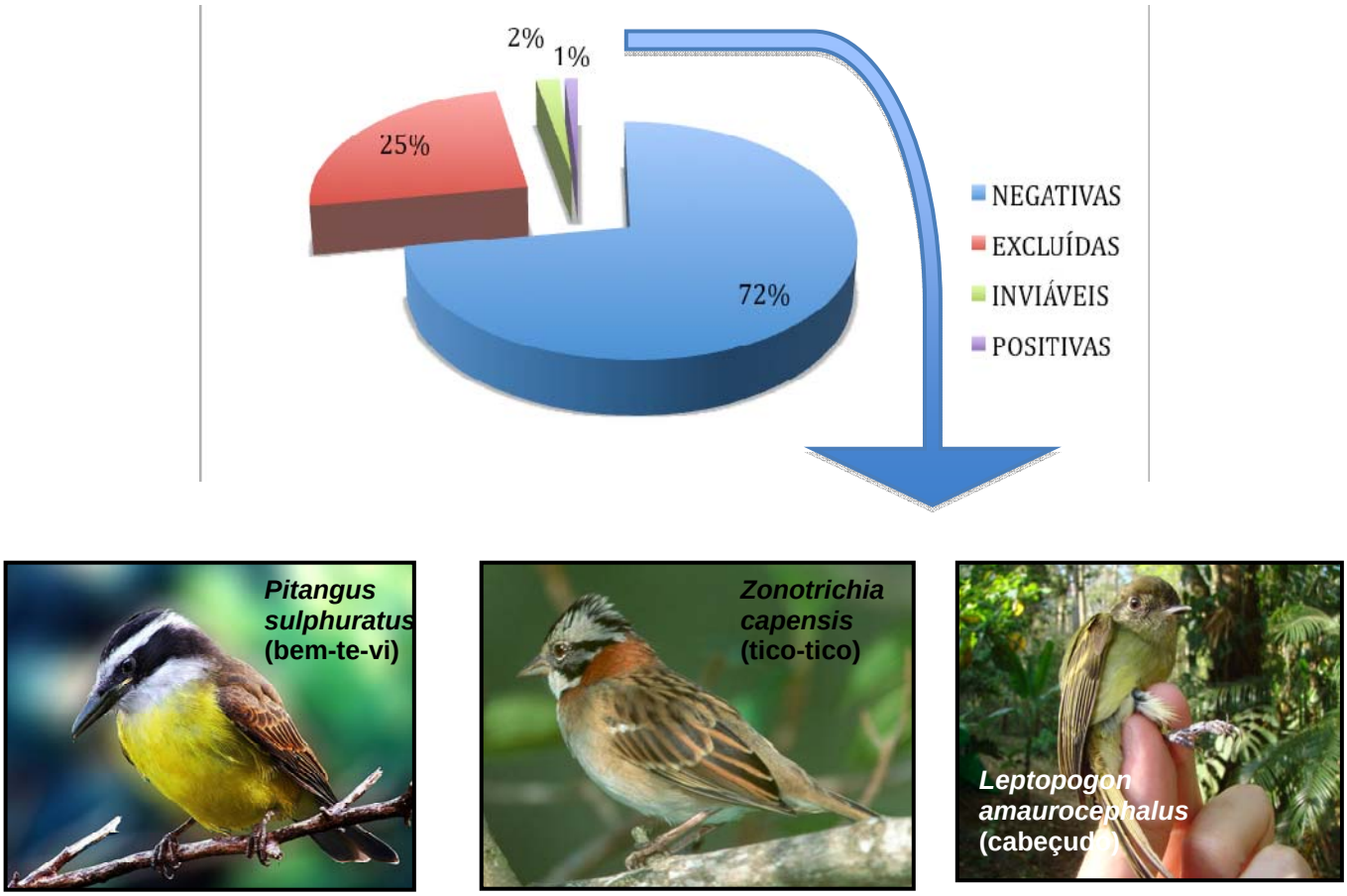
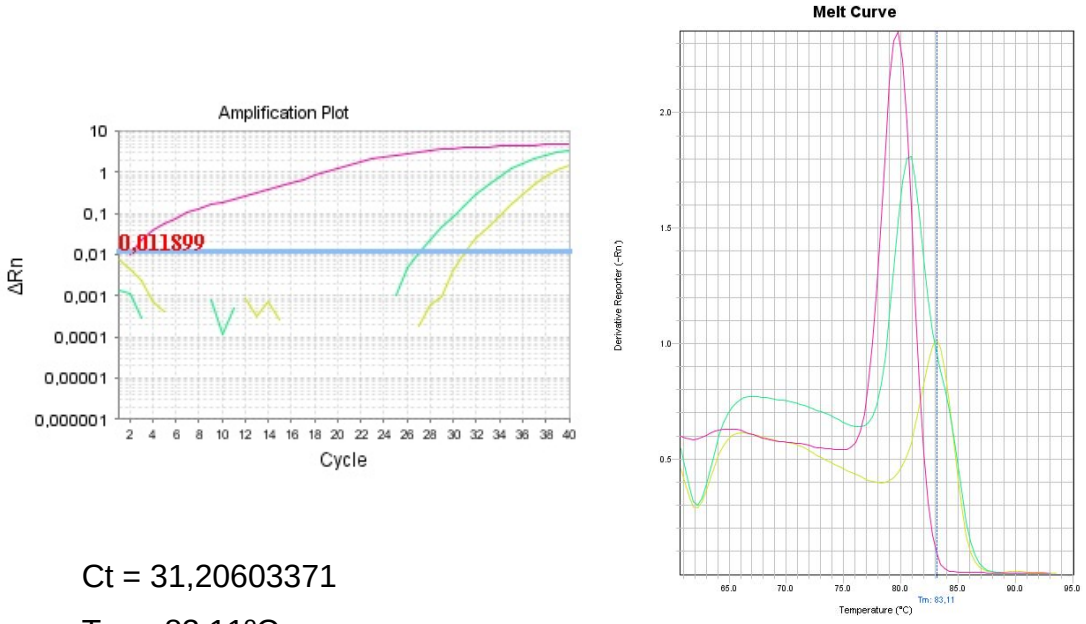


Figura 24 Quantidade das amostras consideradas inviáveis, positivas e negativas à reação de PCR em tempo real, e ilustração das espécies positivas.

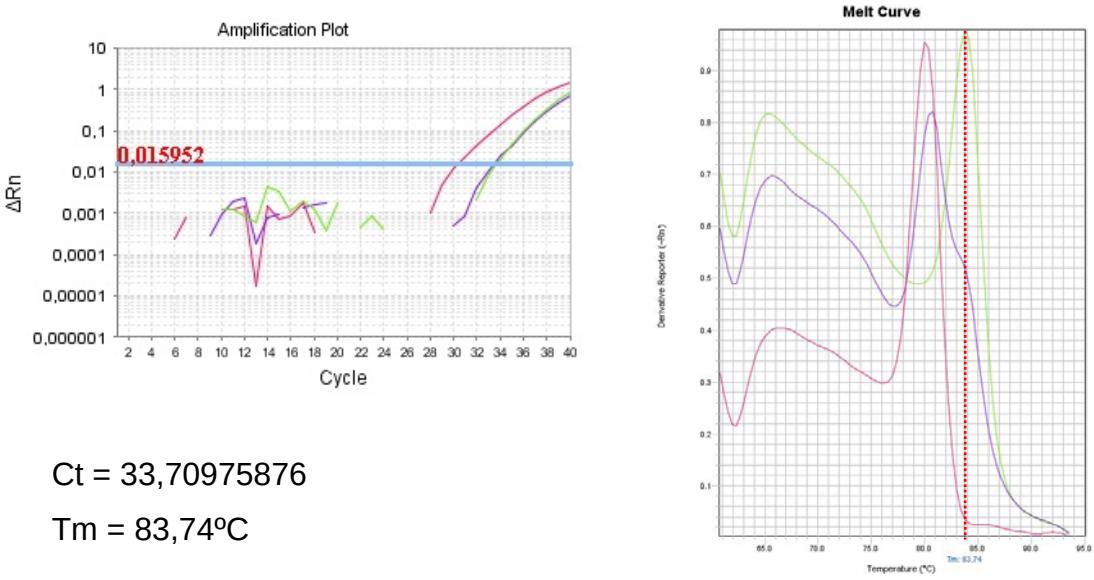
Estas quatro amostras apresentaram curva de amplificação ultrapassando o *threshold*, e Tm próximo dos 80º C (figuras 25 a 28).



Ct = 31,20603371

Tm = 83,11ºC

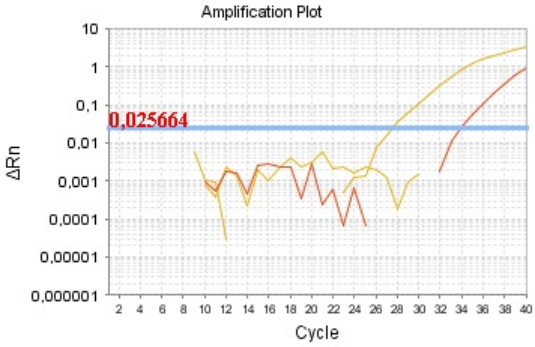
Figura 25 Curvas de amplificaçao e temperatura de *Melting* da amostras 230 SG, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo.
Notas: a) em amarelo – curva e Tm da amostra; b) em verde: curva e Tm da alíquota correspondente; c) em rosa – curva e Tm do controle positivo (sobrenadante de cultura de DENV-4).

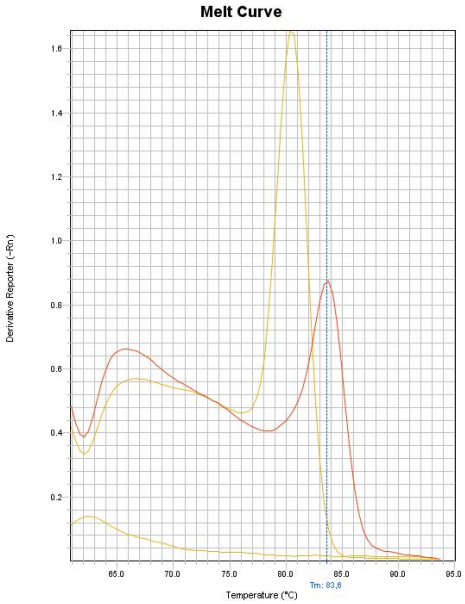


Ct = 33,70975876

Tm = 83,74ºC

Figura 26 Curvas de dissociação e temperatura de *Melting* da amostra 87 OF, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo.
Notas: a) em verde – curva e Tm da amostra; b) em roxo: curva e Tm da alíquota correspondente; c) em rosa – curva e Tm do controle positivo (sobrenadante de cultura de DENV-2 em concentração 1: 500).

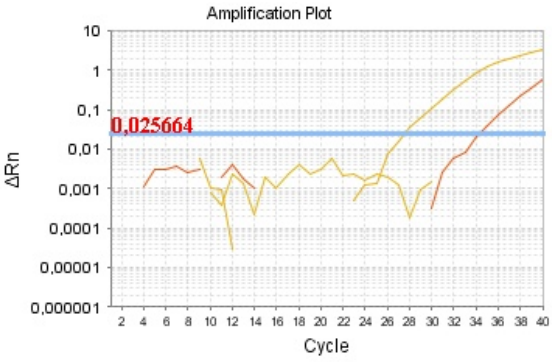


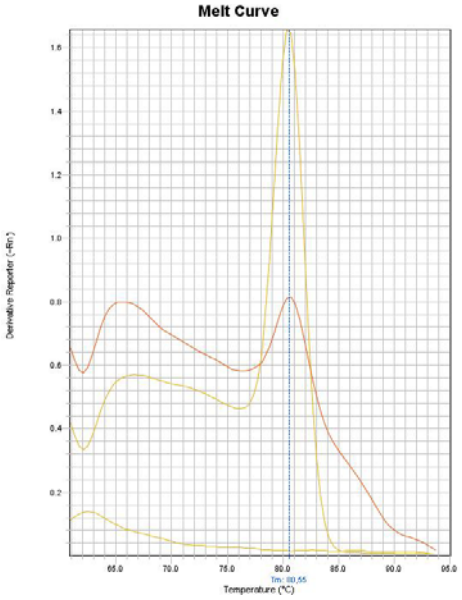


Ct = 33,92903

Tm = 83,59943

Figura 27 Curvas de dissociação e temperatura de *Melting* da amostra 211 OF, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo.
Notas: a) em laranja – curva e Tm da amostra; b) em amarelo escuro: curva e Tm do controle positivo; c) em amarelo claro – curva e Tm do controle negativo (sobrenadante de cultura de DENV-2 em concentração 1: 500).





Ct = 34,38522

Tm = 80,5474

Figura 28 Curvas de dissociação e temperatura de *Melting* da amostra 232 SG, bem como de sua alíquota correspondente e do controle positivo.
Notas: a) em laranja – curva e Tm da amostra; b) em amarelo escuro: curva e Tm do controle positivo; c) em amarelo claro – curva e Tm do controle negativo (sobrenadante de cultura de DENV-2 em concentração 1: 500).

As amostras positivas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2,5% e apresentaram banda de, aproximadamente, 200 pb (figura 30).

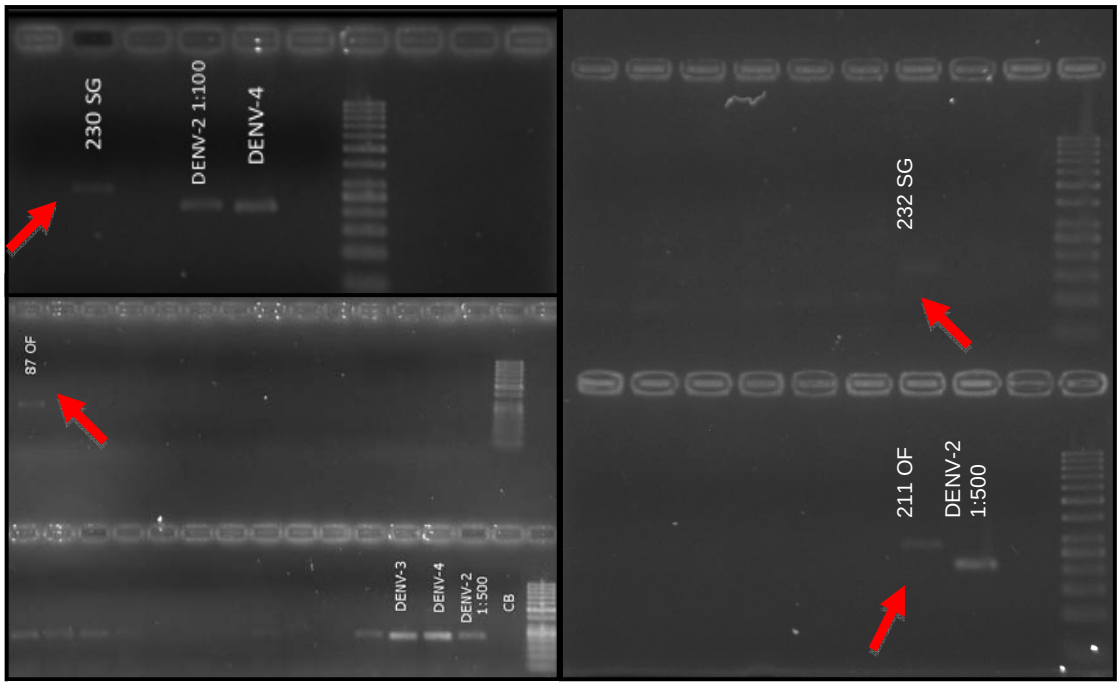


Figura 29 Amostras produto da PCR em tempo real, visualizadas à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.
Notas: a) marcador de 50 pb (Invitrogen®) presente nos últimos poços; b) DENV – vírus da Dengue; c) demais bandas – amostras com adição do vírus da Dengue.

4.5 RESULTADOS DA REAÇÃO DE *SEMI-NESTED* PCR

Para confirmação dos resultados, todas as amostras positivas à reação de qPCR foram submetidas à reação de semi-nested PCR. Os produtos da primeira reação foram diluídos nas concentrações 1:10 e 1:100 e foram submetidos à segunda reação.

As amostras 230 SG e 232 SG não apresentaram bandas do fragmento de aproximadamente, 250 bp do gene NS5 de *Flavivirus*. Já as amostras 87 OF e 211 OF apresentaram a banda esperada, ou seja, acredita-se que houve amplificação de genoma viral (figura 28).

As amostras 87 OF e 211 OF foram encaminhadas para seqüenciamento. Porém, devido à presença de bandas inespecíficas,

utilizou-se no seqüenciamento o produto do PCR em tempo real. A amostra 232 SG, por não ter apresentado a banda esperada, foi considerada como negativa.

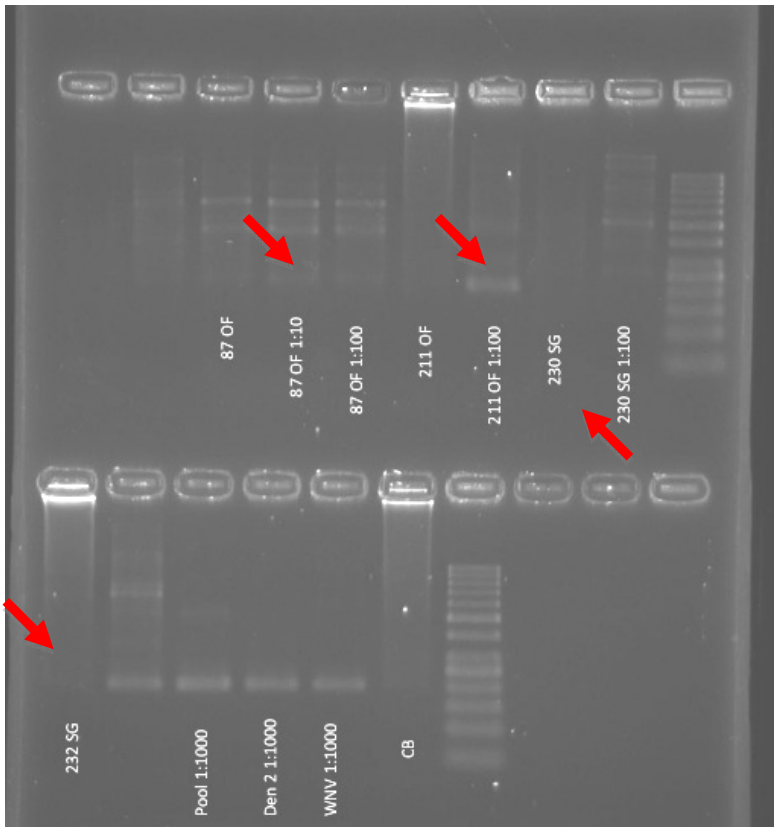
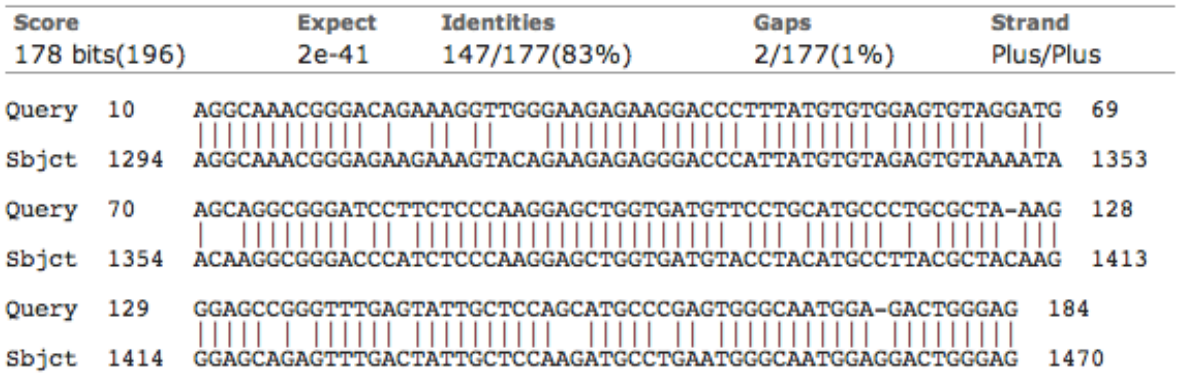


Figura 30 Amostras produto da reação de *semi-nested* PCR após eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.

4.6 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO

A amostras 230 SG foi encaminhada pra sequenciamento logo após o resultado da reação de PCR em tempo real e antes da realização da reação de semi-nested PCR. Após auxílio da ferramenta BLAST, nota-se que a sequência amplificada tem alta similaridade com uma enzima (RNA

pseudouridylate synthase) de galináceos (figura 27), não correspondendo a um *Flavivirus*.



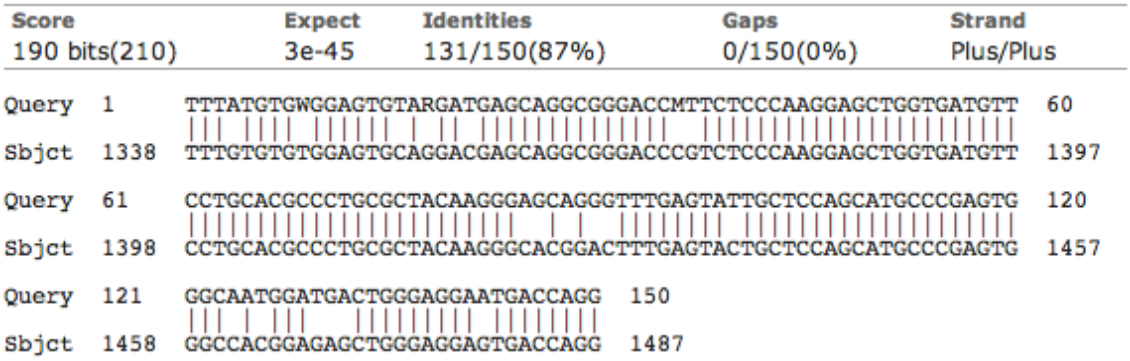
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
178 bits(196)	2e-41	147/177(83%)	2/177(1%)	Plus/Plus

```
Query  10    AGGCAAACGGGACAGAAAGGTTGGGAAGAGAAGGACCCTTTATGTGTGGAGTGTAGGATG  69
             ||||||||||||| |  || ||   |||||||| ||||||| ||||||||| ||||||||  ||
Sbjct  1294  AGGCAAACGGGAGAAGAAAGTACAGAAGAGAGGGACCCATTATGTGTAGAGTGTAAAATA  1353

Query  70    AGCAGGCGGGATCCTTCTCCCAAGGAGCTGGTGATGTTCCTGCATGCCCTGCGCTA-AAG  128
             |  ||||||||| || ||||||||||||||||||||||| ||| |||||| | |||||  |||
Sbjct  1354  ACAAGGCGGGACCCATCTCCCAAGGAGCTGGTGATGTACCTACATGCCTTACGCTACAAG  1413

Query  129   GGAGCCGGGTTTGAGTATTGCTCCAGCATGCCCGAGTGGGCAATGGA-GACTGGGAG  184
             ||||| | |||||| ||||||||||  ||||| || |||||||||||| |||||||||
Sbjct  1414  GGAGCAGAGTTTGACTATTGCTCCAAGATGCCTGAATGGGCAATGGAGGACTGGGAG  1470
```

Figura 31 Alinhamento da sequência amplificada com *Gallus gallus* RNA *pseudouridylate synthase domain containing* 2 (RPUSD2), mRNA.
Fonte: BLAST (Pubmed)

A sequência amplificada das amostras 87 OF e 211 OF possuem alta similaridade com a mesma enzima da amostra acima (RNA pseudouridylate synthase); porém, da espécie *Ficedula albicollis* (*collared flycatcher*), uma ave da Ordem Passeriformes de hábito migratório, que reproduz-se na Ásia e Europa e passa o inverno na África.

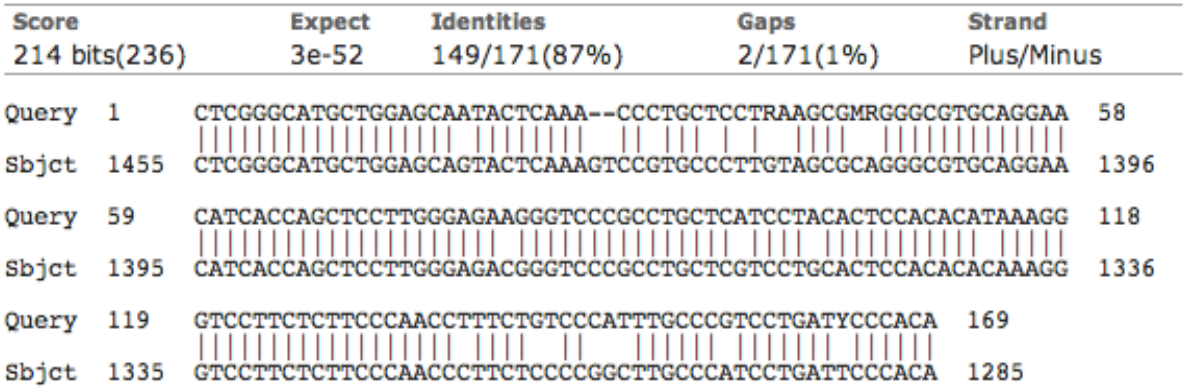
Ambas amostras pertencem a indivíduos diferentes de mesma espécie, *Pitangus sulphuratus* (bem-te-vi). A similaridade das sequências encontra-se nas figuras 32 e 33.



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
190 bits(210)	3e-45	131/150(87%)	0/150(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     TTTATGTGWGGAGTGTARGATGAGCAGGCGGGACCMTTCTCCCAAGGAGCTGGTGATGTT  60
Sbjct  1338  TTTGTGTGTGGAGTGCAGGACGAGCAGGCGGGACCCGTCTCCCAAGGAGCTGGTGATGTT  1397

Query  61    CCTGCACGCCCTGCGCTACAAGGGAGCAGGGTTTGAGTATTGCTCCAGCATGCCCGAGTG  120
Sbjct  1398  CCTGCACGCCCTGCGCTACAAGGGCACGGACTTTGAGTACTGCTCCAGCATGCCCGAGTG  1457

Query  121   GGCAATGGATGACTGGGAGGAATGACCAGG  150
Sbjct  1458  GGCCACGGAGAGCTGGGAGGAGTGACCAGG  1487
```

Figura 32 Alinhamento da sequência amplificada da amostra 87 OF com *Ficedula albicollis* RNA *pseudouridylate synthase domain containing* 2 (RPUSD2), mRNA.
Fonte: BLAST (Pubmed)



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
214 bits(236)	3e-52	149/171(87%)	2/171(1%)	Plus/Minus

```
Query  1     CTCGGGCATGCTGGAGCAATACTCAAA--CCCTGCTCCTRAAGCGMRGGGCGTGCAGGAA  58
Sbjct  1455  CTCGGGCATGCTGGAGCAGTACTCAAAGTCCGTGCCCTTGTAGCGCAGGGCGTGCAGGAA  1396

Query  59    CATCACCAGCTCCTTGGGAGAAGGGTCCCGCCTGCTCATCCTACACTCCACACATAAAGG  118
Sbjct  1395  CATCACCAGCTCCTTGGGAGACGGGTCCCGCCTGCTCGTCCTGCACTCCACACACAAAGG  1336

Query  119   GTCCTTCTCTTCCCAACCTTTCTGTCCCATTTGCCCGTCCTGATYCCCACA  169
Sbjct  1335  GTCCTTCTCTTCCCAACCCTTCTCCCCGGCTTGCCCATCCTGATTCCCACA  1285
```

Figura 33 Alinhamento da sequência amplificada da amostra 211 OF com *Ficedula albicollis* RNA *pseudouridylate synthase domain containing* 2 (RPUSD2), mRNA.
Fonte: BLAST (Pubmed)

5 DISCUSSÃO

Alguns *Flavivirus* são RNA vírus mantidos na natureza em ciclos que envolvem vetores artrópodes, como os mosquitos e carrapatos que, uma vez infectados, transmitem o vírus a um hospedeiro vertebrado (aves e mamíferos) quando o mesmo alimenta-se de sangue (FIGUEIREDO, 2007).

No Brasil já foram descritos diversos tipos de *Flavivírus*, dentre os quais os vírus Rocio (ROCV), Ilhéus (ILHV), Saint Louis (SLEV), da Febre Amarela (YFV) e os quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV) (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 1998;).

A presença de florestas tropicais favorece a circulação de Flavivirus, já que estes ambientes permitem a manutenção de reprodução de vetores e de vertebrados silvestres, potenciais reservatórios destes virus. Entre 2002 e 2010, o vírus da Dengue acometeu aproximadamente quatro milhões de pessoas no pais (SIQUEIRA-JÚNIOR, 2010), sendo considerado endêmico no Brasil. Já o vírus da Febre Amarela é endêmico nas florestas tropicais da America do Sul, em sua maioria no Brasil, principalmente nas regiões nordeste e centro-oeste (MORENO et al., 2011). Estes dois vírus têm os mamíferos como reservatório, principalmente humanos e primatas não-humanos.

As aves são consideradas reservatórios dos vírus de Saint Louis, Rocio, Ilhéus e Nilo Ocidental, todos causadores de encefalites humanas. Dada a importância destes animais na transmissão destes vírus, este trabalho teve como objetivo pesquisar a infecção por *Flavivírus* na população de aves de duas áreas do município de São Paulo.

O Parque Anhanguera e a Fazenda Castanheiras/APA Bororé-Colônia são áreas verdes consideráveis do município de São Paulo, e comportam uma grande biodiversidade de aves. Apesar de terem sido capturadas apenas 38 espécies diferentes, cada uma das áreas possui uma

diversidade de mais de 140 aves, tanto residentes quanto migratórias (SÃO PAULO, 2010).

A espécie chopim (*Molothrus bonariensis*), pertencente à Ordem Passeriformes, é amplamente encontrada nos parques do município de São Paulo. O vírus Ilhéus já foi isolado de alguns exemplares desta espécie por PEREIRA et al. (2001) no Parque Ecológico do Tietê, localizado na divisa entre as cidades de São Paulo e Guarulhos. Foi constatado que os animais infectaram-se no próprio parque, identificando a circulação de vírus no local. Dado que esta espécie realiza deslocamentos diários ao seu local de dormida (SICK, 1997) e utiliza as áreas verdes (parques e praças) como passagem e descanso, este fato pode possibilitar a disseminação deste vírus para outras áreas do município.

Ainda em relação ao chopim, é importante destacar que esta espécie utiliza ninhos de outras aves para realizar sua oviposição. Espécies como o tico-tico (*Zonotrichia capensis*) e o pardal (*Passer domesticus*), ao contrario de outras aves, cuidam dos filhotes do chopim como se fossem seus (SICK, 1997). Considerando o chopim como potencial reservatório do Flavivirus Ilhéus, este fato possibilitaria a disseminação viral para outras espécies de aves, já que os vírus já foram detectados em secreções orofaríngeas de aves.

O pardal (*Passer domesticus*), espécie exótica introduzida originária da Europa, é uma ave considerada endêmica na cidade de São Paulo. Dado que esta espécie já foi considerada potencial reservatório para o SLEV, relatado por MCLEAN et al. (1983) em uma investigação conduzida na America do Norte, e para o WNV sua presença nos parques do município de São Paulo pode favorecer a circulação deste vírus nestas áreas, já que é encontrado em grande numero nestas áreas, desenvolve altos títulos sorológicos, e possui competência biológica para infectar mosquitos (KOMAR et al., 2001).

Tanto o SLEV quanto o ILHV circulam amplamente na Serra do Mar, região sul do estado de São Paulo (ROMANO-LIEBER e IVERSSON, 2000). Acredita-se que as pessoas infectam-se com os vírus ao adentrar na mata,

hábitat propício para a manutenção de vetores e reservatórios. Frente à proximidade da Serra do Mar com a APA Bororé Colônia, é possível a circulação de *Flavivirus* nas aves que habitam esta área e circulam pelos corredores ecológicos, podendo favorecer a transmissão para animais susceptíveis.

A transmissão mais comum dos *Flavivírus* ocorre por mosquitos ornitofílicos. A presença das espécies *Cx. nigripalpus* e *Ae (Och.) scapularis* no Parque Anhanguera (MEDEIROS-SOUZA et al., 2013) também favorece a transmissão de *Flavivirus* no local, já que os mesmos são considerados vetores potenciais do WNV em áreas onde o vírus ocorre com maior frequência. Em um estudo ainda em andamento, um pool de fêmeas não ingurgitadas da espécie *Culex culex* sp., proveniente do Parque Municipal Santo Dias (Zona Sul/SP) foi detectado como infectado por *Culex flavivirus*, um *Flavivirus* até então encontrado apenas em mosquitos, a partir da técnica de qPCR *. Apesar de não ter sido identificado como causador de doenças humanas, a identificação de um mosquito infectado com *Flavivirus* em áreas municipais mostra a importância de realizar estudos a cerca dos *Flavivirus* circulantes, bem como afirma o sucesso da técnica molecular na pesquisa.

Outro fator importante é a chegada de aves migratórias oriundas do Hemisfério Norte, como o falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) e águia-pescadora (*Pandion haliaetus*), que pode representar risco de introdução do WNV na cidade de São Paulo. As mesmas espécies já foram detectadas como portadoras deste vírus em trabalhos conduzidos por LINKE et al. (2007) e SEIDOWSKI et al. (2010), na Alemanha, e por NEMETH et al. (2005), em Nova Iorque.

Embora não tenha sido capturado nenhum exemplar destas espécies neste estudo, é importante relatar que a Ordem de aves cuja a maior proporção de exemplares foi capturada é a dos Passeriformes que, segundo KOMAR et al. (2003) são as aves mais competentes na transmissão de

* Comunicação pessoal de Licia Natal Fernandes, de 29 de julho de 2013.

Flavivirus, como WNV e SLEV. A única espécie migratória capturada foi a juruviara (*Vireo olivaceus)*, um passeriforme oriundo do norte do pais. Apesar de não ter sido descrita como reservatório para *Flavivirus*, por voar longas distâncias, poderia carrear microorganismos a outras áreas do pais, aumentando a área de dispersão viral.

No Brasil, foram encontradas evidências da circulação do WNV no Pantanal, a partir da sorologia positiva de cavalos e galinhas nesta região (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). Devido a este fato, é de extrema importância a vigilância para este vírus em outras áreas do pais, já que a disseminação do WNV na America do Norte ocorreu rapidamente (WHO, 2011).

Apesar das condições favoráveis à transmissão destes vírus em ambas as áreas, a ausência de positividade encontrada já era esperada, uma vez que a técnica utilizada (PCR) só detecta os genomas virais se o animal estiver no período de viremia (MAEDA e MAEDA, 2012); nas aves, este período é curto, durando cerca de sete dias (KOMAR et al., 2003). Mesmo que *Flavivirus* estejam circulando no local, a chance de uma ave em período de viremia ser capturada é baixa, principalmente se considerarmos que a coleta é realizada apenas uma vez, seguida de liberação da ave para seu habitát. Porém, segundo LANCIOTTI (2003), a PCR é o método mais útil para detectar o RNA viral em qualquer amostra biológica, podendo ser em tecidos - olhos, baço, rins, sangue – ou *swabs* de cloaca e/ou orofaringe.

Para verificar a circulação de *Flavivirus* nestas populações, as técnicas sorológicas são as mais utilizadas já que, uma vez infectado, o animal pode desenvolver anticorpos que podem ser detectados por muito tempo apos a infecção. Porém, estas técnicas também possuem limitações, como a reatividade cruzada apresentada por membros de um mesmo complexo antigênico, que dificulta a identificação do vírus envolvido na infecção, especialmente em regiões onde há prevalência de mais de um *Flavivirus* (MAKINO et al., 1994; KUNO e GUBLER, 1991); e o tempo necessário para a detecção dos anticorpos, que ameaça a sorologia como

diagnóstico de infecções agudas (DOMINGO et al., 2011), exemplificado pelo caso relatado por KOMAR et al. (2003) que, mesmo após infecção experimental do WNV em um indivíduo da espécie *Melopsittacus undulatus,* o mesmo não produziu níveis detectáveis de anticorpos; o vírus só pôde ser detectado no tecido cardíaco por técnicas moleculares.

Além disso, a sorologia exige que certo volume de sangue deva ser retirado do animal, o que pode pôr em risco a vida das aves de pequeno porte. Tal procedimento deve ser realizado por profissional habilitado, sem causar males aos indivíduos.

No presente trabalho, foi preconizada a coleta de *swabs* de cloaca e orofaringe dos indivíduos capturados por ser menos invasiva e de fácil realização, principalmente quando as coletas são realizadas a campo, como o reportado por OHAJURUKA et al. (2005). Ademais, utilizar os swabs ao invés dos tecidos elimina a necessidade de dissecar os animais, diminuindo o tempo de processamento, o custo da técnica e o risco de lacerações pelos coletores (LINDSAY et al., 2003).

A detecção de *Flavivirus* em uma amostra de orofaringe comprova que estas amostras podem ser utilizadas na vigilância destes vírus, em especial o WNV, como o relatado por OHAJURUKA et al. (2005), NEMETH et al. (2005) e LINDSAY et al. (2003). Não foi possível detectar o vírus na amostra de cloaca do mesmo animal. Os resultados apresentados por LINDSAY et al. (2003) sugere que os *swabs* de orofaringe são mais sensíveis que os *swabs* de cloaca na detecção de animais positivos, o que pode explicar a negatividade da amostra de cloaca.

Os resultados negativos encontrados a partir dos *swabs* pode sugerir que os animais não apresentavam infecção, ou apresentavam baixa carga viral, como o demonstrado por OHAJURUKA et al. (2005) que, em seu estudo, comprovou que em muitos animais infectados, só era possível a detecção viral nos tecidos renais.

Considerando que a transmissão direta, sem a participação de um vetor, já foi descrita (BANET-NOACH et al., 2003; KOMAR et al., 2003), a detecção de vírus nestas amostras é um achado epidemiológico importante,

já que muitas aves regurgitam o alimento direto na boca dos ninhegos e algumas têm o hábito de limpar as penas dos companheiros, favorecendo a disseminação dos vírus.

As reações de *semi-nested* PCR foram adotadas no estudo como confirmação dos resultados positivos emitidos pela PCR em tempo real. Tal procedimento se faz necessário uma vez que o uso do SyBR Green, apesar de apresentar bom custo-benefício, tem a desvantagem dos resultados falso-positivos, uma vez que pode ligar-se a *primer dimers* ou DNA amplificado inespecificamente.

A amplificação da enzima RPUSD2 em amostras provenientes de três diferentes aves (sangue de um exemplar de *Leptopogon amaurocephalus*), orofaringe de um exemplar de *Pitangus sulphuratus* e orofaringe de um exemplar de *Zonotrichia capensis*) é explicada por este fato. Mesmo com a presença de alguns *mismatches*, devido à alta identidade das duas sequências e ao valor do *E-value*, é praticamente nula a probabilidade deste evento ter ocorrido ao acaso. Podemos, então, afirmar que a sequência amplificada é DNA do próprio hospedeiro, e não proveniente de *Flavivirus*. Os *mismatches* podem ser explicados pela diferença nas espécies de aves.

6 CONCLUSÃO

Apesar da presença de potenciais reservatórios para *Flavivirus* nos parques municipais, nenhum vírus desta família foi detectado nos indivíduos amostrados. Estes resultados contribuem para reforçar a ausência do *West Nile Vírus* em território brasileiro; porém, é necessário continuar esta pesquisa, aumentando as áreas de abrangência, para garantir a não circulação deste vírus.

Dada a importância das aves silvestres no ciclo de transmissão de *Flavivirus*, estudos como estes colaboram para a vigilância destes vírus no município e, consequentemente, no país, uma vez que tem a capacidade de detectar potenciais reservatórios para os *Flavivirus* sabidamente presentes em território brasileiro, e também para outros *Flavivírus* com alta capacidade de disseminação, como o caso do *West Nile Virus*.

Os parques municipais, por serem áreas verdes que comportam grande diversidade biológica, podem ser consideradas áreas com potencial para transmissão de *Flavivirus*. A presença de espécies com comprovada participação no ciclo de transmissão destes vírus, sejam mosquitos ou aves e mamíferos, aumenta a importância destas áreas na manutenção e transmissão destes agentes patogênicos.

7 REFERÊNCIAS

AIDE, T.M.; GRAU, H.R.. Globalization, migration and Latin American ecosystems. **Science**, 305(24), 2004.

ANDERSON, J.F.; MAIN, A.J.; ANDREADIS, T.G.; WIKEL, S.K.; VOSSBRINCK, C.R.. Transtadial transfer of West Nile Virus by three species of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol**., v.40, 2003.

AVES DE RAPINA. **Falcão Peregrino**. Disponível em http://www.avesderapinabrasil.com/falco_peregrinus.htm. Acesso em 11 de julho de 2013.

BANET-NOACH, C.; SIMANOV, L.; MALKINSON, M.. Direct (non-vector) transmission of *West Nile Virus* in geese. **Avian Pathology**, 32(5), out 2003.

BARBOSA, L.M.;MARTINS, S.E.. **Diversificando o reflorestamento no Estado de São Paulo: espécies disponíveis por região e ecossistema**. S. Paulo: Instituto de Botânica, 2003.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, 22(64), 2008.

BATISTA, W.C.; TAVARES, G.S.B.; VIEIRA, D.S.; HONDA, E.R.; PEREIRA, S.S.; TADA, M.S.. Notification of the first isolation of Cacipacore virus in a human in the State of Rondônia, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** 44 (4), 2011.

BIOMERIEUX. **NucliSENS®EasyMAG™: Tecnologia BOOM® reconhecida como método de referência,** s/d. Disponível em < http://www.biomerieux.pt/servlet/srt/bio/portugal/dynPage?open=PTG_CLN_PRD&doc=PTG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_129&pubparams.sform=1&lang=pt>. Acesso em 16 de julho de 2013.

BOREAL BIRDS. **Migration map**. Disponível em <http://www.borealbirds.org/birdguide/mig_map_main.shtml>. Acesso em 12 de fevereiro de 2013.

BOSCH, I.; HERRERA, F.; NAVARRO, J.C.; LENTINO, M.; DUPUIS, A.; MAFFEI, J.; JONES, M.; FERNÁNDEZ, E.; PÉREZ, N.; PÉREZ-EMÁN, J.; GUIMARÃES, A.E.; BARRERA, R.; VALERO, N.; RUIZ, J.; VELÁSQUEZ, G.; MARTINEZ, J.; COMACH, G.; KOMAR, N.; SPIELMAN, A.; KRAMER, L.. *West Nile Virus*, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, 13(4), 2007. Disponível em HTTP://www.cdc.gov/eid . Acesso em 23 de novembro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Período sazonal: alerta aos serviços de saúde**, [s/d]. Disponível em HTTP://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=41812. Acesso em 10 de maio de 2013.

BRASIL. Lei nº 9985 de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de julho de 2000.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, ano 4, n.2, 2004.

BUSCH, M.P.; WRIGHT, D.J.; CUSTER, B.; TOBLER, L.H.; STRAMER, S.L.; KLEINMAN, S.H.; PRINCE, H.E.; BIANCO, C.; FOSTER, G.; PETERSEN, L.R.; NEMO, G.; GLYNN, S.. West Nile Vírus infections projected from blood donors screening data, United States, 2003. **Emerging Infectious Diseases**, 12 (3), 2006.

CALISHER, C.H., KARABATSOS N., DALRYMPLE, J.M., SHOPE, R.E., PORTERFIELD, J.S., WESTAWAY, E.G., BRANDT, W.E.. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v.70, 1989. pp. 37–43.

CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Lista das aves do**

Brasil. 9 ed., 2010. Disponível em <http://www.cbro.org.br>. Acesso em 05 de dezembro de 2011.

CDC – Centers for Diseases Controle and Prevention. Yellow fever. 2011. Disponível em HTTP://www.cdc.gov/yellowfever. Acesso em 10 de maio de 2013.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Information on Arboviral Encephalitides**, 2005. Disponível em < http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/arbdet.htm>. Acesso em 25 de março de 2013.

CDC – Centers for Diseases Control and Prevention. **Dengue homepage**. 2012. Disponível em HTTP://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html. Acesso em 10 de maio de 2013.

CICERO, C.; JOHNSON, N.K.. Higher-Level Phylogeny of New World Vireos (Aves: Vireonidae) Based on Sequences of Multiple Mitochondrial DNA Genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 20(1), 2001. pp. 27-40.

COIMBRA, T.L.; NASSAR, E.S.; NAGAMORI, A.H.; FERREIRA, I.B.; PEREIRA, L.E.; ROCCO, I.M.; UEDA-ITO, M.; ROMANO, N.S.. Iguape: a newly recognized flavivirus from São Paulo State, Brazil. **Intervirology**, 36(3), 1993. pp.144-52.

COOK, S.; MOUREAU, G.; HALBACH, R.E.; MUKWAYA, L.; GOODGER, K.; SSENFUKA, F.; GOULD, E.; HOLMES, E.C.; de LAMBALLERIE, X.. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of Culex flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. **Journal of General Virology**, 90, 2009.

CORDELLIER, R.; DEGALLIER, N.. Environment, arbovirus transmission and control of epidemics. **Cad. Saude Públ.**, 8(3), 1992. pp.249-253.

CORNELL UNIVERSITY. **All about birds**. Disponível em <http://www.allaboutbirds.org/Page.aspx?pid=1189>. Acesso em 30 de março de 2013.

CROPPER, M.; GRIFFITHS, C.. The interaction of population growth and environmental quality. **Population Economics**, 84(2), 1994.

DIAZ, L.A.; KOMAR, N.; VISINTIN, A.; JURI, M.J.D.; STEIN, M.; ALLENDE, R.L.; SPINSANTI, L.; KONIGHEIM, B.; AGUILAR, J.; LAURITO, M.; ALMIRÓN, W.; CONTIGIANI, M.. *West Nile Virus* in birds, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, 14(4), 2008a. Disponível em http://www.cdc.gov/eid. Acesso em 3 de janeiro de 2013.

DOMINGO, C.; PATEL, P.; LINKE, S; ACHAZI, K.; NIEDRIG, M.. Molecular diagnosis os flaviviruses. Future Virol. 6(9), 2011. pp. 1059-1074.

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.C.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL III, F.R.; SMITH, T.F.. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, 19 (1), 2006.

FIGUEIREDO, L.T.M.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; FIORILLO, A.M.. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Rev.Saúde Públ.**, v.20, 1986. pp. 204-11.

FIGUEIREDO, L.T.M.; BATISTA, W.C.; KASHIMA, S.; NASSAR, E.S.. Identification of brazilian Flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 59(3), 1998. pp. 357–362.

FIGUEIREDO, L.T.M.. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** 40(2), 2007. pp. 224-229

FIGUEIREDO, M.L.G.. **Identificação de Flavivirus infectando culicídeos de 1999 a 2007 no Brasil.** 2010. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FORMOSINHO, P.; SANTOS-SILVA, M.M.; SANTOS, A.; MELO, P.; ENCARNAÇÃO, V.; SANTOS, N.; NUNES, T.; AGRÍCOLA, R.; PORTAS, M.. O vírus West Nile em Portugal – estudos de vigilância epidemiológica. **RPCV**., v.101, (2006).

GOMES, G.; CAUSEY, O.R.. Bussuquara, A New Arthropod-Borne Virus. **Exp Biol Med.**, 101(2), 1959. pp. 275-279.

GOOGLE EARTH for Mac. [S.l.]: Google, 2009. Disponível em HTTP://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/index.html. Acesso em 01 de maio de 2013.

GOULD, E.A.; HIGGS, S.. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 103(2), 2009. pp. 109–121.

HALL, T. Biological sequence alignment editor, disponível em http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html, 1999.

HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, B.S.. **Clinical avian medicine**. Florida: Spin Publishing Inc, 2006.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, S.; GRIFFITH, R.. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology**, v.10, 1992.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R.. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11, 1993.

HOFMEISTER, E.K.. *West Nile Virus*: North American experience. **Integrative Zoology**, v.6, 2011.

HUBÁLEK, Z.. An annotated checklist of pathogenic microorganismos associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, 40(4), 2004. pp. 639–659.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico: resultados definitivos.** 2010. Disponível em http://censo2010.ibge.gov.br. Acesso em 06 de março de 2013.

IVERSSON, L.B.; SILVA, R.A.M.S.; TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; BARROS, V.L.R.S.. Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South América. **Rev. Inst. Med. Trop**., 35(4), 1993.

JOHNSON, B.W., KOSOY, O., HUNSPERGER, E., BELTRAN, M., DELOREY, M., GUIRAKHOO, F., MONATH, T.. Evaluation of chimeric Japanese encephalitis and Dengue viruses for use in diagnostic plaque reduction neutralization tests. **Clinical Vaccine and Immunology,** v.16, 2009. pp. 1052–1059.

JOHNSON, N.; WAKELEY, P.R.; MANSFIELD, K.L.; McCRACKEN, F.; HAXTON, B.; PHIPPS, L.P.; FOOKS, A.R.. Assessment of a novel real-time pan-flaviviruses RT-polymerase chain reaction. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, 10(7), 2010. pp. 665-671.

JOYNER, P.H.; KELLY, S.; SHREVE, A.A.; SNEAD, S.E.; SLEEMAN, J.M.; PETTIT, D.A.. *West Nile Virus* in raptors from Virginia during 2003: clinical, diagnostic, and epidemiologic findings. **Journal of Wildlife Diseases**, 42(2), 2006.

KALBFLEISCH, K.A.. ***West Nile Virus*** **Presence and Blood-Feeding Behavior of Culex tarsalis in Wildlife Refuges and Management Areas in Montana**. 2011. Honors Thesis – Carroll College, Helena (MO).

KEESING, F.; BELDEN, L.K.; DASZAK, P.; DOBSON, A.; HARVELL, C.D.; HOLT, R.D.; HUDSON, P., JOLLES, A.; JONES, K.E.; MITCHELL, C.E.; MYERS, S.S.; BOGICH, T.; OSTFELD, R.S.. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v.468, 2010.

KILLPATRICK, A.M.; LADEAU, L.; MARRA, P.. Ecology of West Nile Vírus transmission and its impact on birds in the Western hemisphere. **The Auk**, 124 (4), 2007.

KOMAR, N.; PANELLA, N.A.; BURNS, J.E.; DUSZA, S.W.; MASCARENHAS, T.M.; TALBOT, T.O.. Serologic evidence for West Nile Vírus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. **Emerging Infectious Diseases**, 7 (4), 2001.

KOMAR, N.; LANGEVIN, S.; HINTEN, S.; NEMETH, N.; EDWARDS, E.; HETTLER, D.; DAVIS, B.; BOWEN, R.; BUNNING, M.. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Vírus. **Emerg Infect Dis**., 9(3), 2003. pp. 311–322.

KORMAN, V.. **Proposta de integração das glebas do Parque Estadual de Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro, SP).** 2003. 131p.. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N.. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, 2006.

KULASEKERA, V.L.; KRAMER, L.; NASCI, R.S.; MOSTASHARI, F.; CHERRY, B.; TROCK, S.C.; GLASER, C.; MILLER, J.R.. *West Nile Virus* infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. **Emerging Infectious Diseases**, 7(4), 2001.

KUNO, G.; GUBLER, D.J.. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infection. **Journal of Virological Methods**, 33, 1991. pp. 101-113.

KUNO, G.. Serodiagnosis of Flaviviral infections and vaccinations in humans. In: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P.. **The Flaviviruses: detection, diagnosis and vaccine development.** Advances in Research Techniques, v.61. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2003.

KUNO, G.; CHANG, G.J.; TSUCHIYA, R.; KARABATSOS, N.; CROPP, B.. Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, 72 (1), 1998. pp. 73-83.

KUNO, G., CHANG, J.J.. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin. Microbiol. Rev**., v18, 2005. pp. 608-637.

LANCIOTTI, R.S.; ROEHRIG, J.T.; DEUBEL, V.; SMITH, J.; PARKER, M.; STEELE, K.; CRISE, B.; VOLPE, K.E.; CRABTREE, M.B.; SCHERRET, J.H.;

HALL, R.A.; MACKENZIE, J.S.; CROPP, C.B.; PANIGRAHY, B.; OSTLUND, E.; SCHMITT, B.; MALKINSON, M.; BANET, C.; WEISSMAN, J.; KOMAR, N.; SAVAGE, H.M.; STONE, W.; MCNAMARA, T.; GUBLER, D.J.. Origin of the *West Nile Virus* Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. **Science** 17, 286(5448), 1999. pp. 2333-233.

LANCIOTTI, R.S.. Molecular amplification assays for the detection of Flaviviruses. In: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P.. **The Flaviviruses: detection, diagnosis and vaccine development.** Advances in Research Techniques, v.61. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2003.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M.. Molecular biology of Flaviviruses. In: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P.. **The Flaviviruses: structure, replication and evolution.** Advances in Vírus Research, v.59. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2003.

LINDSAY, R.; BARKER, I.; NAYAR, G.; DREBOT, M.; CALVIN, S.; SCAMMELL, C.; SACHVIE, C.; SCAMMELL-LA FLEUR, T.; DIBERNARDO, A.; ANDONOVA, M.; ARTSOB, H.. Rapid antigen-capture assay to detect *West Nile Virus* in dead corvids. **Emerging Infectious Diseases**, 9(11), 2003.

LINKE, S.; NIEDRIG, M.; KAISER, A.; ELLERBROK,H.; MULLER, K.; MULLER, T.; CONRATHS, F.J.; MUHLE, R.; SCHMIDT, D.; KOPPEN, U.; BAIRLEIN, F.; BERTHOLD, P.; PAULI, G.. Serologic evidence of WNV infections in wild birds captured in Germany. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 77(2), 2007.

LOBO, F.P.; MOTA, B.E.F.; PENA, S.D.J.; AZEVEDO, V.; MACEDO, A.M.; TAUCH, A.; MACHADO, C.R.; FRANCO, G.R..Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in *Flaviviridae* and their hosts. **PLoS ONE**, 7(4): 2009.

LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.; SACHETTA, L.A.; CALISHER, C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brasil. I. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rociovirus. **Am J Epidemiol**., 107(5), 1978. pp. 444-9.

LOPES, O.S.; SACCHETTA, L.A.; COIMBRA, T.L.; PEREIRA, L.E.. Isolation of St. Louis encephalitis vírus in South Brazil. **Am.J.Trop.Med.Hyg.,** 28(3), 1979. pp. 583-585.

LOPES, O.S., SACHETTA, L.A., FRANCY, D.B., JAKOB, W.L., CALISHER, C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil III. Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819). **Am J Epidemiol**., 113(2), 1981. pp. 122-5.

LUDWIG, G.V.; IACONO-CONNORS, L.C.. Insect-transmitted vertebrate viruses: Flaviviridae. **In Vitro Cell. Dev. Biol**., 29(4), abr 1993.

LUNA, E.J.A.; SOUZA, R.P.; PEREIRA, L.E.. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 12(1), 2003. pp.7-19.

MAEDA, A.; MAEDA, J.. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **The Veterinary Journal**, v.195, 2013. pp. 33–40.

MAGALHÃES, A.F.A.; VASCONCELLOS, M.K.. (Org.). **Fauna silvestre - quem são e onde vivem os animais na metrópole paulistana**. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 2007.

MAKINO, Y.; TADANO, M.; SAITO, M.; MANEEKARN, N.; SITTISOMBUT, N.; SIRISANTHANA, V.; PONEPRASERT, B.; FUKUNAGA, T.. Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. **Microbiol. Immunol**., 38(12), 1994. pp. 951-955.

MALE, T.. Potential impact of *West Nile Virus* on American avifaunas. **Conserv. Biol.** v.17, 2003. pp. 928–930.

MAZZEI, K.; COLESANTI, M.T.M.; SANTOS, D.G.. Áreas verdes urbanas, espaços livres para o lazer. **Sociedade & Natureza**, 19(1), 2007.

McLEAN, R.G.; MULLENIX, J.; KERSCHNER, J.; HAMM, J.. The house sparrow (Passer domesticus) as a sentinel for St. Louis encephalitis virus. **Am J Trop Med Hyg.,** 32(5), 1983. pp. 1120-9.

McLEAN, R.G.; UBICO, S.R.; DOCHERTY, D.E.; HANSEN, W.R.; SILEO, L.; McNAMARA, T.S.. *West Nile Virus* transmission and ecology in birds. **Ann N Y Acad Sci.**, v.951, 2001. pp. 54–7.

MEDEIROS-SOUSA, A.R.; CERETTI-JR, W.; URBINATTI, P.R.; NATAL, D.; CARVALHO, G.C.; PAULA, M.B.; FERNANDES, A.; MELLO, M.H.H., OLIVEIRA, R.; ORICO, L.; GONÇALVES, E.; MARRELLI, M.T. Biodiversidade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos parques da cidade de São Paulo. **Biota Neotropica**, 13(1), 2013, 13(1). pp. 000-000.

MELLO-THÉRY, N.A.. Conservação de áreas naturais em São Paulo. **Estudos Avançados,** 25(71), 2011.

MENDONÇA, L.B.; dos ANJOS, L.. Beija-flores (Aves, Trochilidae) e seus recursos florais em uma área urbana do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22 (1), 2005. pp. 51-59.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K.. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, 1(1), 2005.

MONATH, T.P.. Flaviviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.. **Virology**. 2 ed. New York: Raven Press, 1990.

MONATH, T.P.; Yellow fever: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, 1(1), 2001. pp. 11-20.

MONTES, J.. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 39(4), 2005.

MORALES, M.A.; BARRANDEGUY, M.; FABBRI, C.; GARCIA, J.B.; VISSANI, A.; TRONO, K,; GUTIERREZ, G.; PIGRETTI, S.; MENCHACA, H.; GARRIDO, N.; TAYLOR, N.; FERNANDEZ, F.; LEVIS, S.; ENRIA, D.. *West Nile Virus* isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases,** 12(10), 2006.

MORENO, E.S.; ROCCO, I.M.; BERGO, E.S.; BRASIL, R.A.; SICILIANO, M.M.; SUZUKI, A.; SILVEIRA, V.R.; BISORDI, I.; SOUZA, R.P..

Reemergence of Yellow Fever: detection of transmission in the state of São Paulo, Brasil, 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**., 44(3), 2011.

MOUREAU, G.; TEMMAM, S.; GONZALEZ, J.P.; CHARREL, R.N.; GRARD, G.; de LAMBALLERIE, X.. A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, 7(4), 2007.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G.. A structural perspective os the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology** 3, 2005. pp 13-22.

NASH, D.; MOSTASHARI, R.; FINE, A.; MILLER, J.; O'LEARY, D.; MURRAY, K.; HUANG, A.; ROSENBERG, A.; GREENBERG, A.; SHERMAN, M.; WONG, S.; LAYTON, M.. The outbreak of *West Nile Virus* infection in the New York city area in 1999. **The New England Journal of Medicine**, 344(24), 2001.

NEMETH, N.; GOULD, D.; BOWEN, R.; KOMAR, N.. Natural and experimental West Nile Vírus infection in five raptor species. **Journal of Wildlife Diseases,** 42(1), 2006. pp. 1-13.

NEWTON, I.. **Bird Migration**. London: Collins, 2010.

NUNES, M.F.C.; LACERDA, R.; ROOS, A.; COSTA, J.. **Aves migratórias na Amazônia e a gripe aviária**. Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres (CEMAVE), 2006. Disponível em http://vivamarajo.org.br. Acesso em 5 de abril de 2013.

OHAJURUKA, O.A.; BERRY, R.L.; GRIMES, S.; FARKAS, S.. *West Nile Virus* detection in kidney, cloacal, and nasopharyngeal specimens**.** **Emerging Infectious Diseases**, 11(9), sep, 2005.

OSANAI, C.H.. **A epidemia de dengue em Boa Vista, território federal de Roraima, 1981-1982**. Rio de Janeiro, 1984. [Dissertação de Mestrado], Escola Nacional de Saúde Pública.

PARSON, W.; PEGORARO, K.; NIEDERSTATTER, H.; FOGER, M.; STEINLECHNER, M.. Species identification by means of the cytochrome B gene. **Int. J. Legal Med**., v.114, 2000.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; VARELLA, R.B.. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. **Rev. Bras. Epidemiol.,** 11(3), 2008. pp.463-472.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; MORALES, M.A.; LEVIS, S.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.; NOGUEIRA, M.F.; SILVA, E.E.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.. Neutralising antibodies for *West Nile Virus* in horses from Brazilian Pantanal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 106(4), 2011.

PEREIRA, L.E.; SUZUKI, A.; COIMBRA, T.L.M.; de SOUZA, R.P.; CHAMELET, E.L.B.. Arbovirus Ilhéus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). **Rev. Saúde Pública**, 35(2), 2001. pp.119-123.

PETERSEN, L.R.; ROEHRIG, J.T.. *West Nile Virus*: A Reemerging Global Pathogen. **Rev Biomed**., v.12, 2001. pp.208-216.

PETERSON, A.T.; KOMAR, N.; KOMAR, O.; NAVARRO-SIGÜENZA, A.; ROBBINS, M.B.; MARTÍNEZ-MEYER, E.. West Nile Vírus in the New World: potential impacts on bird species. **Bird Conservation International**, v.14, 2004. pp. 215-232.

PMSP – Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. **Unidades de Conservação: Área de Proteção Ambiental Bororé Colonia**., s/d a. Disponível em < http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/unid_de_conservacao/apa_bororecolonia/index.php?p=41963%29>. Acesso em 03 de janeiro de 2013.

PMSP – Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. **Divisão de Fauna**., s/d b. Disponível em < http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/meio_ambiente/servicos/fauna/index.php?p=3391>. Acesso em 6 de maio de 2013.

PMSP – Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal de Planejamento. **Histórico Demográfico do Município de São Paulo**., s/d c. Disponível em http://sempla.prefeitura.sp.gov.br/historico/. Acesso em 8 de julho de 2013.

PMSP – Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Secretaria Municipal do Planejamento. **Atlas Ambiental do Município de São Paulo,** 2000. Disponível em <http://atlasambiental.prefeitura.sp.gov.br>. Acesso em 03 de janeiro de 2013.

PONTES, R.J.S.; RUFFINO-NETTO, A.. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Rev. Saúde Pública**, 28 (3), 1994.

PRINCE, H.E.; TOBLER, L.H.; LAPÉ-NIXON, M.; FOSTER, G.A.; STRAMER, S.L.; BUSCH, M.P.. Development and persistance of West Nile Vírus specific immunogloblulin M (IgM), IgA and IgG in viremic blood donors. **Journal of Clinical Microbiology**, 43 (9), 2005. pp. 4316-4320.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C.. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1 ed. [S.l]: Artmed, 2005.

REED, K.D.; MEECE, J.K.; HENKEL, J.S.; SHUKLA, S.K.. Birds, Migration and Emerging Zoonoses:*West Nile Virus*, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens**. Clinical Medicine & Research**, 1(1), 2003. pp. 5–12.

REISEN, W.; LOTHROP, H.; CHILES, R.; MADON, M.; COSSEN, C.; WOODS, L.; HUSTED, S.; KRAMER, V.; EDMAN, J.. *West Nile Virus* in California. **Emerg Infect Dis**., 10(8), 2004. pp. 1369–1378.

REISEN, W.K.. Human demography, environmental change and the emergence of arboviruses. **J Earth Sci Climate Change**, 3 (1), 2012.

ROBINSON, W.H..Urban entomology. In: Urban insects and arachnids. [S.l.]: Cambridge University Press, 2005. Disponível em HTTP://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511542718. Acesso em 30 de março de 2013.

ROCCO, I.M.; SANTOS, C.L.S.; BISORDI, I.; PETRELLA, S.M.C.N.; PEREIRA, L.E.; SOUZA, R.P.; COIMBRA, T.L.M.; BESSA, T.A.F.; OSHIRO, F.M.; LIMA, L.B.Q.; CERRONI, M.P.; MARTI, A.T.; BARBOSA, V.M.; KATZ, G.; SUZUKI, A.. St. Louis encephalitis vírus: first isolation from a human in São Paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.,** 47(5), 2005. pp. 281-285.

ROMANO-LIEBER, N.S.; IVERSSON, L.B.. Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Rev. Saúde Pública**, 34(3), 2000.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Instituto Florestal. **Inventário florestal da vegetação natural do Estado de São Paulo**. Imprensa Oficial, 2005.

SÃO PAULO. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Inventário da Fauna do Município de São Paulo. **Diário Oficial [do] Município de São Paulo**, 55(94), 21 mai. 2010a.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Coordenadoria de Educação Ambiental. **Billings**. São Paulo: SMA/CEA, 2010b.

SÃO PAULO. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. **Guia dos parques municipais de São Paulo**. 3 ed, 2012. Disponível em < http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/meio_ambiente/arquivos/publicacoes/guia_dos_parques_3.pdf>. Acesso em 04 de abril de 2013.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAR, K.J.. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, 3 (6), 2008.

SEIDOWSKI, D.; ZIEGLER, U.; VON RONN, J.A.C.; MULLER, K.; HUPPOP, K.; MULLER, T.; FREULING, C.; MUHLE, R.; NOWOTHY, N.; ULRICH, R.G.; NIEDRIG, M.; GROSCHUP, M.H.. West Nile Vírus monitoring of migratory and resident birds in Germany. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, 10(7), 2010.

SICK, H. **Migração de Aves na America do Sul Continental**. Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Centro de Estudos de Migração de Aves. Publicação Técnica n.2, 1983.

SICK, H.. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA, J.R.. **Pesquisa de infecções por Flavivirus da encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológico e isolamento viral.** 2010. Tese (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SIQUEIRA-JÚNIOR, J.B.; VINHAL, L.C.; SAID, R.F.C.; HOFFMANN, J.L.; MARTINS, J.; BARBIRATTO, S.B.; COELHO, G.E.. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. In: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde**. Ministério da Saúde, 2012.

SRIHONGSE, S.; JOHNSON, C.M.. The first isolation of Bussuquara vírus from man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 65(4), 1971. pp. 541-542.

TAUIL, P.L.. Urbanização e ecologia do dengue. **Cad. Saúde Pública**, 17(Suplemento), 2001. pp. 99-102.

TAURO, L.; MARINO, B.; DIAZ, L.A.; LUCCA, E.; GALLOZO, D.; SPINSANTI, L.; CONTIGIANI, M.. Serological detection of St. Louis encephalitis virus and *West Nile Virus* in equines from Santa Fe, Argentina. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 107(4), 2012.

TAYLOR, C.; SIMMONS, R.; SMITH, I.. Development of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate human flaviviruses infections occurring in Australia. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.,** 12 (3), 2005. pp. 371-374.

TRAVASSOS-DA-ROSA, A.P.A.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S.; VASCONCELOS, P.F.C.; PINHEIRO, F.P.. Arboviroses. In: LEÃO, R.N.Q.

(Ed). **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Belém: Cejup: UEPA: Instituto Evandro Chagas, 1997. pp. 207-226.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. **Urban agglomerations**, 2009. Disponível em http://www.unpopulation.org. Acesso em 23 de março de 2013.

URBINATTI, P.R.; SENDACZ, S.; NATAL, D.. Imaturos de mosquitos (Díptera: Culicidae) em parque da área metropolitana aberto à visitação pública. **Rev. Saúde Pública**, 35(5), 2001.

USTERI, A.. **Flora der Umgebung der Stadt São Paulo**. Jena, Gustav Fischer, 1911. 271 p.

VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; SOLOMON, T.; KALAYANAROOJ, S.; DUNG, N.M.; KNEEN, R.; CUZZUBBO, A.; DEVINE, P.L.. Rapid serologic diagnosis of dengue vírus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., 60(4), 1999. pp 693-698.

VOGEL, P.; KELL, W.M.; FRITZ, D.L.; PARKER, M.D.; SCHOIEPP, R.J.. Early events in the pathogenesis of eastern equine encephalitis in mice. **Am. J. Pathol**., v.166, 2005. pp. 159-171.

WEAVER, S.C.. Vector biology in viral pathogenesis. In: NATHANSON, N.. **Viral Pathogenesis**. New York: Lippincott-Raven, 1997.

WEAVER, S.C.; BARRETT, A.D.T.. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature reviews: Microbiology,** v.2, 2004.

WEAVER, S.C.; REISEN, W.K.. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research** 85, 2010. pp. 328-345.

WHATELY, M.; SANTORO, P.F.; GONÇALVES, B.C.; GONZATTO, A.M.. **Parques Urbanos Municipais de São Paulo: subsídios para a gestão.** São Paulo: Instituto Socioambiental, 2008.

WHO – World Health Organization. *West Nile Virus*. **Fact Sheet** 354, 2011. Disponível em < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>. Acesso em 30 de março de 2013.

WHO – World Health Organization. Yellow fever. **Fact Sheet** 100, 2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/index.html. Acesso em 5 de maio de 2013.

WILLIS, E.; ONIKI, Y.. Levantamento preliminar das aves em 13 área do Estado de São Paulo. **Ver. Bars. Biol.** 41(1): 121-135, 1981.

WITTWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.P.. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **BioTechniques**, v.22, 1997.

WWF. **Quantas espécies estamos perdendo?** s/d. Disponível em < http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/especiais/biodiversidade/quantas_especies_estamos_perdendo/>. Acesso em 10 de julho de 2013.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F.. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, 32 (12), 2004.

APÊNDICE 1 (Ficha de Campo)

PROJETO "PESQUISA DE INFECÇÃO POR FLAVIVIRUS EM AVES SILVESTRES E DOMÉSTICAS PROVENIENTES DE ÁREAS VERDES DE SP"

DATA | HORÁRIO

DATA | HORÁRIO

DATA | HORÁRIO

TÉCNICOS:

ESTAGIÁRIOS:

ID	NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	ANILHA CEMAVE	IDD	SX	C	OF	SG	LOCAL DE CAPTURA	OBS

Lilian Dias Orico

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/9850563231568454
Última atualização do currículo em 26/04/2013

Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Metodista de São Paulo (2007). É funcionária do Setor de Parasitologia do Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores (LABZOO/CCZ/SMS/PMSP) Atuou na área de Medicina Veterinária Preventiva, como funcionária da Divisão de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3/SVMA /PMSP) de 2009 a 2012. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Lilian Dias Orico
Nome em citações bibliográficas	ORICO, L. D.

Endereço

Endereço Profissional	Prefeitura Municipal de São Paulo. Rua Santa Eulália, 86 Santana 04030090 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 33978952

Formação acadêmica/titulação

2011	Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Pesquisa de infecções por Flavivirus em aves silvestres provenientes de áreas verdes do município de São Paulo,Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli. Palavras-chave: Flavivirus; aves silvestres; áreas verdes. Grande área: Ciências Agrárias / Área: Medicina Veterinária / Subárea: Medicina Veterinária Preventiva / Especialidade: Doenças Infecciosas de Animais. Grande Área: Ciências Agrárias / Área: Medicina Veterinária / Subárea: Medicina Veterinária Preventiva / Especialidade: Epidemiologia Animal. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
2003 - 2007	Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Brasil. Título: Investigação Soroepidemiógica para Influenza Aviária em Anseriformes (ganso, pato e marreco) de Parques Municipais de São Paulo. Orientador: Milton Kolber.
2000 - 2002	Ensino Médio (2º grau). Pueri Domus Escolas Associadas.

Mauro Toledo Marrelli

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6872138193111416
Última atualização do currículo em 27/06/2013

Professor Associado do Depto. de Epidemiologia da FSP-USP (desde 2011). Possui Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Mackenzie (1990). Aperfeiçoamento em Protozoologia pelo Instituto de Medicina Tropical (FM-USP, 1992). Mestrado em Parasitologia, pelo ICB, Universidade de São Paulo (1995) e doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) (ICB-USP, 2000). Pós-doutorado pela Case Western Reserve University (Cleveland-OH) (2002), e pela Johns Hopkins School of Public Health (Johns Hopkins University) (Baltimore-MD) (2005). Tem experiência na área de Parasitologia e Epidemiologia de doenças transmitidas por vetores, atuando principalmente nos seguintes temas: ecologia e biologia molecular de vetores, marcadores moleculares em entomologia, controles alternativos de vetores. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Mauro Toledo Marrelli
Nome em citações bibliográficas MARRELLI, M. T.

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Av. Dr. Arnaldo 715
Cerqueira César
01246904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617922