

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA
E MOLECULAR DE *Hepatozoon* spp.
(APICOMPLEXA, HEPATIZOIDEAE) DE SERPENTES
BRASILEIRAS NATURALMENTE INFECTADAS**

Tatiana Cristina Moço

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutora no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e
Aplicada, Área de concentração
Biologia de Parasitas.

*Orientadora: Prof. Dra. Lucia
Helena O'Dwyer*

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA
E MOLECULAR DE *Hepatozoon* spp.
(APICOMPLEXA, HEPATOSOIDAE) DE SERPENTES
BRASILEIRAS NATURALMENTE INFECTADAS

DOUTORANDA: TATIANA CRISTINA MOÇO

ORIENTADORA: PROF. DRA. LUCIA HELENA O'DWYER

CO-ORIENTADORA: DRA. KARINA DOS SANTOS PADUAN

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas*.

Orientadora: Prof. Dra. Lucia Helena O'Dwyer

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Moço, Tatiana Cristina.

Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de *Hepatozoon* spp.
(Apicomplexa, Hepatozoidae) de serpentes brasileiras naturalmente infectadas /
Tatiana Cristina Moço. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências
Biológicas de Botucatu

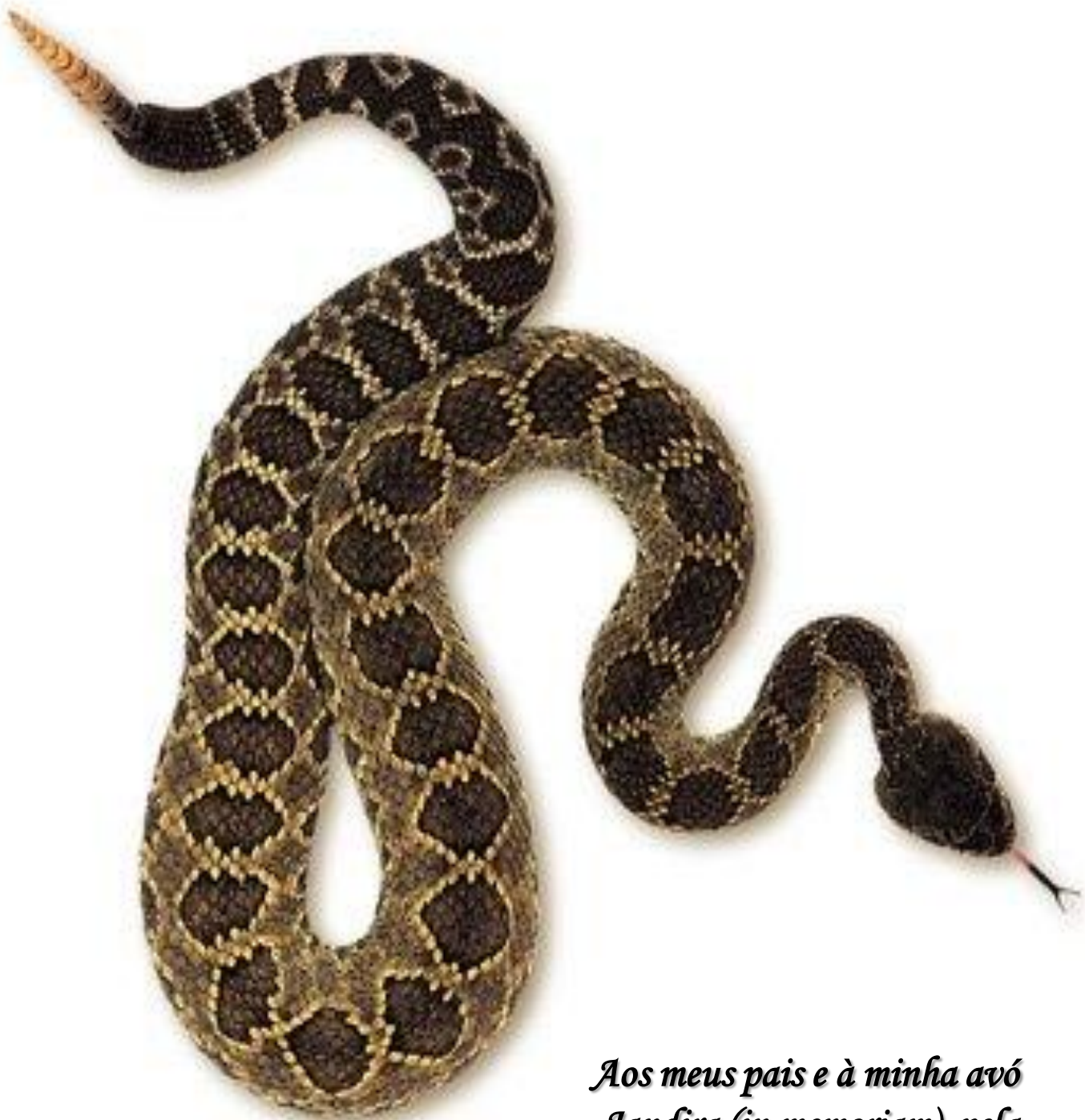
Orientador: Lucia Helena O' Dwyer

Coorientador: Karina dos Santos Paduan

Capes: 21301026

1. Cobra. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Morfologia. 4. Doenças
transmissíveis – Diagnóstico.

Palavras-chave: Caracterização molecular; *Hepatozoon*; Morfologia;
Morfometria; Serpentes brasileiras.



*Aos meus pais e à minha avó
Jandira (in memoriam), pela
confiança, apoio incondicional e
carinho, dedico.*



“Se você deseja, como eu , construir uma sociedade na qual os indivíduos cooperem generosa e desinteressadamente para o bem comum, espere pouca ajuda da natureza biológica. Tentemos ensinar generosidade e altruísmo, porque nascemos egoístas. Compreendamos o que nossos próprios genes egoístas tramam, porque assim, ao menos, poderemos ter a chance de frustrar seus intentos, uma coisa que nenhuma outra espécie jamais aspirou conseguir” (Richard Dawkins)



Agradecimientos

À minha orientadora Lucia, pela ajuda, amizade, paciência e por confiar que seria possível...

À CAPES, pelo apoio financeiro...

Ao professor Reinaldo, pela parceria e amizade ...

Aos professores Newton e Paulo, por , generosamente, cederem seus respectivos laboratórios para que esse estudo pudesse ser realizado...

À minha amiga e co-orientadora Karis e seu esposo, e meu amigo, Barna, pelos risos, cervejas, pela paciência e atenção com que me “aturaram” por anos e pela imprescindível ajuda com a genética molecular...

Aos amigos do Departamento de Parasitologia, em especial, Didica, Lóris, Betina, Naty, Brusa, Berne, Fabi, Samir, Ziquinha, Carine, Leticinha's, Tereza, Valdír, Márcia, Bicho, Salete e Roseli, pela ajuda, amizade e pelos “ouvidos” que deram às minhas reclamações diárias de que “ainda não deu certo” (rs)...

Ao meu “anjo de guarda” e amiga, Nilza, pela ajuda burocrática na Pós, presentes, palavras de incentivo e por toda a força que me deu nesses anos difíceis.

Ao CEVAP, onde tudo começou, e à sua equipe técnica, em especial, Tidei, Pé Redondo, Nathy, Mixa, Pri, Gú, Vinícius, Uruta, Bruna e Rui, pela parceria, amizade, churrascos, “padocas” e muitas risadas...

Ao Diretor do CEVAP Prof. Dr. Benedito Barraviera, pela parceria e confiança...

Aos amigos próximos, em especial, Jú, Animal, Bucha, Rita, Giseles, Kika, Celia (Caminhão Pipa..rs), Godoy, Jé, Dan, Portuga, Peixe, Nathy e Jéssica, pelas cervejas, risadas, amizade e paciência nas eventuais crises de estresse e identidade...rs

Aos amigos distantes, mas não menos queridos, Luciana, Aninha, Marco, Ana Rita, Pinguas, Chris, Xixão, Burts, Carçudo, Éder, Polato, Mê, Neto, Everaldo , Nice, Claudinha, Jussara, Pé de Boi, Vivi, Aruaque, Paulinho, Coruja, Fer, Prima e Régis, por continuarem fazendo a diferença na minha vida...

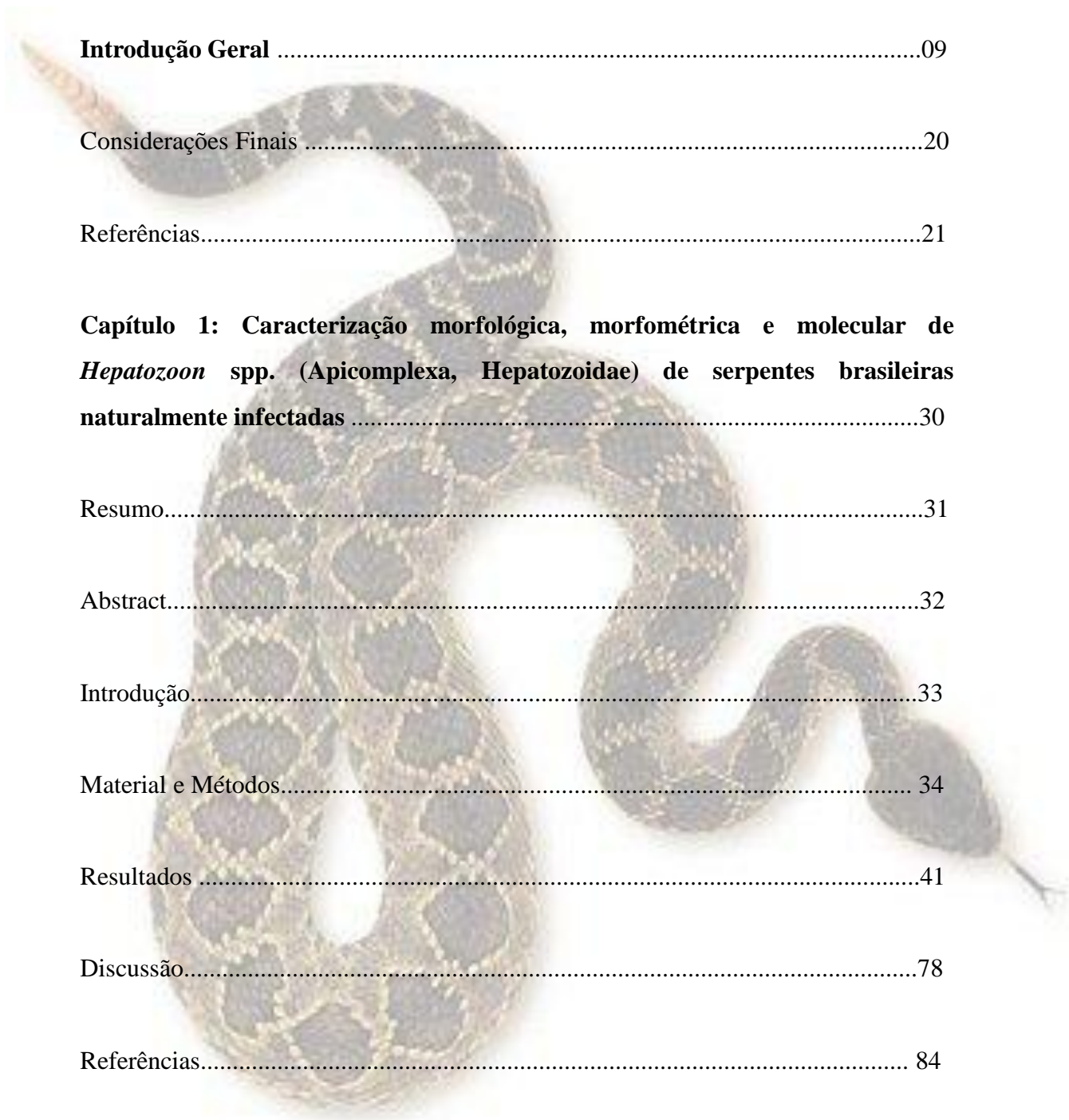
À minha família, Thusa, Gorda , Cabeça e Juninho, pelo apoio e paciência...

Aos meus “amores patudos de focinho de bolinha”(e aos que eu tratei como meus) em especial ao Bicão, pelo amor incondicional...

E, por fim, mas não menos especial, ao “meu querido Kizi”, por todo amor, companheirismo, apoio, paciência, cumplicidade e carinho, mesmo nos momentos em que eu fui “grossa”...



Sumário



Introdução Geral	09
Considerações Finais	20
Referências.....	21
Capítulo 1: Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de <i>Hepatozoon</i> spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) de serpentes brasileiras naturalmente infectadas	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados	41
Discussão.....	78
Referências.....	84
Conclusões Gerais	91



Introdução Geral

Introdução Geral

O termo hemogregarina tem sido utilizado, através de décadas, para descrever coletivamente parasitas sanguíneos pertencentes às subordens Eimeriina e Adeleina do Filo Apicomplexa (Levine et al., 1980), que constituem os mais comuns protozoários hemoparasitas de répteis (Wosniak et al., 1994a).

A subordem Eimeriina inclui os gêneros *Skellackia* (parasitas de répteis e anfíbios), *Lainsonia* (parasitas de répteis) e *Lankesterella* (parasitas de anfíbios). Em Eimeriina, tanto a merogonia como a gametogonia e esporogonia ocorrem no hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado atua apenas como vetor mecânico para a transmissão dos parasitas. Por outro lado, na subordem Adeleina, da qual fazem parte os gêneros *Hepatozoon*, *Haemogregarina*, *Karyolysus* e *Hemolivia*, a gametogonia e a esporogonia ocorrem no vetor e a merogonia no hospedeiro vertebrado (Lane e Mader, 1996).

A classificação taxonômica do gênero *Hepatozoon* se manteve incerta por muitos anos, em grande parte por falta de informações acerca do desenvolvimento esporogônico dos protozoários desse gênero. Até recentemente, devido a similaridade dos gamontes intraeritrocitários de *Haemogregarina* spp., *Karyolysus* spp. e *Hepatozoon* spp., estes parasitas, junto com os demais, estavam agrupados numa única família; Haemogregarinidae. No entanto, a considerável diversidade biológica exibida pelos parasitas nos seus hospedeiros definitivos (vetores) justificou a separação em famílias distintas, dentro do filo Apicomplexa (Barta, 2000). Desta maneira, o gênero *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa; classe Sporozoea; subclasse Coccidia; ordem Eucoccidiida; subordem Adeleina e família Hepatozoidae (Levine et al., 1980).

Haemogregarina spp. não podem ser distinguidas de *Hepatozoon* spp. tendo como base somente a aparência de seus gamontes intraeritrocíticos e merontes tissulares. A identificação genérica é também dependente da natureza do desenvolvimento esporogônico no vetor (Desser et al., 1995).

Em *Hepatozoon* spp., a merogonia ocorre somente nos tecidos do hospedeiro vertebrado, enquanto que em *Haemogregarina* spp., além de ocorrer nos tecidos, a merogonia ocorre também no sangue periférico. *Hepatozoon* spp. têm sua esporogonia ocorrendo na hemocele do vetor e contêm oocistos com vários esporocistos, transmitidos aos vertebrados pela ingestão do invertebrado infectado. Para *Haemogregarina* spp., a esporogonia ocorre no estômago do vetor,

seus oocistos não possuem esporocistos e sua transmissão é feita pela inoculação de esporozoítas via saliva (Desser, 1993).

Hepatozoon spp. podem ser encontrados parasitando anfíbios, répteis, aves e mamíferos, dentre os répteis; lagartos, crocodilianos, tartarugas e serpentes (Smith, 1996). Em serpentes terrestres ocorrem, principalmente, espécies do gênero *Hepatozoon*, enquanto que em répteis aquáticos predominam as do gênero *Haemogregarina* e em lagartos do velho mundo e serpentes arborícolas, as do gênero *Karyolysus* (Campbell, 1996).

Os principais vetores invertebrados de *Hepatozoon* spp. são mosquitos, mosquito-palha, moscas tse-tse, triatomíneos, piolhos, pulgas e ácaros (Smith, 1996). Há, também, relatos de sanguessugas atuando como vetores destes parasitas (Pessoa e Cavalheiro, 1969b,c; Smith, 1996).

Hepatozoon spp. são protozoários heteroxenos (Wosniak et al., 1994a) que apresentam ciclo evolutivo típico dos coccídios. Micro e macrogamontes são ingeridos pelo vetor hematófago, juntamente com o sangue do hospedeiro vertebrado, e migram para a sua parede intestinal, onde ocorre a gametogênese. Um microgamonte dará origem a quatro microgametas uniflagelados que, por singamia, fecundarão os macrogametas, originados de macrogamontes, formando um zigoto, que tem rápido crescimento (Bashtar et al., 1991). Este atravessa a parede intestinal, indo localizar-se na hemocele do vetor hematófago onde ocorre a formação do oocisto, contendo muitos esporocistos com esporozoítas. O hospedeiro vertebrado adquire a infecção por *Hepatozoon* spp. pela ingestão direta do vetor portador do oocisto, ou indiretamente, através da ingestão de outros hospedeiros paratênicos vertebrados, como peixes, anfíbios e répteis, que tenham ingerido vetores hematófagos infectados. Os esporozoítas contidos nos esporocistos são liberados no intestino desse hospedeiro intermediário, podendo seguir para os hepatócitos, formando um cistozoíto, ou iniciar o primeiro ciclo merogônico que ocorre na parede intestinal da serpente. Dois tipos de merontes são formados: um contendo macromerozoítos que, transportados via sangue ou linfa, invadem novos tecidos, dando origem a novas formas merogônicas, e outro, contendo micromerozoítos, que irão penetrar nos eritrócitos, sofrer gamontogonia e dar origem aos gamontes circulantes, infectivos para os vetores hematófagos (Smith, 1996; Baneth et al., 2007).

Hepatozoon spp. são, aparentemente, bem adaptados, causando pouca ou nenhuma patologia a seus hospedeiros naturais (Telford, 1984). Entretanto, a manutenção desses répteis em cativeiro pode proporcionar ótimas condições para a transmissão desses parasitas (Hull e Camin, 1960). Nos sistemas de cativeiro semi-extensivo, um grande número de serpentes mantido junto pode proporcionar uma proliferação de artrópodes vetores em potencial. Outro fator importante a se

considerar é a existência de transmissão vertical em *Hepatozoon* spp. (De Biasi et al., 1971, 1972). Por outro lado, em muitas serpentes mantidas em cativeiro, a parasitemia tende a se estabilizar e até mesmo diminuir sensivelmente (Santos et al., 2005).

Apesar destes parasitas serem considerados bem adaptados, Mader (1996) relatou que, em infecções com altas parasitemias, pode-se observar quadros de anemia hemolítica e que não há informações sobre quimioterápicos efetivos contra *Hepatozoon* spp. Merontes também foram encontrados no cérebro de um exemplar de *Crotalus* sp., que apresentou problemas neurológicos em cativeiro (Wosniak et al., 1994a).

Em hospedeiros não naturais, essa infecção tem potencial de causar doenças inflamatórias clinicamente significativas, dentre elas: hepatite necrotizante, pancreatite e esplenite (Pessoa et al., 1974c; Wosniak e Telford, 1991, Wosniak et al., 1996).

Wosniak et al. (1994a) descreveram os estágios evolutivos, nos hospedeiros vertebrados, de uma espécie de hemogregarina que infecta *Crotalus cerastes cerastes*, do deserto do Mojave e também encontraram duas formas merogônicas nos seus tecidos. Os gamontes encontrados provocavam hipertrofia eritrocítica e dehemoglobinação, mas não observaram evidências de processos inflamatórios associados com a presença dos merontes.

O'Dwyer et al. (2004a) observaram um alto parasitismo por *Hepatozoon* sp. em um exemplar de *C. durissus terrificus*, que veio a óbito em poucos dias.

Madsen et al. (2005) observaram que o parasitismo por *Hepatozoon* sp. provocou uma significativa redução no crescimento de *Liasis fuscus* na natureza. Além disso, os parasitas diminuíram o rendimento reprodutivo das fêmeas infectadas. Estes estudos demonstram que o impacto do parasitismo por *Hepatozoon* spp. em serpentes pode não ser observado por meio de doença aparente, mas pode ser muito importante na ecologia das espécies.

Miyamoto e Mello (2007) estudaram a relação entre a infecção por *Hepatozoon* spp., a incidência da fragmentação do DNA e conseqüente morte de eritrócitos em *C. durissus terrificus*. Os resultados apontaram um aumento da fragmentação do DNA e condensação da cromatina típica de eritrócitos mortos na circulação, sugerindo que tal infecção acelere a destruição de eritrócitos nessa espécie de serpente, afetando não somente as células parasitadas como também células normais.

O fato de seu potencial patogênico quando em hospedeiros não naturais e as proporções significativas que essa parasitose pode ganhar em condições de cativeiro, quando não há um rígido controle parasitológico, justifica a necessidade de um bom diagnóstico para evitar a disseminação

da doença dentro do criadouro. Geralmente, o diagnóstico é feito pela análise do sangue periférico corado por Leishman ou May-Gruenwald-Giemsa (Campbell, 1996; Moço et al., 2002, 2011; O'Dwyer et al., 2003, 2004). Métodos diagnósticos mais modernos incluem a avaliação do sangue pela técnica de Reação de Polimerização em Cadeia - PCR (Wozniak et al., 1994b; Rubini et al., 2005; Moço et al., 2011).

Estudos sobre a frequência de *Hepatozoon* spp. em serpentes brasileiras indicam que estes parasitas são bastante comuns no nosso país (Pessoa et al., 1974a; O'Dwyer et al., 2003; Moço, 2008).

Até 1996, 121 espécies de *Hepatozoon* de serpentes eram mundialmente reconhecidas (Smith, 1996). Entretanto, muitas dessas espécies foram caracterizadas, especialmente no Brasil, utilizando somente a morfologia dos gamontes e a presença em determinada espécie de serpente (Tabela 1). Após 1996, várias outras espécies de *Hepatozoon* foram descritas infectando serpentes (Telford et al., 2001; 2002; 2005a,b; Sloboda et al., 2007). Por outro lado, gamontes de *Hepatozoon* spp. com morfologias diferentes dos já relatados têm sido observados, mas não nomeados, por falta de dados morfológicos e biológicos mais completos ou por falta de caracterização molecular (Moço et al., 2002, 2011; O'Dwyer et al., 2004a,b, 2011).

O critério taxonômico para identificação de *Hepatozoon* spp. tem se baseado, principalmente, na caracterização morfológica dos gamontes, no sangue do hospedeiro vertebrado, e dos estágios esporogônicos, no hospedeiro invertebrado. Contudo, a semelhança entre os oocistos e entre os gamontes de diversas espécies de *Hepatozoon* torna difícil a identificação baseada somente nessas características (Pessoa e De Biasi, 1973a,b; Moço et al. 2002, 2011). Assim, como várias descrições tiveram como base somente a espécie do hospedeiro, uma mesma espécie de *Hepatozoon* pode ter recebido vários nomes, de acordo com a espécie de serpente em que foi encontrado.

Como a grande maioria dos trabalhos descritivos sobre *Hepatozoon* spp. de serpentes brasileiras trazia somente informações sobre morfologia dos gamontes (formato, coloração, presença de cápsula) e dados morfométricos (que, geralmente, limitavam-se à descrição do comprimento e largura dos gamontes e cistos), outras variáveis como medidas de área do parasita e do seu núcleo têm sido utilizadas, assim como, metodologias empregando técnicas moleculares (Telford et al., 2004; Rubini et al., 2005; Moço et al., 2011) e sistemas computacionais de análise de imagens para a biometria dos parasitas (Moço et al., 2002, 2011; O'Dwyer et al., 2011).

Tabela 1. *Hepatozoon* spp. descritas/relatadas em serpentes brasileiras.

<i>Hepatozoon</i> sp.	Hospedeiro vertebrado	Referência
<i>H. juxtannuclearis</i>	<i>Boa constrictor</i>	Carini (1947) / Pessoa (1967b)
<i>H. fusifex</i>	<i>Boa constrictor</i>	Ball et al. (1969)
<i>H. terzii</i>	<i>Boa constrictor</i>	Sambon e Seligmann (1907) / Moço et al. (2002)
<i>H. luhei</i>	<i>Corallus</i> spp.	Sambon (1907) apud Sambon (1909) / Pessoa et al. (1970a)
<i>H. cenchridis</i>	<i>Epicrates cenchria</i>	Phisalix (1931a) / Pessoa e Cavalheiro (1969a)
<i>H. shattocki</i>	<i>Morelia spilotes</i>	Sambon e Seligmann (1907)
<i>H. laevicolis</i>	<i>Chironius laevicolis</i>	Pessoa (1967c)
<i>H. bicarinatus</i>	<i>Chironius bicarinatus</i>	Pessoa e Cavalheiro (1969b)
<i>H. chironiui</i>	<i>Chironius</i> spp.	Pessoa (1967a)
<i>H. rarefaciens</i>	<i>Drymarchon corais</i>	Sambon e Seligmann (1907)
<i>H. colubri</i>	<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	Börner (1901) apud Sambon(1909) / Pessoa (1967c)
<i>H. carinicauda</i>	<i>Helicops carinicauda</i>	Pessoa e Cavalheiro (1969c)
<i>H. modesta</i>	<i>Helicops modestus</i>	Pessoa e Cavalheiro (1969c) / Brumpt (1914)
<i>H. migonei</i>	<i>Hydrodynastes gigas</i>	Schouten (1934) / Pessoa et al. (1970c) / Moço et al. (2002)
<i>H. cyclagrasii</i>	<i>Hydrodynastes gigas</i>	Arantes (1934) / Pessoa et al. (1970c) / Moço et al. (2002)
<i>H. miliaris</i>	<i>Liophis miliaris</i>	Pessoa (1968)
<i>H. leimadophisi</i>	<i>Liophis poecilogyrus</i>	Pessoa (1967a)
<i>H. poecilogyrus</i>	<i>Liophis poecilogyrus</i>	Pessoa (1967a)
<i>H. drymobii</i>	<i>Mastigodryas bifossatus</i>	Marullaz (1912) / Lutz (1901)/ Pessoa (1967d)
<i>H. philodryasi</i>	<i>Philodryas patagoniensis</i>	Carini (1910) / Pessoa (1967b) / Pessoa e Cavalheiro (1969b) / Moço et al. (2002)
<i>H. pseudoboae</i>	<i>Pseudoboa nigra</i>	Pessoa (1967b)
<i>H. pullatus</i>	<i>Spilotes pullatus</i>	Pessoa (1968)
<i>H. strigatus</i>	<i>Thamnodynastes strigatus</i>	Pessoa (1967b) /Pessoa et al. (1970b)
<i>H. butantanensis</i>	<i>Waglerophis merremi</i>	Arantes (1931)
<i>H. arantesi</i>	<i>Waglerophis merremi</i>	Pessoa (1967a)
<i>H. raulei</i>	<i>Rhinocerothis alternatus</i>	Phisalix e Laveran (1913)
<i>H. plimmeri</i>	<i>Bothrops jararaca</i>	Sambon (1907) apud Sambon (1909) / De Biasi et al. (1989) / Pessoa (1967c)
<i>H. plimmeri</i>	<i>Bothrops moojeni</i>	Pessoa et al. (1971a)
<i>H. jararacussu</i>	<i>Bothrops jararacussu</i>	Pessoa (1968)
<i>H. crotali</i>	<i>Crotalus durissus cascavella</i>	Pessoa (1967e)
<i>H. romani</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Phisalix (1931b) /Pessoa (1967e)
<i>H. capsulata</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Phisalix (1931b) /Pessoa (1967e)

As serpentes brasileiras são parasitadas por, aparentemente, uma grande variedade de gamontes de *Hepatozoon* spp., principalmente ao se tratar de parasitas de *C. durissus terrificus*, pois além das espécies já descritas; *Hepatozoon romani* e *Hepatozoon capsulata* (Phisalix, 1931b), foram diagnosticados vários gamontes que diferiam destes, sugerindo a possibilidade de, futuramente, serem caracterizados como novas espécies, bem como uma subestimação de dados, já que o número de espécies desse gênero infectando esta espécie de serpente pode ser maior do que o descrito (Moço et al., 2002, 2011; O'Dwyer et al., 2004a,b, 2011).

Moço et al. (2002) observaram um exemplar de *C. durissus terrificus* infectado com *Hepatozoon* sp. cujos gamontes apresentavam corpo afilado e alongado, citoplasma claro, sem granulações e núcleo denso e homogêneo, localizado centralmente ou ligeiramente deslocado para uma das extremidades, distintos dos descritos em literatura para essa espécie de serpente.

Uma pequena espécie de *Hepatozoon*, encontrada em outro espécime de *C. durissus terrificus*, foi descrita por O'Dwyer et al. (2004a). Seus gamontes eram menores dos que os usuais, com citoplasma claro, sem granulações e núcleo grande ocupando boa parte do citoplasma, alterando acentuadamente as hemácias infectadas. Foi comum encontrar hemácias parasitadas com mais de dois gamontes (no máximo seis gamontes por eritrócito).

Além destas formas, várias outras têm sido encontradas em exemplares de *C. durissus terrificus* (O'Dwyer et al., 2011). É comum, também, serem observados vários gamontes com morfologia e morfometria diferentes em um mesmo espécime de serpente. O'Dwyer et al. (2004b) encontraram até cinco tipos distintos de gamontes em um espécime de *C. durissus terrificus*. Especula-se se seriam diferentes espécies ou a mesma espécie em diferentes estágios de desenvolvimento.

Outro fator a ser considerado é a baixa especificidade aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, assim, uma mesma espécie de *Hepatozoon* pode parasitar mais de uma espécie de serpente, e uma única serpente pode ser parasitada por mais de uma espécie de *Hepatozoon* (Smith, 1996). Pessoa et al. (1974b) obtiveram sucesso na transferência de *Hepatozoon tupinambis*, parasita de *Tupinambis teguixin*, para um exemplar de *C. durissus terrificus*, por intermédio do mosquito *Culex fatigans* e observaram que o parasita manteve seus caracteres morfológicos no animal receptor.

Poucos trabalhos da literatura descreveram detalhadamente a morfologia e morfometria dos parasitas. Na maioria desses trabalhos foram medidos apenas o comprimento e a largura dos gametócitos e o diâmetro dos oocistos. Moço et al. (2002) realizaram análises morfológicas e

morfométricas detalhadas de cinco espécies de *Hepatozoon* de serpentes e conseguiram observar três grupos distintos baseados unicamente nestas características.

Vários estudos sobre a evolução esporogônica e merogônica em *Hepatozoon* spp. vêm sendo conduzidos ao longo dos anos. Ball et al. (1967) estudaram o desenvolvimento esporogônico de *Hepatozoon rarefasciens*, de *Drymarchon corais*, em mosquitos *Culex tarsalis*, *Anopheles albimanus* e *Aedes sierrensis*. Bashtar et al. (1991) conduziram estudos sobre esporogonia de *Hepatozoon mehlhorni*, de *Echis carinatus*, em *Culex pipiens*. Lowichik et al. (1993) estudaram a esporogonia de *Hepatozoon mocassini*, de *Crotalus horridus atricaudata*, em *Aedes aegypti*.

Telford et al. (2005a) descreveram *Hepatozoon priapus* e *Hepatozoon confusus*, parasitas de *Coluber constrictor priapus*, baseando-se na morfologia e morfometria das fases esporogônicas e esquizogônicas do parasita.

Hussein (2006) encontrou duas formas distintas de gamontes no sangue do lagarto *Ptyodactylus hasselquistii*, bem como duas formas merogônicas em seus tecidos: uma de dimensões menores, contendo quatro macromerozoítos, em média; e outra, de dimensões maiores, contendo uma média de 11,5 micromerozoítos.

Sloboda et al. (2007) descreveram *Hepatozoon ayorgbor*, parasita de *Python regius*, e obtiveram sucesso na infecção experimental de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. Os autores também conseguiram completar o ciclo de vida desse parasita, infectando um exemplar juvenil de *P. regius* através da ingestão dos mosquitos infectados e testar a especificidade de hospedeiro transferindo a nova espécie para *Boa constrictor*, *Lamprophis fuliginosus* e para o lagarto *Lepidodactylus lugubris*.

Experimentalmente, mosquitos (Culicidae) têm sido considerados bons vetores na transmissão de *Hepatozoon* spp. para serpentes (Pessoa et al., 1970a,b,c, 1971a,b, 1974b,c; Pessoa e De Biasi, 1972, 1973a,b, 1974; Bashtar et al., 1991; Wozniak e Telford, 1991; Lowichik et al., 1993; Smith, 1996; Lainson et al., 2003; Sloboda et al., 2007). Entretanto, naturalmente, serpentes não se alimentam de mosquitos e para a maioria das espécies que não se alimenta de anfíbios e répteis, é pouco provável que estes sejam os principais vetores envolvidos na epidemiologia da infecção. Tal fato nos remete aos ácaros (mesostigmatas e ixodídeos), importantes ectoparasitas de serpentes, dada a particularidade de seus hábitos alimentares; parasitando mamíferos, anuros e outros répteis, que representam presas da maioria das espécies de serpentes. Apesar da grande importância dessas espécies no parasitismo de répteis e anuros, são raros os estudos que utilizaram esses vetores para analisar aspectos biológicos e transmissão de patógenos em serpentes. O'Dwyer et al. (2002a)

tentaram a infecção experimental de *Amblyomma rotundatum* por *Hepatozoon* sp. de *C. durissus terrificus*, mas não obtiveram sucesso.

No Brasil, a esquizogonia e a esporogonia de *Hepatozoon* spp. de serpentes vem sendo pesquisadas desde meados da década de setenta, desde então, várias espécies de serpentes foram utilizadas para tal propósito. As infecções experimentais de parasitas de serpentes terrestres foram feitas, geralmente, em mosquitos *C. fatigans* e *Culex dolosus*, e as de serpentes semi-aquáticas, nas sanguessugas *Haementeria lutzii* e *Haementeria gracilis* (Pessoa e Cavalheiro, 1969b,c; Pessoa et al., 1970a,b,c, 1971a,b, 1974b,c; Pessoa e De Biasi, 1972, 1973a,b, 1974).

Infectando experimentalmente *Hepatozoon terzii*, parasita de *B. constrictor amarali*, em mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, O'Dwyer et al. (2002b) também conduziram análises dos gamontes e estágios esporogônicos destes parasitas, embora a tentativa de infecção experimental, utilizando a primeira espécie de mosquito, tenha falhado.

Paperna e Lainson (2003) estudaram a ultraestrutura de cistos esporogônicos de *Hepatozoon caimani*, de *Caiman crocodilus*, e de *H. terzii*, de *B. constrictor*, em mosquitos *C. quinquefasciatus*.

O'Dwyer et al. (2011) também descreveram os estágios gamontogônico e esporogônico de três exemplares de *C. durissus terrificus*, infectando experimentalmente *C. quinquefasciatus* e visualizando a evolução do parasita no mosquito.

Contudo, a semelhança entre os oocistos e entre os gamontes de diversas espécies de *Hepatozoon* torna os dados insuficientes para identificação dessas espécies (Pessoa e De Biasi, 1973a,b; Moço et al., 2002, 2011). Vale ressaltar ainda a possibilidade de uma mesma espécie apresentar características morfológicas e morfométricas diferentes em hospedeiros diversos (Ball, 1970).

É fato que as análises morfológicas e morfométricas dos estágios de vida do parasita podem auxiliar na caracterização das espécies de *Hepatozoon* de serpentes, porém, não são suficientes para se diferenciar, com certeza, as espécies existentes (Moço et al., 2002, 2011). Dessa forma, os pesquisadores foram obrigados a lançar mão de métodos moleculares (PCR) para caracterizar geneticamente tais parasitas (Wozniak et al., 1994b; Rubini et al., 2005; Moço et al., 2011).

Assim, a pequena subunidade nuclear do DNA ribossomal (rDNA) tem sido extensamente utilizada para inferir as relações filogenéticas de uma diversidade de protozoários (Schlegel, 1991).

Os primeiros estudos sobre caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. de serpentes foram conduzidos por Wozniak et al. (1994b). Os autores conseguiram amplificar uma região do rDNA de cinco diferentes isolados de *Hepatozoon*. A PCR demonstrou padrões específicos de bandas, obtidas

de diferentes hospedeiros, demonstrando que estas espécies podem ser molecularmente diferenciadas pelo sequenciamento do locus rDNA. Os oligonucleotídeos utilizados, 18AP853.F e 18AP1488.R, foram desenvolvidos a partir da sequência de rDNA dos genes estruturais 18S de *Plasmodium* e *Babesia*.

Navajas et al. (1999) consideram as regiões 18S, 5.8S e 28S do rDNA como muito conservadas, evoluindo muito lentamente na sequência e quase nada em comprimento, sendo, assim, inapropriadas para o estudo de polimorfismos em nível intraespecíficos e apontando as regiões com conservadorismo intermediário (ITS 1 e ITS 2) como particularmente úteis para estudos em nível genérico e/ou interespecíficos (Figura 1).

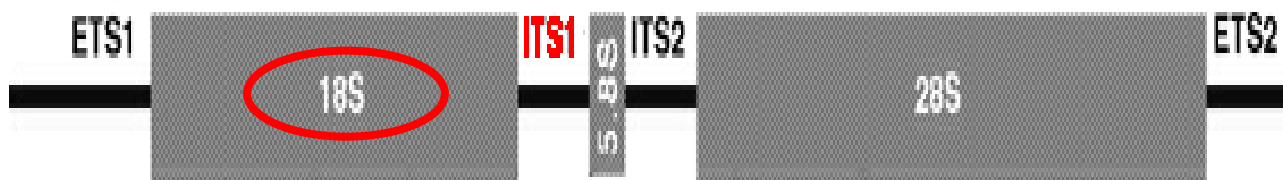


Figura 1. Subunidades do DNA ribossomal: 18S – 18S rDNA; 5.8S – 5.8S rDNA; 28S – 28S rDNA; ETS – Espaçador Externo Transcrito; ITS – Espaçador Interno Transcrito

Smith et al. (1999) conduziram estudos a fim de inferir as relações filogenéticas de espécies de *Hepatozoon* de serpentes e rãs de Ontário, Canadá, considerando sequências da região do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1), que amplificaram a região ITS-1 utilizando um oligonucleotídeo com o sítio de ligação do final 3' do gene 18S rDNA e um oligonucleotídeo reverso com sítio de ligação do final 5' do gene 5.8S rDNA e associaram os resultados a estudos morfológicos e morfométricos.

Apesar das considerações feitas por Navajas et al. (1999), muitos autores utilizaram o fragmento 18S rDNA para caracterizar espécies do gênero *Hepatozoon* e fazer inferências filogenéticas (Baneth et al., 2000; Perkins e Keller, 2001; Inokuma et al., 2002; Rubini et al., 2005).

Perkins e Martin (1999) avaliaram que os oligonucleotídeos desenvolvidos por Wozniak et al. (1994b) não são específicos para hemogregarinas e amplificam também os genes SSU rDNA dos hospedeiros vertebrados, quando o DNA é extraído do sangue. Assim, Perkins e Keller (2001) desenvolveram novos oligonucleotídeos para caracterização de *Hepatozoon* spp. de serpentes: HEMO 1 e outro específico para parasitas do filo Apicomplexa, HEMO 2.

Mathew et al. (2000) estudaram a relação filogenética entre algumas espécies de *Hepatozoon* levando em consideração características moleculares, morfológicas e biológicas. Os autores sequenciaram regiões do gene 18S rDNA de *Hepatozoon americanum* e *Hepatozoon canis*, que infectam cães, e *Hepatozoon catesbiana*, de anfíbios, utilizando os mesmos oligonucleotídeos de Medlin et al. (1988), Wozniak et al. (1994b), e novos outros, dentre eles, 4558 /2733, 4374/ 2733 e 4558/ 4559, desenhados. Entretanto, extraíram o DNA dos oocistos encontrados nos vetores, portanto, com pequena ou nenhuma contaminação de células do hospedeiro. De acordo com os autores, *H. americanum*, *H. canis* e *H. catesbiana* formam um grupo monofilético, sendo que as duas espécies que infectam cães foram consideradas espécies irmãs, com identidade de 96,4%.

No Japão, Inokuma et al. (2002) caracterizaram a espécie de *Hepatozoon* de cães que ocorre naquele país utilizando os oligonucleotídeos HepF e HepR, desenhados para amplificar uma sequência parcial do gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp., baseados nos dados de alinhamento para *H. canis* (AF176835), *H. americanum* (AF176836) e *H. catesbiana* de anfíbios (AF176837). Os autores relataram que as duas amostras estudadas possuíam sequências idênticas e foram intimamente relacionadas com *H. canis* de Israel, com 99% de identidade e foram depositados no *Genbank* sob o número AF418558. Tanto *H. americanum* quanto *H. catesbiana* estavam relacionados distantemente com a amostra japonesa, com 94% e 91% de identidade, respectivamente. Os autores concluíram que a amostra de *Hepatozoon* encontrada no Japão deve ser uma variação da cepa de *H. canis*.

Ujvari et al. (2004) também utilizaram técnicas moleculares para diagnosticar a infecção por *Hepatozoon* sp. em *L. fuscus*, lançando mão dos oligonucleotídeos HepF300 e Hep900, encontrando uma alta taxa de infecção. Contudo, os autores não nomearam a espécie de *Hepatozoon*, pois observaram a mesma sequência de nucleotídeos em outras quatro espécies de répteis e por não possuírem outros dados biológicos do protozoário. Os autores sugeriram que uma mesma espécie de *Hepatozoon* tem capacidade de infectar hospedeiros de diferentes famílias.

Telford et al. (2004) compararam isolados de DNA de hemogregarinas, morfológicamente semelhantes, de quatro espécies de serpentes do nordeste da Flórida, isolados de *Hepatozoon sauritus*, parasita de *Thamnophis sauritus sackenii*, da região sudeste da Flórida e isolados de *Hepatozoon sirtalis*, estes morfológicamente distintos, também do Nordeste da Flórida. Para tal, utilizaram os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2, desenhados por Perkins e Keller (2001). O alinhamento da sequência de nucleotídeos de 530 pares de bases (pb) do gene 18S rDNA revelou dois haplótipos de hemogregarinas. Estes dados indicam a existência de dois grupos, um deles,

incluindo *H. sauritus* e as quatro amostras do nordeste da Flórida e outro, composto das amostras de *H. sirtalis*.

Uma nova espécie, *Hepatozoon polytopis*, encontrada parasitando *C. constrictor priapus* e *T. sauritus sackenii*, foi descrita por Telford et al. (2005b), que utilizaram os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 (Perkins e Keller, 2001), associados a dados morfológicos e morfométricos das fases esporogônicas e esquizogônicas do parasita.

Rubini et al. (2005) realizaram a primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. de serpentes, no caso, *Hydrodynastes gigas*, na América Latina, utilizando os oligonucleotídeos HepF e HepR (Inokuma et al., 2002). A PCR foi eficiente em detectar *Hepatozoon* sp. do sangue de *H. gigas* com amplificação de produto de 625 pb. O sequenciamento indicou a possibilidade de se tratar de uma única espécie de *Hepatozoon* com 98,9% de identidade com o isolado 1 (AY252110) de *Stegonotus cuculattus* (Colubridae) da Austrália e 96,0% de identidade com *H. catesbiana* (AF176837) de anfíbios.

Boulianne et al. (2007) inferiram as relações filogenéticas de *H. catesbiana* e *Hepatozoon clamatae* parasitas de rãs na Nova Scotia, Canadá, utilizando oligonucleotídeos que sequenciam a região ITS-1, desenhados à partir de sequências já conhecidas (Smith et al., 1999).

Moço et al. (2011) conduziram estudos com *Hepatozoon* spp. de *C. durissus terrificus* utilizando os oligonucleotídeos HepF/HepR (Inokuma et al., 2002) e PiroA1/PiroB (Jefferies et al., 2003) que amplificaram, respectivamente, 650 e 500 pb da região 18S rDNA e, apesar do sucesso dos mesmos em detectar tais parasitas, a caracterização molecular utilizando o fragmento amplificado mostrou-se incapaz de diferenciar espécies de *Hepatozoon* de serpentes.

Harris et al. (2011) caracterizaram molecularmente espécies de *Hepatozoon* em répteis da Ilhas Seychelles, sequenciando regiões do gene 18S rDNA, utilizando os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 (Perkins e Keller, 2001), bem como HepF300 e Hep900 (Ujvari et al., 2004). A análise filogenética indicou que as espécies de *Hepatozoon* de Seychelles formam uma linhagem monofilética.

Maia et al. (2011) realizaram um inquérito molecular sobre espécies de *Hepatozoon* de lagartos do Norte da África, sequenciando regiões do 18S rDNA, utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos utilizados por Harris et al. (2011) e encontraram múltiplas linhagens geneticamente distintas.

Considerações Finais

Tendo em vista toda a problemática com relação à taxonomia desses parasitas e a sua relação biológica com os vetores, são imprescindíveis estudos morfológicos e morfométricos das diferentes fases do seu ciclo de vida, tanto no vetor invertebrado como no hospedeiro intermediário, estudos sobre capacidade vetorial de diferentes espécies e utilização de técnicas moleculares para a caracterização de *Hepatozoon* spp. Esses resultados, associados, podem contribuir sobremaneira para uma caracterização mais apurada das diferentes espécies, inferir sobre a relação parasita-hospedeiro e sobre a epidemiologia da infecção por *Hepatozoon* spp. de serpentes, procurando suprir a falta considerável de informações nessa área.

A variedade de tipos de gamontes de *Hepatozoon* spp. que pode parasitar uma mesma espécie de serpente, a escassez de estudos sobre descrições completas destas espécies, sobre o papel dos vetores na sua epidemiologia, bem como a importância da infecção na ecologia e na manutenção de serpentes em cativeiro (Wosniak e Telford, 1991; Mader, 1996; Madsen et al, 2005), justificam estudos e caracterização destes protozoários.

Referências¹

- ARANTES, J.B. Estudos parasitológicos. II. *Haemogregarina butantanensis*, sp.n., parasita da boieva, *Ophis merremii* Wagler, 1824. **Mem. Inst. Butantan**, v. 6, p. 239-241, 1931.
- ARANTES, J.B. *Haemogregarina cyclagrasii* n.sp. parasita da serpente *Cyclagras gigas* (Duméril e Bribon, 1854). **Rev. Biol. Hyg.**, S. Paulo, v.5, p. 9, 1934.
- BALL, H.G. Hemogregarine life cycles. **J. Parasitol.**, v. 56, p. 17, 1970.
- BALL, H.G.; CHAO, J.; TELFORD, S.R. The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon & Seligman, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae), and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). **J. Parasitol.**, v. 53, n. 5, p. 897-909, 1967.
- BALL, H.G.; CHAO, J.; TELFORD, S.R. *Hepatozoon fusifex* sp. n., a hemogregarine from *Boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. **J. Parasitol.**, v. 55, n. 4, p. 800-813, 1969.
- BANETH, G.; BARTA, J.R.; SHKAP, V.; MARTIN, D.S., MACINTIRE, D.K.; VINCENT-JOHNSON, N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.1298-1301, 2000.
- BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **J. Parasitol.**, v.93, p. 283-299, 2007.
- BASHTAR, A.R.; ABDEL-GHAFFAR, F.A.; SHAZLY, M.A. Life cycle of *Hepatozoon menlhorni* sp. nov. in the viper *Echis carinatus* and the mosquito *Culex pipiens*. **Parasitol. Res.**, v. 77, p. 402-410, 1991.
- BARTA, J. R. Suborder Adeleorina Léger, 1911. In: Lee, J.J., Leedale, G.F.; Bradbury, P. **An Illustrated Guide to the Protozoa**. Kansas: Lawrence, 2000. p. 305-318.
- BOULIANNE, B.; EVANS, R.C.; SMITH, T.G. Phylogenetic analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. **J. Parasitol.**, v. 93, n. 6, p. 1435-1441, 2007.
- BRUMPT, E. Le xenodiagnostic. Application et diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosome de Chagas. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 7, p. 706-710, 1914.

¹Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023: Informação e documentação-Referências-Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. **Serious sources of the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- CAMPBELL, T.W. Hemoparasites. In: Mader D.R. **Reptile Medicine and Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 379-381.
- CARINI, A. Sobre uma hemogregarina da *Phylodrias schotti* Schleg. **Rev. Med. S. Paulo**, v. 23, p. 339-340, 1910.
- CARINI, A. Contribuição ao estudo das hemogregarinas de serpentes da família boideos. **Arq. Biol.**, n. 279, 1947.
- DE BIASI, P.; CARDOSO JUNIOR, R.P.; SANTOS, S.M.A. Presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) – Coccidia, Haemogregarinidae – em exemplar de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) – Serpentes, Viperidae, Crotalinae – mantido em cativeiro. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 3, p. 117-121, 1989.
- DE BIASI, P.; PESSOA, S.B.; BELLUOMINI, H.E. Nota sôbre a transmissão congênita de hemogregarinas em duas espécies de serpentes peçonhentas vivíparas. **Atas Soc. Biol. RJ.**, v. 15, p. 27-28, 1971.
- DE BIASI, P.; PESSOA, S.B.; BELLUOMINI, H.E. Novas observações sobre transmissão congênita de hematozoários de serpentes peçonhentas vivíparas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 36, p. 245-249, 1972.
- DESSER, S.S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: Kreier, J.P. (ed.). **Parasitic protozoa**, New York: Academic Press, 1993. p. 247-272.
- DESSER, S.S., HONG, H., MARTIN, D.S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbiana* N. Comb., an apicomplexan parasite of the Bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. **J. Parasitol.**, v. 81, p. 212-222, 1995.
- HARRIS, D.J.; MAIA, J.P.M.C.; PERERA, A. Molecular Characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. **J. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 106-10, 2011.
- HULL, R.W.; CAMIN, J.H. Haemogregarine in snakes: the incidence and identity of the erythrocytic stages. **J. Parasitol.**, v. 46, p. 515-523, 1960.
- HUSSEIN, A.N.A. Light and transmission electron microscopic studies of a haemogregarine in naturally indected fan-footed gecko (*Ptyodactylus hasselquistii*). **Parasitol. Res.**, v. 98, p. 468-471, 2006.
- INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 265-271, 2002.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; MUHINICKEL, C.J.; IRWIN, P.J. Two Species of Canine *Babesia* in Australia: Detection and Characterization by PCR. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 409-12, 2003.

LAINSON, R.; PAPERNA, I.; NAIFF, R. D. Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the *Caiman. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 103-113, 2003.

LANE, T.J.; MADER, D.R. Parasitology. In: Mader D.R. **Reptile Medicine and Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 185-203.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANDKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly-revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.**, v. 27, p. 37-58, 1980.

LOWICHIK, A.; LANNERS, H.N.; LOWRIE, R.C.; MEINERS, N.E. Gametogenesis and sporogony of *Hepatozoon mocassini* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in an experimental mosquito host, *Aedes aegypti*. **J. Euk. Microbiol.**, v. 40, n. 3, p. 287-297, 1993.

LUTZ, A. Ueber die Drepanidien der Schlangen. Ein Beitrag zur Kenntnis der Hämosporidien. **Zbl. Bakt., Orig.**, v. 29, p 390-397, 1901.

MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1996. 512p.

MADSEN, T.; UJVARI, B.; OLSSON, M. Old pythons stay fit: effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. **Oecologia**, v.142, p. 407-412, 2005.

MAIA, J.P.M.C.; HARRIS, D.J.; PERERA, A. Molecular survey of *Hepatozoon* species in lizards from North Africa. **J. Parasitol.**, v. 97, n. 3, p. 513-517, 2011.

MARULLAZ, M. Sur une hémogregarine de *Drymobius bifossatus*. **C. R. Soc. Biol.**, Paris, v. 73, p. 518-520, 1912.

MATHEW, J.S.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; EWING, S.A.; MALAYER, J.R.; LATHA, B.R.; PANCIERA, R.J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Adeleina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **J. Parasitol.**, v. 86, n. 2, p.366-372, 2000.

MEDLIN, L.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA- coding regions. **Gene**, v. 71, p. 491-499, 1988.

MIYAMOTO, M.; MELLO, M.L.S. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in erythrocytes of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae), infected with the protozoan, *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae). **Cell Biol. Intern.**, v.31, p. 494-499, 2007.

MOÇO, T.C. **Prevalência de *Hepatozoon* spp. em serpentes e caracterização morfológica, morfométrica e molecular de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) naturalmente infectadas.** 2008. 77f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MOÇO, T.C.; O'DWYER, L.H.; VILELA, F.C.; BARRELLA, T.H.; SILVA, R.J. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1169-1176, 2002.

MOÇO, T.C.; SILVA, R.J.; MADEIRA, N.G.; PADUAN, K.S.; RUBINI, A.S.; LEAL, D.D.M.; O'DWYER, L.H. Morphological, morphometric and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisona durissa terrifica*. **Parasitol. Res.**, setembro 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com> > Acesso em: 16 set. 2011.

NAVAJAS, M.; LAGNEL, J.; FAUVEL, G.; DE MORAES, G. Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, p. 851-859, 1999.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; BARRELLA, T.H.; VILELA, F.C.; SILVA, R.J. Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) among recently captured Brazilian snakes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 3, p. 309-314, 2003.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; SILVA, R.J. Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). **Parasitol. Res.**, v. 92, n. 2, p. 110-112, 2004a.

O'DWYER, L.H.; SANTOS, M.M.; SILVA, R.J. Análise morfométrica de cinco tipos de *Hepatozoon* sp. (Sporozoa, Hepatozoidade) parasitando um exemplar de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., 2004, Ouro Preto. **Anais...**Ouro Preto: Minas Gerais, p. 246, 2004b.

O'DWYER, L.H.; SILVA, R.J.; MADEIRA, N.G. Description of gamontogonic and sporogonic stages of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Caudisona durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitol. Res.**, v. 108, p. 845-851, 2011.

PAPERNA, I.; LAINSON, R. Ultrastructural studies on the sporogony of *Hepatozoon* spp. In *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 fed on infected *Caiman crocodiles* and *Boa constrictor* from northern Brazil. **Parasitology**, v. 127, p. 147-154, 2003.

PERKINS, S.L.; KELLER, A.K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotídeos. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 870-876, 2001.

PERKINS, S.L.; MARTIN, J.M. Conserved primers fail in the diagnosis of parasitic infection. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 982-984, 1999.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras I: Hemogregarinas de algumas espécies de serpentes das famílias colubridae. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 1, p. 33-46, 1967a.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras II: Hemogregarinas de algumas espécies de serpentes das famílias colubridae e boidae. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 1, p. 49-56, 1967b.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. III: Novas observações sobre hemogregarinas de serpentes das famílias colubridae e crotalidae. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 2, p. 159-164, 1967c.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras IV: Hemogregarinas da *Dryadophis bifossatus bifossatus*. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 3, p. 333-335, 1967d.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras V: Hemogregarinas da cascavel. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 4, p. 381-384, 1967e.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. VI. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 28, n. 1, p. 71-76, 1968.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras - VII. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 29, n. 3, p. 351-354, 1969a.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. VIII – Sobre a evolução da “*Haemogregarina miliaris*” na sanguessuga ”*Haementeria lutzii*”. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 29, n. 4, p. 451-458, 1969b.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras IX - Sobre a hemogregarina da *Helicops carinicauda* (Wied.). **Rev. Goiana Med.**, v. 15, p. 161-168, 1969c.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P. Esporulação no *Culex dolosus* (L. Arribálzaga, 1891), do *Hepatozoon roulei* (Phisalix & Laveran, 1913), parasita da *Bothrops alternatus* (D. & B., 1854), transfundido com o sangue na *Bothrops moojeni* Hoge, 1965. **Mem. Inst. Butantan**, v. 36, p. 241-245, 1972.

PESSOA, S.B., DE BIASI, P. Considerações taxomômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. **Mem. Inst. Butantan**, v. 37, p. 291-298, 1973a.

PESSOA, S.B., DE BIASI, P. Nota taxomômica sobre cistos esporogônicos de algumas espécies de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. **Mem. Inst. Butantan**, v. 37, p. 299-307, 1973b.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P. Nota sobre a formação de cistos esporogônicos de *Hepatozoon* sp., parasita da *Leimadophis poecilogyrus* (Wied.), (Serpentes: Colubridae) em sanguessuga experimentalmente infectada. **Rev. Pat. Trop.**, v. 3, n. 2, p. 221-224, 1974.

PESSOA, S.B.; BELLUOMINI, H.E.; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIV – Esporogonia da hemogregarina da *Bothrops moojeni* Hoge, 1965 no *Culex* (*Culex*) *dolosus* (L. Arribáizaga, 1891). **Arq. Inst. Biol.**, v. 38, n. 4, p. 253-258, 1971a.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J.; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XII – hemogregarinas de serpentes do gênero *Corallus*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 37, n. 3, p. 205-211, 1970a.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J.; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIII – Evolução esporogônica da Hemogregarina da *Thamnodynastes strigatus* (Colubridae). **Arq. Inst. Biol.**, v. 37, n. 3, p. 213-217, 1970b.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P.; PUORTO, G. Nota sobre a prevalência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. **Mem. Inst. Butantan**, v. 38, p. 68-118, 1974a.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P.; PUORTO, G. Transferência do *Hepatozoon tupinambis* parasita do lagarto *Tupinambis teguixin*, para a serpente cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) por intermédio de mosquito *Culex fatigans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 72, p. 295-299, 1974b.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P.; SACCHETTA, L. Evolução de *Hepatozoon* sp. parasita do *Leptophis ahaetulla* (Linnaeus) (Serpentes, Colubridae) no *Culex fatigans*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 38, p. 119-122, 1974c.

PESSOA, S.B.; SACCHETTA, L.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras X- Hemogregarinas da *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v. 12, p. 197-200, 1970c.

PESSOA, S.B.; SACCHETTA, L.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XV. Sobre uma nova espécie do gênero *Haemogregarina* (S.S.) parasita de *Thamnodynastes pallidus nattereri* (Thunberg) e sua evolução em mosquitos. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v. 13, p. 29-32, 1971b.

PHISALIX, M. *Haemogregarina cenchridis*, nov. sp. parasite d'un serpent Boïdé, *Epicrates cenchris* Lin., **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 24, p. 187-190, 1931a.

PHISALIX, M. Les hémogrégarines de *Crotalus terrificus* Lau. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 24, p.190-194, 1931b.

- PHISALIX, M.; LAVERAN, A. Sur une hémogregarine nouvelle de *Lachesis alternates*. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 6, p. 330-332, 1913.
- RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; RIBEIRO, V.C.; RIBOLLA, P.E.M.; SILVA, R.J.; O'DWYER, L.H. Caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERPETOLOGIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: Minas Gerais, 2005.
- SAMBON, L.W. The haemogregarines of snakes. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.15, p. 48-55, 1909.
- SAMBON, L.W.; SELIGMANN, C.G. Descriptions of five new species of haemogregarines from snakes. **Proc. Zoo. Soc.**, London, v. 1, p. 283-284, 1907.
- SANTOS, M.M.V., O'DWYER, L.H., SILVA, R.J. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 94-97, 2005.
- SCHLEGEL, M. Protist evolution and phylogeny as discerned from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Eur. J. Parasitol.**, v.27, p.207-219, 1991.
- SCHOUTEN, G.B. *Haemogregarina migonei* n. sp. Hematozoario de un ofidio, *Cyclagras gigas*. **D. B. Rev. Soc. Cient. Paraguay**, p. 145-147, 1934.
- SLOBODA, M.; KAMLER, M.; BULANTOVÁ, J.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. **J. Parasitol.**, v. 93, p. 1189-1198, 2007.
- SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **J. Parasitol.**, v. 82, n.4, p. 565-585, 1996.
- SMITH, T.G.; KIM, B.; DESSER, S.S. Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 293-304, 1999.
- TELFORD, S.R. Reptilian hemoparasites. In: HOFF G.L.; FRYE, F.L; JACOBSON, E.R. (Eds.). **Diseases of amphibians and reptiles**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1984. p. 385-517.
- TELFORD, S.R.; BUTLER, J.F.; MOLER, P.E. Two additional *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) from the Southern Black Racer, *Coluber constrictor priapus* (Serpentes: Colubridae), in Northern Florida. **J. Parasitol.**, v. 91, p. 139-143. 2005a.

- TELFORD, S.R.; BUTLER, J.F.; TELFORD, R.S. *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) of the corn snake *Elaphe guttata* (Serpentes: Colubridae) and the pigmy rattlesnake, *Sistrurus miliarius barbouri* (Serpentes, Viperidae) in South Florida. **J. Parasitol.**, v. 88, p. 778-782, 2002.
- TELFORD, S.R.; BUTLER, J.F.; TELFORD, R.S. *Hepatozoon polytopis* n. sp. parasitic in two genera and species of Colubrid snakes in Southern Florida. **J. Parasitol.**, v. 91, p. 144-147, 2005b.
- TELFORD, S.R.; ERNST, J.A.; CLARCK, A.M.; BUTLER, J.F. *Hepatozoon sauritus*: A polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome analysis. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 2, p. 352-358, 2004.
- TELFORD, S.R.; WOZNIAK, E.J.; BUTLER, J.F. Haemogregarine specificity in two communities of Florida snakes, with descriptions of six new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) and a possible species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). **J. Parasitol.**, v. 87, p. 890-905, 2001.
- UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) from Tropical Australia. **J. Parasitol.**, v. 90, p. 670-672, 2004.
- WOZNIAK, E.J.; TELFORD, S.R. The fate of *Hepatozoon* species naturally infecting Florida Back Racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors, and histologic evidence of pathogenicity in unnatural host species. **Int. J. Parasitol.**, v. 21, p. 511-516, 1991.
- WOZNIAK, E.J.; KAZACOS, K.R.; TELFORD JR, S.R.; MCCLAUGHLIN, G.L. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. **Int. J. Parasitol.**, v. 26, p. 141-146, 1996.
- WOZNIAK, E.J.; MCLAUGHLIN, G.L.; TELFORD, S.R. Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert Sidewinders (*Crotalus cerastes cerastes*). **J. Zoo.Wild. Med.**, v. 25, n. 1, p. 103-110, 1994a.
- WOZNIAK, E.J.; TELFORD, S.R.; MCLAUGHLIN, G.L. Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine. **J. Zoo.Wild. Med.**, v. 23, n. 4, p. 538-547, 1994b.



Capítulo 1: Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de Hepatozoon spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) de serpentes brasileiras naturalmente infectadas

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE
Hepatozoon spp. (APICOMPLEXA, HEPATIZOÍDIAE) DE SERPENTES
BRASILEIRAS NATURALMENTE INFECTADAS

Tatiana Cristina Moço¹, Karina dos Santos Paduan², Reinaldo José da Silva³, Paulo Eduardo Martins
Ribolla³, Lucia Helena O'Dwyer³.

¹Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., CEP: 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.
Email: tati13moco@hotmail.com

² Pós-doc do Programa de Pós Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual
Paulista, Distrito de Rubião Jr., CEP: 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de
Rubião Jr., CEP: 18.618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Hepatozoon spp. são os protozoários intracelulares mais frequentemente encontrados em serpentes. Tendo em vista a variedade de formas parasitando tais animais e as divergências dos dados encontrados em literatura, o objetivo deste estudo foi tentar separar espécies de *Hepatozoon* de serpentes, testando oligonucleotídeos que amplifiquem regiões genômicas menos conservadas, detectando diferenças entre as espécies, bem como realizar as caracterizações morfológicas, morfométricas e moleculares de *Hepatozoon* spp. de serpentes naturalmente infectadas. Para tal, foram utilizadas serpentes doadas ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista de Botucatu que, em exames de rotina, mostraram-se positivos para tais parasitas. O sangue foi coletado por punção da veia caudal, foram confeccionados esfregaços sanguíneos e uma alíquota foi congelada a -20°C , para posterior extração do DNA. As caracterizações morfológicas e morfométricas foram realizadas utilizando um *software* especializado para análise de imagens. Dos 215 espécimes investigados, foram eleitos cinco exemplares de *Crotalus durissus terrificus*, nos quais foi visualizado um tipo de gamonte em cada espécime. Pela análise morfológica e morfométrica, estes gamontes foram agrupados em três populações. As alterações provocadas por tais parasitas, nas hemácias, também foram analisadas. Para a caracterização molecular das espécies de *Hepatozoon* através de sequenciamento genético, foram testados sete pares de oligonucleotídeos que amplificam regiões distintas do gene rDNA utilizando-se a técnica da PCR. Os testes realizados apontaram os pares de oligonucleotídeos HepF300/Hep900 e HEMO1/HEMO2 como eficientes em amplificar e caracterizar regiões genômicas *Hepatozoon* spp. de serpentes. O melhor resultado foi obtido quando as sequências geradas por ambos pares de oligonucleotídeos foram agrupadas e associadas às análises morfológicas e morfométricas, permitindo separar possíveis três espécies de *Hepatozoon* parasitas nas serpentes estudadas.

Palavras-chave: Caracterização molecular; *Hepatozoon*, Morfologia; Morfometria; Serpentes brasileiras

Abstract

Hepatozoon spp. are the most frequent intracellular protozoa found in snakes. Given the variety of forms parasitizing these animals and differences of the data found in literature, the aim of this study was to attempt to separate *Hepatozoon* species of snakes, testing oligonucleotides that amplify less reliable genomic regions, detecting differences among species, as well as perform the morphological, morphometric and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. of naturally infected snakes. For this purpose, were used snakes donated to Center for the Study of Venoms and Venomous Animals of the São Paulo State University/Botucatu (CEVAP) that, in routine were detected positive for such parasites. Blood was collected by the tail vein puncturing, blood smears were prepared and an aliquot was frozen at -20° C for subsequent DNA extraction. The morphological and morphometric characterization were performed by using a specialized image analysis software. Of the 215 investigated animals, five specimens of *Crotalus durissus terrificus* were elected, in which were found five parasitic forms that, by morphometric analysis, were grouped into three populations. The changes caused by these parasites in red blood cells were also analyzed. For the molecular characterization of *Hepatozoon* species through genetic sequencing, were tested seven pairs of primers that amplify different regions of the rDNA gene using the PCR technique. Only the primers HepF300/Hep900 and HEMO1/HEMO2 were efficient in amplifying and characterizing genomic regions of snakes *Hepatozoon* spp.. The best results were achieved when the sequences amplified from the both primers were analyzed together and the results were associated with the morphology and morphometry of the gamonts, allowing the separation of possible three *Hepatozoon* species.

Keywords: Molecular Characterization; *Hepatozoon*; Morphological; Morphometric; Brazilian snakes

Introdução

Hepatozoon spp. são os mais frequentes protozoários hemoparasitas de serpentes (Smith, 1996). Possuem ciclo heteroxeno (Wosniak et al., 1994a), típico dos coccídeos, com a esquizogonia tissular e gametogonia ocorrendo no hospedeiro vertebrado e o ciclo sexual e a esporogonia, no hospedeiro invertebrado.

As serpentes brasileiras são parasitadas por, aparentemente, uma grande variedade de gamontes de *Hepatozoon* spp., principalmente ao se tratar de parasitas de *Crotalus durissus terrificus*, pois além das espécies já descritas; *Hepatozoon romani* e *Hepatozoon capsulata* (Phisalix, 1931), foram diagnosticados vários gamontes que diferiam destes, sugerindo que o número de espécies desse gênero infectando esta espécie de serpente deve ser maior do que o descrito (Moço et al., 2002, 2011; O'Dwyer et al., 2004a,b, 2011).

O critério taxonômico para identificação de *Hepatozoon* spp. tem se baseado, principalmente, na caracterização morfológica e morfométrica dos gamontes, no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados, e dos estágios esporogônicos, nos hospedeiros invertebrados. Contudo, a semelhança entre os oocistos e entre os gamontes de diversas espécies de *Hepatozoon* torna difícil a identificação baseada somente nessas características (Pessoa e De Biasi, 1973ab; Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2004a, 2011). Daí a necessidade de lançarmos mão de caracterização molecular dos parasitas pelo sequenciamento genético através da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia - PCR (Wozniak et al., 1994b; Telford et al., 2004; Moço et al., 2011).

Tendo em vista toda a problemática com relação à taxonomia desses parasitas, o objetivo principal deste estudo foi tentar separar espécies de *Hepatozoon* de serpentes testando oligonucleotídeos que amplifiquem regiões genômicas menos conservadas e/ou mais polimórficas, que sejam capazes de apontar diferenças entre espécies, caracterizando morfológica, morfométrica e geneticamente algumas dessas espécies, tentando, se possível, nomeá-las a partir da associação de tais análises, na tentativa de elucidar as questões taxonômicas e epidemiológicas desse subestimado grupo.

Material e Métodos

1 - Serpentes

O estudo foi realizado com serpentes provenientes da região de Botucatu, São Paulo, Brasil, que foram doadas ao CEVAP- Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – UNESP/Campus de Botucatu/SP/Brasil e que, em exames de rotina, mostraram-se infectadas com *Hepatozoon* spp. De 215 exemplares, foram escolhidos cinco espécimes de *C. durissus terrificus* que, aparentemente, apresentavam maior parasitemia dentre as analisadas.

Todos os animais foram alojados em caixas individuais de polipropileno de dimensões 0,60 m X 0,55 m X 0,50 m, devidamente ventiladas, com água *ad libitum* em potes de alumínio e alimentação quinzenal com camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério do Departamento de Parasitologia - UNESP, Botucatu.

2 - Coleta de sangue

O sangue das serpentes foi obtido através de punção da veia caudal, após contenção mecânica do animal (Moço et al., 2011). Foram coletados, aproximadamente, 0,4 ml de sangue com seringa de insulina e, imediatamente após a coleta, confeccionados esfregaços sanguíneos em lâminas previamente limpas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, fixadas com metanol durante 3 minutos e coradas com solução de May-Gruenwald-Giemsa (10 %) por 30 minutos. O diagnóstico foi feito através do exame das lâminas em microscópio óptico com aumento de 400 x (Moço et al., 2011). O sangue restante foi congelado a -20 °C para realização dos estudos de caracterização molecular pela técnica da PCR.

3 - Morfologia e morfometria dos gamontes

Os gamontes, encontrados no sangue periférico das serpentes, foram analisados morfológicamente, tendo por base o formato do corpo, presença de cápsula e de pigmentos citoplasmáticos, formato e posição de seu núcleo.

A morfometria foi realizada utilizando-se um sistema computadorizado de análise de imagens, capturadas através de um sistema de vídeo acoplado a um computador e medidas pelo *software* Qwin Lite 2.5 (Leica).

As variáveis estipuladas para análise dos parasitas foram área, comprimento e largura, tanto dos gamontes como de seus núcleos. Foram fotografadas e analisadas 100 imagens das formas parasitárias encontradas em cada espécime de *C. durissus terrificus* (Moço et al., 2011).

4 - Análise das alterações nas hemácias

Para avaliar possíveis alterações morfológicas nas hemácias, induzidas pela presença do parasita, foram fotografadas e medidas, de modo semelhante ao estudo dos gamontes, 100 hemácias normais e 100 hemácias parasitadas de cada exemplar de serpente escolhida, cujas variáveis estipuladas para sua análise também foram área, comprimento e largura da hemácia, bem como área, comprimento e largura do núcleo da hemácia (Moço et al., 2011).

5 - Caracterização Molecular

5.1 - Extração do DNA

O DNA total foi extraído empregando-se o “Kit Ilustra™ blood genomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare®), misturando-se 10 µl do sangue total à 2 µl de Proteinase K e 500 µl de solução de lise, deixando a mistura à 56 °C, por 4 horas, seguidos de 15 min à 70 °C. O conteúdo foi passado para a coluna de centrifugação e centrifugado a 8000 rotações por minuto (rpm) por um minuto, adicionados 500 µl de solução de lise, centrifugado a 8000 rpm por mais um minuto, adicionados 500 µl de álcool, centrifugado a 13000 rpm por três minutos, adicionados 50 µl de tampão de eluição (aquecidos à 70 °C) e, finalmente, centrifugado a 8000 rpm por um minuto. A quantidade de sangue total utilizada foi reduzida para 10 µl, devido ao entupimento dos filtros (Moço et al., 2011). Após extração, as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C até o momento do uso.

5.2 - Oligonucleotídeos testados nas reações da PCR

Devido às dificuldades na padronização das reações da PCR, foram testados sete pares de oligonucleotídeos, sendo que, um amplifica a região ITS-1 rDNA, outro, as regiões ITS-1, 5.8S e ITS-2 rDNA e cinco, que amplificam regiões do gene 18S rDNA (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos testados pela técnica da PCR.

Oligonucleotídeos	Sequências	Referência
18S/5.8S	5'-CGTAGGTGAACCTGCAGAAGG-3'/ 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	Smith et al., 1999
ITS5/ITS4	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'/ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al., 1990
HepF300/Hep900	5'-GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACG-3'/ 5'-CAAATCTAAGAATTCACCTCTGAC-3'	Ujvari et al., 2004
HEMO1/HEMO2	5'-TATTGGTTTTAAGAATAATTTTATGATTG-3'/ 5'-CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC-3'	Perkins e Keller, 2001
4558/2733 (G)	5'-GCTAATACATGAGCAAAATCTCAA-3'/ 5'-CGGAATTAACCAGACAAAT-3'	Mathew et al., 2000
4374/2733 (M)	5'-ATCTAAGGAAGGCAGC-3'/ 5'-CGGAATTAACCAGACAAAT-3'	Mathew et al., 2000
4558/4559 (P)	5'-GCTAATACATGAGCAAAATCTCAA-3'/ 5'-TCACTACCTCTCTTATGCTG-3'	Mathew et al., 2000

5.3 - Condições de Amplificação

As reações de amplificação foram testadas, primeiramente, de acordo com as metodologias propostas em literatura, para todos os conjuntos de oligonucleotídeos, em termociclador “My Cycler™ thermal cycler” (BioRad®), posteriormente, foram testadas outras concentrações e perfis de ciclos, na tentativa de padronização das reações da PCR.

Foram realizados testes em volume final de 25 µl com 1 x Tampão (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL pH 9.0), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 10 µmol de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*), 1 U de “Platinum® Taq DNA Polymerase” (Invitrogen®), 1 µl do DNA total e H₂O q.s.p.. Cada reação foi checada para contaminação pelo uso de controles negativos utilizando todos os reagentes exceto o DNA. Os ciclos de amplificação utilizados, para cada par de oligonucleotídeos, constam da Tabela 2 e

a Temperatura de *melting* (T_m) ótima para o anelamento de cada um deles foi determinada por gradiente de temperatura em termociclador “My Cycler™ thermal cycler” (BioRad®). Os produtos foram mantidos a 4°C até a realização da eletroforese.

Para os pares do oligonucleotídeos que amplificam a região ITS1 rDNA (18S/5.8S e ITS5/ITS4), também foram testadas reações com volume final de 20 µl, utilizando-se “GoTaq® Colorless Master Mix” (Promega®).

Tabela 2. Perfil de ciclo para cada par de oligonucleotídeo testado pela técnica da PCR.

Oligonucleotídeos	Ciclo Inicial (Hot Start)	Anelamento e Extensão		Extensão Final
		Nº ciclos		
18S/5.8S	94 °C/ 7 min	35	94 °C/60 s, 57 °C/60 s e 72 °C/60 s	72 °C/5 min
ITS5/ITS4	94 °C/5 min	34	94 °C/45 s, 60 °C/30 s e 72 °C/60 s	72 °C/5 min
HepF300/Hep900	94 °C/3 min	35	94 °C/45 s, 56 °C/60 s e 72 °C/60 s	72 °C/7 min
HEMO1/HEMO2	94 °C/3 min	35	94 °C/45 s, 60 °C/60 s e 72 °C/60 s	72 °C/7 min
4558/2733 (G)	94 °C/3 min	40	94 °C/60 s, 56 °C/ 60 s e 72°C/90 s	72 °C/ 7 min
4374/2733 (M)	94 °C/3 min	35	94 °C/60 s, 56 °C/ 60 s e 72°C/90 s	72 °C/ 7 min
4558/4559 (P)	94 °C/3 min	40	94 °C/60 s, 56 °C/ 60 s e 72°C/90 s	72 °C/ 7 min

As amostras foram testadas para a presença de produtos amplificados utilizando-se 8 µl de cada produto misturados a 2 µl de tampão de amostra em gel de agarose 1% (Pronadisa®). Para a eletroforese foi utilizado tampão TAE (Tris – Ácido acético – EDTA) em cuba horizontal “Hoefer HE 33” (GE Healthcare®). Fragmentos foram visualizados por coloração com “GelRed™” (Biotium®) e separados por 1 hora a 85 volts sendo visualizados em Fotodocumentador “Major Science UVDI®” e fotografados com câmara digital “Canon Power Shot G9™” (Canon®). Os fragmentos amplificados foram comparados com um marcador de tamanho molecular de 1000 pares de base (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas®). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação aproximados dos descritos na literatura (Tabela 3). O restante dos produtos de PCR foi utilizado para o sequenciamento genético.

Tabela 3. Tamanhos dos fragmentos a serem amplificados por cada par de oligonucleotídeo

Oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento
18S/5.8S	300 pb
ITS5/ITS4	Desconhecido
HepF300/Hep900	600 pb
HEMO1/HEMO2	1000 pb
4558/2733 (G)	1200 pb
4374/2733 (M)	900 pb
4558/4559 (P)	300 pb

5.4 - Purificação dos Produtos de PCR

Os fragmentos de PCR das amostras foram purificados por reação enzimática adicionando-se 2 µl da enzima “ExoSAP IT” (GE Healthcare®) a 5 µl do produto de PCR de acordo com as recomendações do fabricante, passando por um ciclo de 60 minutos à 37°C seguido de outro de 20 minutos à 80°C e, a seguir, submetidos ao sequenciamento.

5.5 - Sequenciamento

As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador capilar “3500 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems) utilizando-se 1,9 µl de 5 x “Save Money” (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 0,5 µl “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 pmol do oligonucleotídeo *forward*, 4 ng/µl do produto de PCR purificado e H₂O q.s.p. para completar o volume final de 10 µl. As reações foram realizadas em termociclador “Eppendorf MasterCycler Gradient” (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 s, 50°C por 5 s, 60°C por 4 min, com rampa de 1°C/s, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foi realizada uma única reação com o oligonucleotídeo *forward*.

5.6 - Precipitação das reações de Sequenciamento

Para cada reação de sequenciamento foram adicionados 80 µl de isopropanol 65%, incubando à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à velocidade de 10.000 rpm por 25 minutos, à temperatura ambiente. O isopropanol foi removido invertendo os tubos e, a seguir, 200 µl de etanol 70% foram adicionados e centrifugados à velocidade de 10.000 rpm por cinco minutos à temperatura ambiente. Todo o etanol foi removido com auxílio de micropipeta, pois qualquer etanol residual resultaria em manchas fluorescentes. As amostras foram secas à temperatura ambiente e o DNA eluído em 2 µl de tampão de amostra contendo “Formamida Hi-Di™” (Applied Biosystems) + Loading Buffer (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em sequenciador automático as amostras foram aquecidas a 95°C por cinco minutos e rapidamente transferidas para o gelo.

5.7 - Análise dos Dados - Alinhamento das Sequências

Os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse*, gerados automaticamente, foram submetidas ao alinhamento consenso com auxílio do programa MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>). Após esta etapa foram construídos blocos de nota e estes, analisados com o programa CLUSTAL X versão 1.8 (Thompson et al., 1994). As sequências foram comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Posteriormente, as sequências foram utilizadas para construção das árvores filogenéticas utilizando-se o programa MEGA versão 2.1 (Kumar et al., 2001). Taxas de divergência foram conduzidas, utilizando-se os métodos de máxima parsimônia (MP) e distância (NJ) na reconstrução filogenética do fragmento estudado. Para se estimar o índice de consistência das análises de distância foram utilizadas árvores com teste de bootstrap sobre 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

As espécies utilizadas para análise filogenética e seus respectivos números de acesso do GenBank estão descritos na Tabela 7, dos resultados.

6 - Análise Estatística

Todos os dados registrados foram analisados utilizando-se o *software* “SigmaStat 3.1” (Jandel Scientific Corporation).

As variáveis registradas para os gamontes, em cada espécime de serpente, foram analisadas separadamente empregando-se teste de Análise de Variância ou Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição dos dados. Os testes de Dunn ou Tukey foram utilizados para detectar as diferenças entre os grupos. Estas mesmas variáveis também foram analisadas conjuntamente, empregando-se o teste de Análise de Componentes Principais (PCA), realizado pelo *software* “MVSP 3.1” (MultiVariate Statistical Package).

A comparação entre hemácias normais e parasitadas foi realizada empregando-se Teste t ou Mann Whitney, de acordo com a distribuição dos dados. Estas mesmas variáveis também foram estudadas conjuntamente, empregando-se o mesmo teste de análise multivariada (PCA), realizado pelo *software* “MVSP 3.1”. O nível de significância adotado foi de 5 %.

Resultados

1 - Caracterização morfológica dos gamontes

Das 215 espécimes investigadas, apenas 14 (6,5%) se mostraram positivas para *Hepatozoon* spp. nos exames de rotina, destes, foram escolhidos cinco exemplares de *C. durissus terrificus* (nomeados: Cdt136, Cdt137, Cdt157, Cdt176 e Cdt177), por, aparentemente, apresentarem, maior parasitemia dentre os pesquisados. Em tais eleitos, foram visualizadas uma forma parasitária em cada um deles; nomeadas Gamontes 1 (Cdt136), Gamontes 2 (Cdt137), Gamontes 3 (Cdt157), Gamontes 4 (Cdt176) e Gamontes 5 (Cdt177). Destes, três eram bastante semelhantes entre si (1, 4 e 5), com exceção de seus núcleos (Tabela 4 e Figura 1).

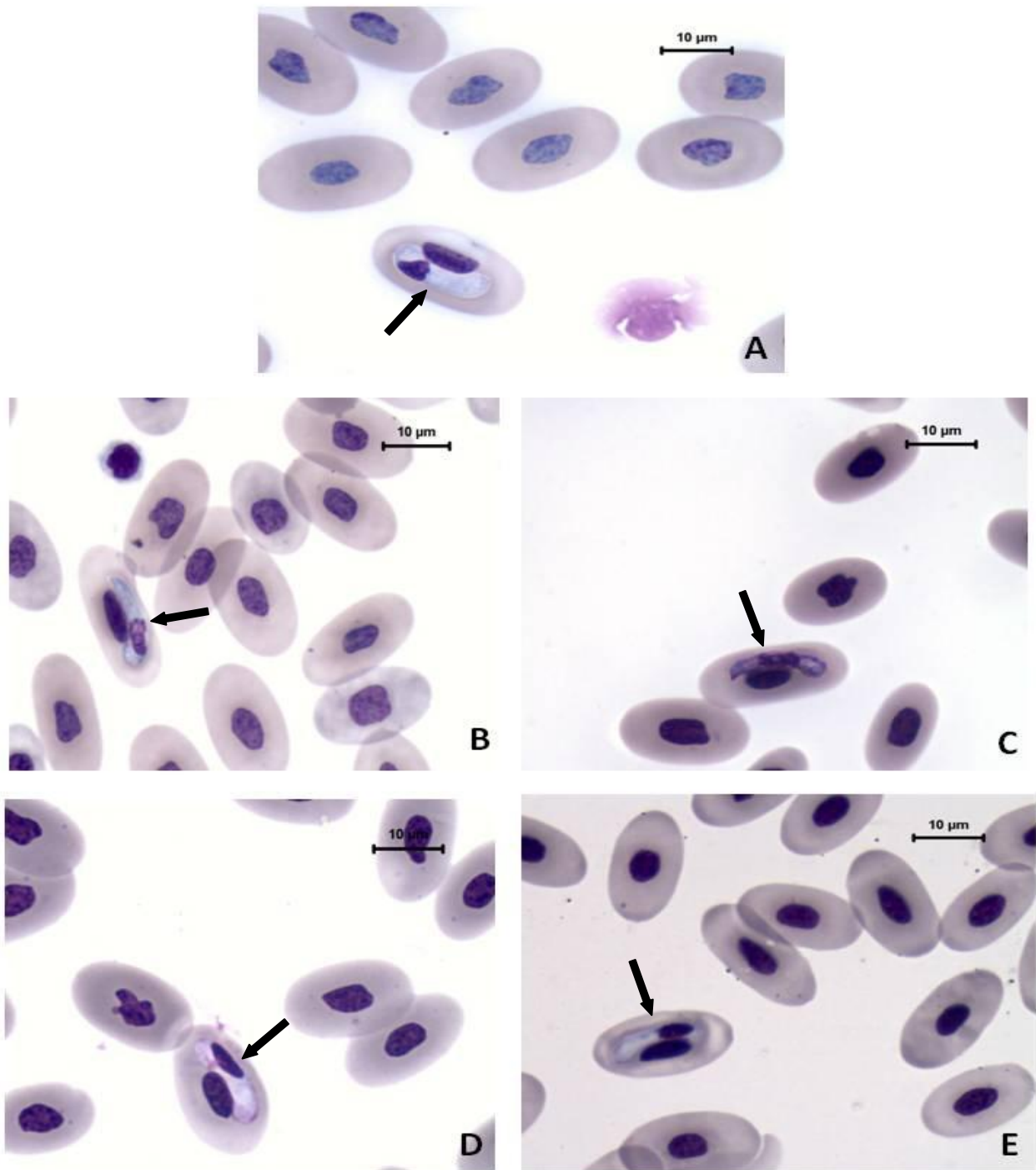


Figura 1. Gamontes de *Hepatozoon* sp., parasitando eritrócitos de cinco exemplares *Crotalus durissus terrificus*. **A:** Gamonte 1; **B:** Gamonte 2; **C:** Gamonte 3; **D:** Gamonte 4; **E:** Gamonte 5. Esfregaço sanguíneo corado por May-Gruenwald-Giemsa.

Tabela 4. Morfologia dos gamontes de *Hepatozoon* spp. de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) naturalmente infectadas e alterações induzidas nas hemácias parasitadas.

	1 (Cdt136)	2 (Cdt137)	3 (Cdt157)	4 (Cdt176)	5 (Cdt177)
Localização	Junto ao núcleo da hemácia	Junto ao núcleo da hemácia	Junto ao núcleo da hemácia	Junto ao núcleo da hemácia	Junto ao núcleo da hemácia
Formato	Grande, alongado e largo, com extremidades abauladas	Grande, alongado com uma das extremidades mais afilada	Alongado, com uma das extremidades mais afilada	Grande, alongado e largo, com extremidades abauladas	Grande, alongado e largo, com extremidades abauladas
Citoplasma	Uniforme	Uniforme	Basofílico e granuloso	Uniforme	Uniforme
Núcleo	Compacto, mais circular, ligeiramente deslocado para uma das extremidades	Alongado e ligeiramente deslocado para uma das extremidades	Alongado, central ou deslocado para uma das extremidades	Grande, compacto, alongado e ligeiramente deslocado para uma das extremidades	Compacto, ovalado e ligeiramente deslocado para uma das extremidades
Alteração no eritrócito	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

2 – Análise morfométrica das alterações provocadas pelo parasita no eritrócito

Gamonte 1:

Esse parasita alterou todos os parâmetros das hemácias infectadas, com exceção de sua largura (Tabela 5). Tais alterações separaram discretamente grupo normal de parasitado, quando submetidos à análise multivariada dos principais componentes de comparação entre tais grupos, apesar das muitas sobreposições entre seus elementos (Figura 2).

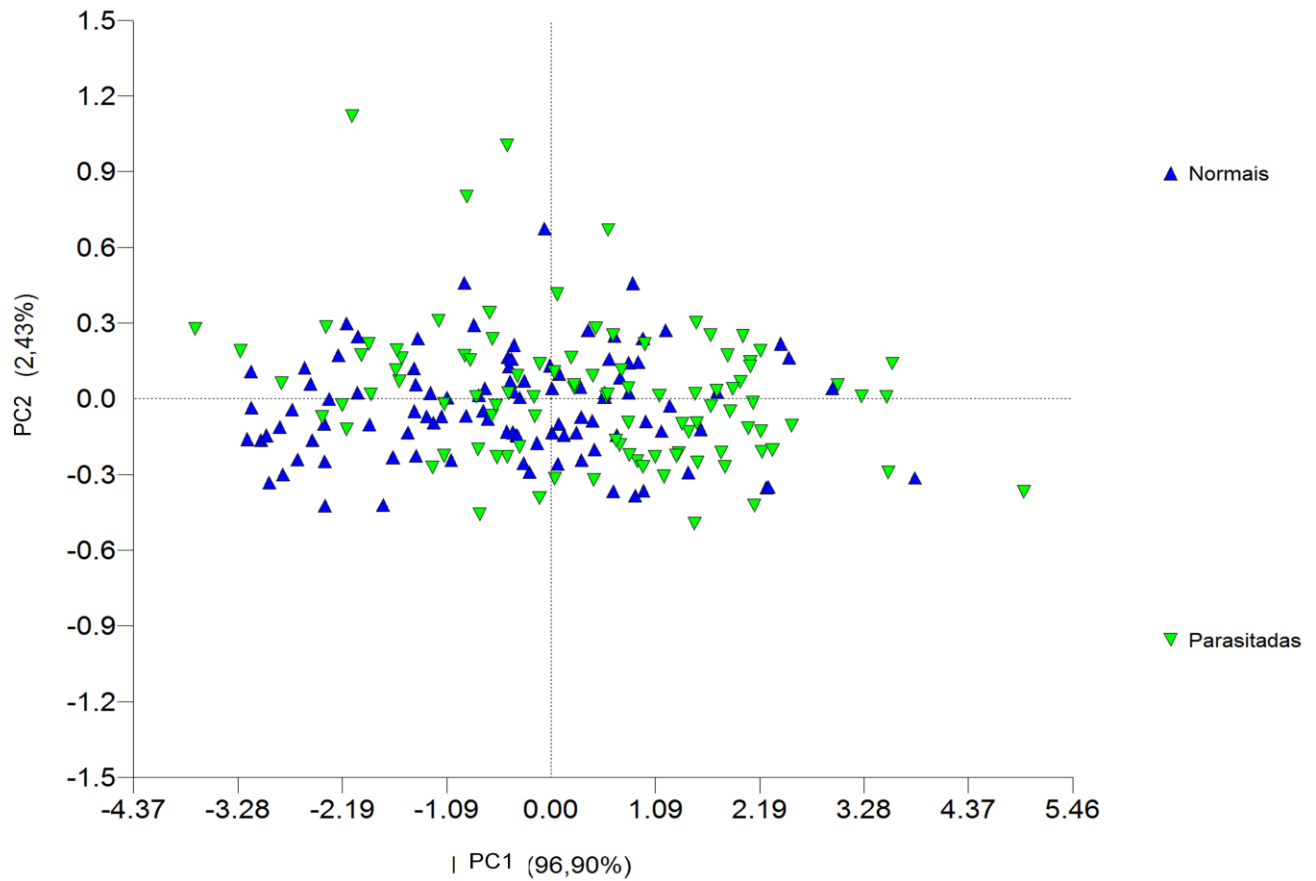


Figura 2. Análise Multivariada dos principais componentes de comparação (PCA) entre as hemácias normais e parasitadas pelo Gamonte 1, do exemplar de *Crotalus durissus terrificus* Cdt136.

Gamonte 2:

Tal parasita alterou todos os parâmetros das hemácias em que se albergou (Tabela 5) e essas alterações foram responsáveis por separar discretamente o grupo normal do parasitado, de acordo com a análise multivariada dos componentes de comparação entre tais grupos (Figura 3).

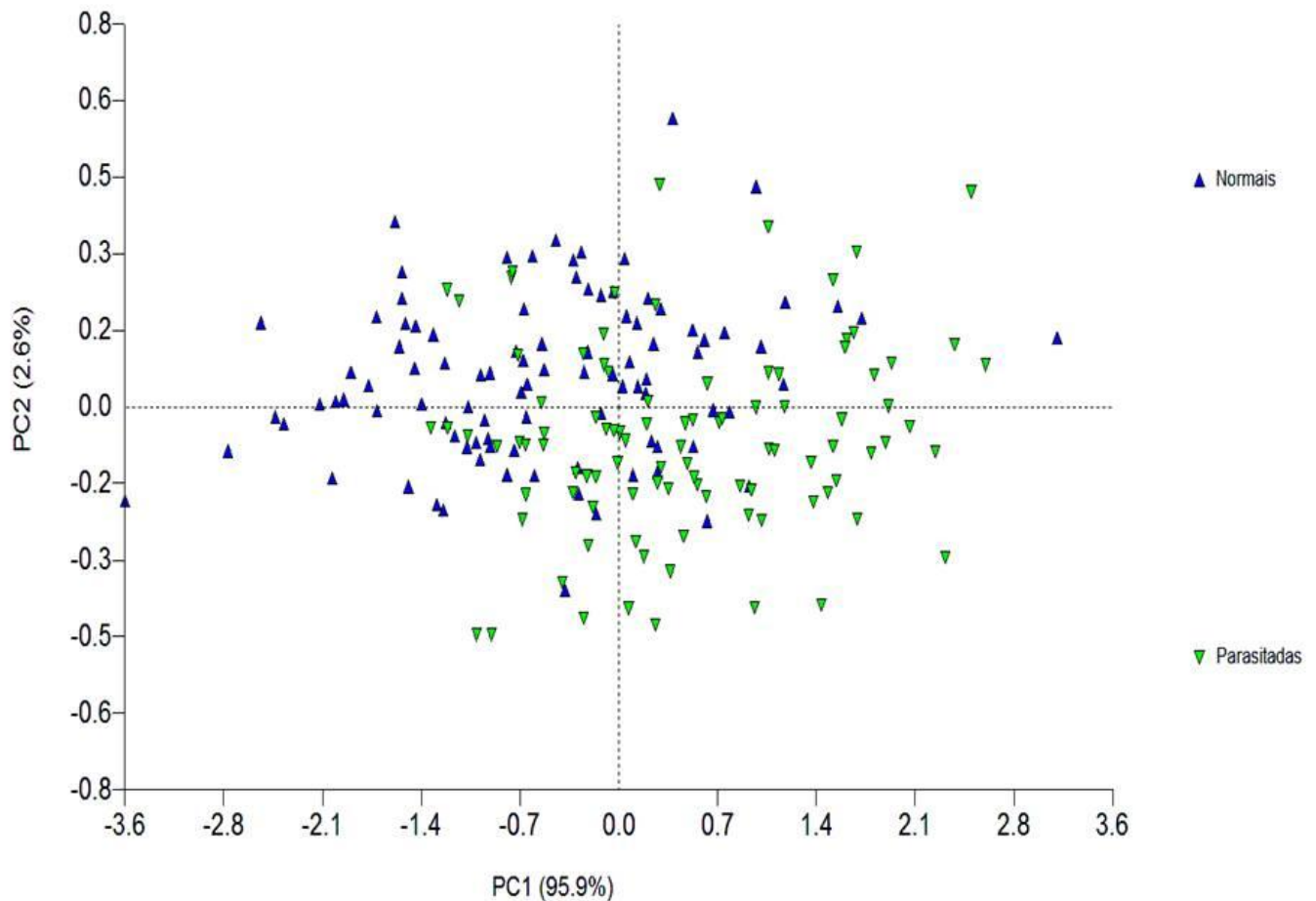


Figura 3. Análise Multivariada dos principais componentes de comparação (PCA) entre as hemácias normais e parasitadas pelo Gamonte 2, do exemplar de *Crotalus durissus terrificus* Cdt137.

Gamonte 3:

Esse gamonte também alterou todos os parâmetros das hemácias parasitadas (Tabela 5), tais alterações também permitiram separar o grupo normal do parasitado quando submetidos à análise multivariada dos principais componentes de comparação entre tais grupos (Figura 4).

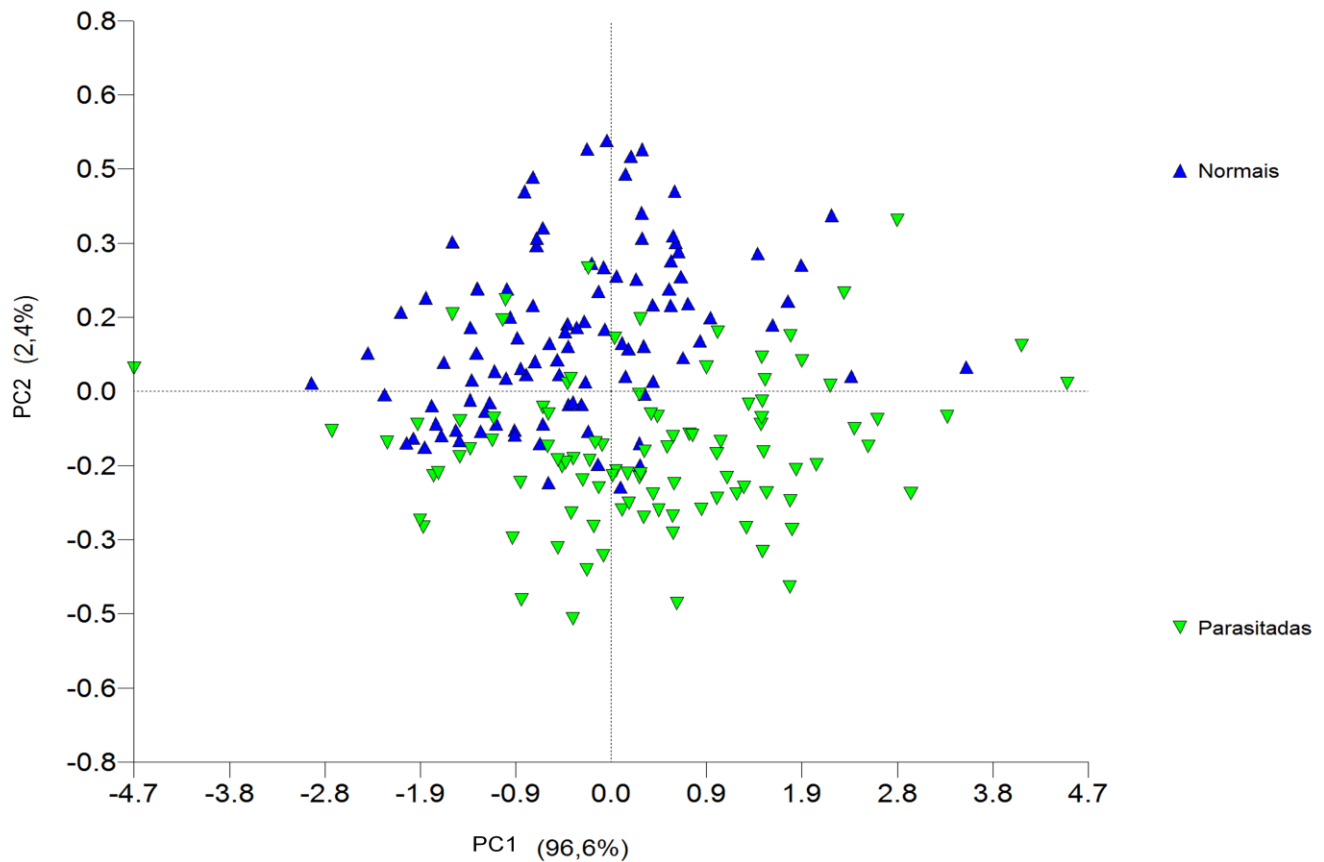


Figura 4. Análise Multivariada dos principais componentes de comparação (PCA) entre as hemácias normais e parasitadas pelo Gamonte 3, do exemplar de *Crotalus durissus terrificus* Cdt157.

Gamonte 4:

Tal parasita também alterou todos os parâmetros das hemácias parasitadas com exceção do comprimento do seu núcleo (Tabela 5) e tais alterações, tal como o ocorrido para os demais gamontes, também permitiram a separação entre o grupo normal e o parasitado, quando submetidos à análise multivariada dos componentes de comparação entre eles (Figura 5).

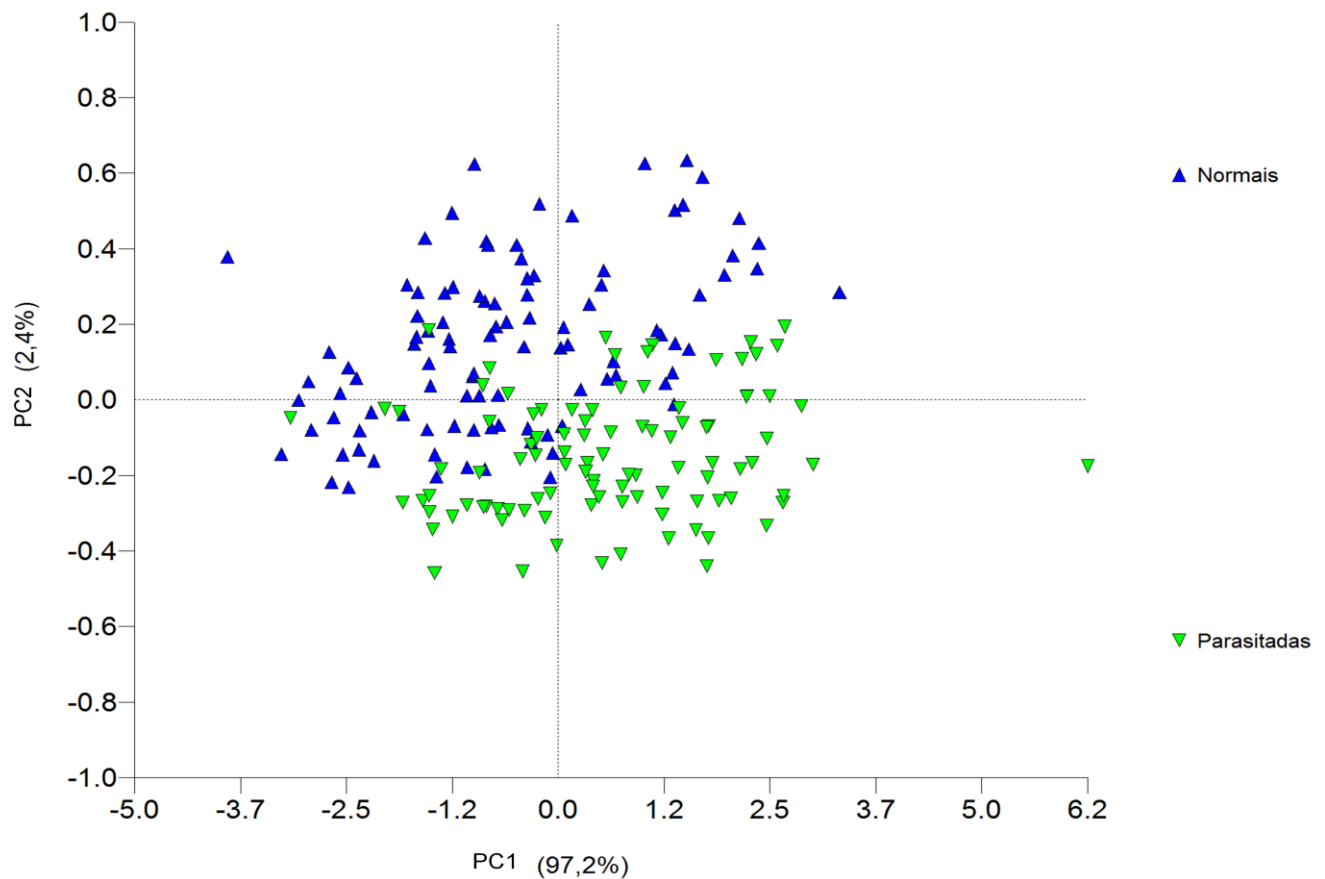


Figura 5. Análise Multivariada dos principais componentes de comparação (PCA) entre as hemácias normais e parasitadas pelo Gamonte 4, do exemplar de *Crotalus durissus terrificus* Cdt176.

Gamonte 5:

Esse parasita alterou todos os parâmetros das hemácias infectadas, com exceção da área do núcleo das mesmas (Tabela 5). Tais alterações também foram suficientes para separar, mais discretamente do que os gamontes 2, 3 e 4, o grupo normal de parasitado, quando submetidos à análise multivariada dos principais componentes de comparação entre tais grupos, apesar das sobreposições entre seus elementos (Figura 6).

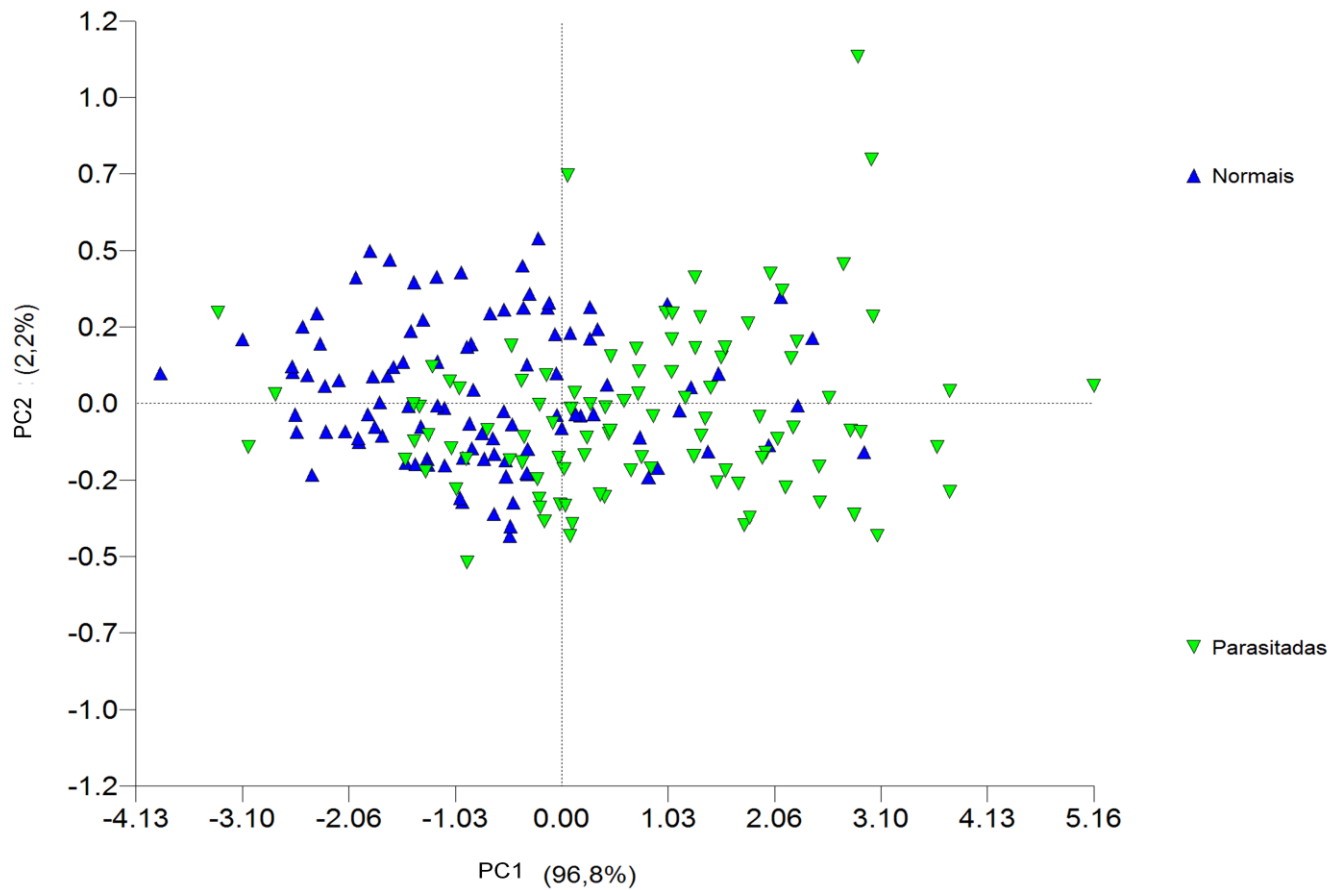


Figura 6. Análise Multivariada dos principais componentes de comparação (PCA) entre as hemácias normais e parasitadas pelo Gamonte 5, do exemplar de *Crotalus durissus terrificus* Cdt177.

Assim, todos os gamontes encontrados alteraram as hemácias parasitadas em pelo menos cinco das seis variáveis analisadas. Sendo que duas (Gamontes 2 e 3), das cinco formas, alteraram todas as variáveis (Tabela 5). Fato corroborado pela análise multivariada dos componentes de comparação entre hemácias parasitadas e não parasitadas, que apontou, embora em diferentes níveis, a separação entre esses grupos em todos os casos (Tabela 4).

Tabela 5. Análise comparativa entre eritrócitos normais e parasitados dos exemplares de *Crotalus durissus terrificus*.

	Hemácias	CNH (μm)	LNH (μm)	ANH (μm^2)	CH (μm)	LH (μm)	AH (μm^2)
1 (Cdt 136)	N	7,0 (0,5) ^a	4,0 (0,3) ^a	22,0 (2,2) ^a	22,2 (1,2) ^a	11,0 (0,7) ^a	181,6 (14,4) ^a
	PA	8,6 (0,5) ^b	3,7 (0,3) ^b	23,6 (2,1) ^b	24,1 (1,1) ^b	10,7 (1,0) ^a	195,2 (16,8) ^b
2 (Cdt 137)	N	6,9 (0,5) ^a	4,0 (0,3) ^a	22,2 (1,6) ^a	21,6 (0,9) ^a	10,6 (2,0) ^a	172,2 (10,2) ^a
	PA	7,2 (0,40) ^b	3,7 (0,3) ^b	21,0 (1,6) ^b	25,0 (1,0) ^b	9,7 (0,8) ^b	185,4 (11,2) ^b
3 (Cdt 157)	N	6,4 (0,5) ^a	4,2 (0,2) ^a	23,1 (2,3) ^a	19,8 (1,0) ^a	10,7 (0,5) ^a	159,1 (9,9) ^a
	PA	7,5 (0,4) ^b	3,5 (0,3) ^b	20,5 (1,6) ^b	22,0 (1,2) ^b	9,4 (0,6) ^b	169,4 (13,2) ^b
4 (Cdt 176)	N	6,8 (0,5) ^a	4,3 (0,3) ^a	24,4 (2,7) ^a	21,0 (1,0) ^a	11,1 (0,5) ^a	176,5 (12,9) ^a
	PA	6,8 (0,5) ^a	3,7 (0,3) ^b	20,7 (1,8) ^b	21,9 (0,8) ^b	11,6 (0,5) ^b	195,2 (15,0) ^b
5 (Cdt 177)	N	6,5 (0,5) ^a	4,0 (0,4) ^a	23,0 (2,4) ^a	20,6 (0,9) ^a	10,2 (0,6) ^a	162,0 (11,1) ^a
	PA	8,3 (0,4) ^b	3,5 (0,3) ^b	23,3 (2,2) ^a	24,2 (1,5) ^b	9,9 (0,8) ^b	184,1 (14,6) ^b

Letras iguais = $p > 0,05$; letras distintas = $p < 0,05$. AP = área do parasita, CP = comprimento do parasita, LP = largura do parasita, ANP = área do núcleo do parasita, CNP = comprimento do núcleo do parasita, LNP = largura do núcleo do parasita, N = hemácias normais, PA = hemácias parasitadas, Cdt = *Crotalus durissus terrificus*. Teste não paramétrico, dados correspondem às medianas e suas respectivas amplitudes semi-interquartílicas.

3 - Caracterização morfométrica dos gamontes

Analisando-se separadamente cada uma das variáveis estudadas para os parasitas, notamos que os Gamontes 1, 4 e 5, embora sejam morfologicamente semelhantes, possuem algumas variáveis distintas entre si, tanto relacionadas ao parasita, como ao seu núcleo. Assim, tais gamontes têm comprimentos distintos, sendo o Gamonte 1 maior que o Gamonte 4, e este, maior que o Gamonte 5. Já em relação às suas áreas, o Gamonte 5 é ligeiramente menor do que os demais (1 e 4). O Gamonte 1 ainda possui maior largura do núcleo, quando comparado aos gamontes morfologicamente semelhantes. O Gamonte 4 possui maior comprimento do núcleo e área do núcleo se comparado aos demais (1 e 4).

Por outro lado, nos Gamontes 2 e 3, morfologicamente distintos, quatro das seis variáveis analisadas não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 6), ou seja, diferiram apenas em relação à área do núcleo e largura do núcleo.

Tabela 6. Análise comparativa entre os gamontes de *Hepatozoon* spp. observados em cinco espécimes de *Crotalus durissus terrificus* naturalmente infectados.

Parasitas	CNP (μm)	LNP (μm)	ANP (μm^2)	CP (μm)	LP (μm)	AP (μm^2)
1(Cdt136)	4,6 (0,3) ^a	3,1 (0,3) ^a	10,7 (1,2) ^a	18,1 (0,8) ^a	3,6 (0,4) ^a	55,8 (3,4) ^a
2(Cdt137)	4,7 (0,4) ^a	2,7 (0,3) ^b	10,0 (0,9) ^a	17,1 (0,7) ^b	3,1 (0,3) ^b	40,1 (3,5) ^b
3(Cdt157)	4,7 (0,3) ^a	2,3 (0,2) ^c	9,1 (0,8) ^b	17,4 (0,7) ^b	3,0 (0,3) ^b	38,9 (3,7) ^b
4(Cdt176)	5,8 (0,5) ^b	2,9 (0,3) ^b	13,5 (1,3) ^c	17,3 (0,7) ^b	3,6 (0,3) ^a	52,7 (4,6) ^a
5(Cdt177)	4,8 (0,5) ^a	2,7 (0,3) ^b	10,8 (1,1) ^a	15,7 (0,5) ^c	3,5 (0,4) ^a	46,2 (4,2) ^c

Letras iguais = $p > 0,05$; letras distintas = $p < 0,05$. AP = área do parasita, CP = comprimento do parasita, LP = largura do parasita, ANP = área do núcleo do parasita, CNP = comprimento do núcleo do parasita, LNP = largura do núcleo do parasita, Cdt = *Crotalus durissus terrificus*. Teste não paramétrico, dados correspondentes às medianas e suas respectivas amplitudes semi-interquartílicas.

O resultado da análise multivariada dos componentes de comparação entre os gamontes sugeriu a existência de três populações de parasitas, apesar das muitas sobreposições entre seus elementos (Figura 7).

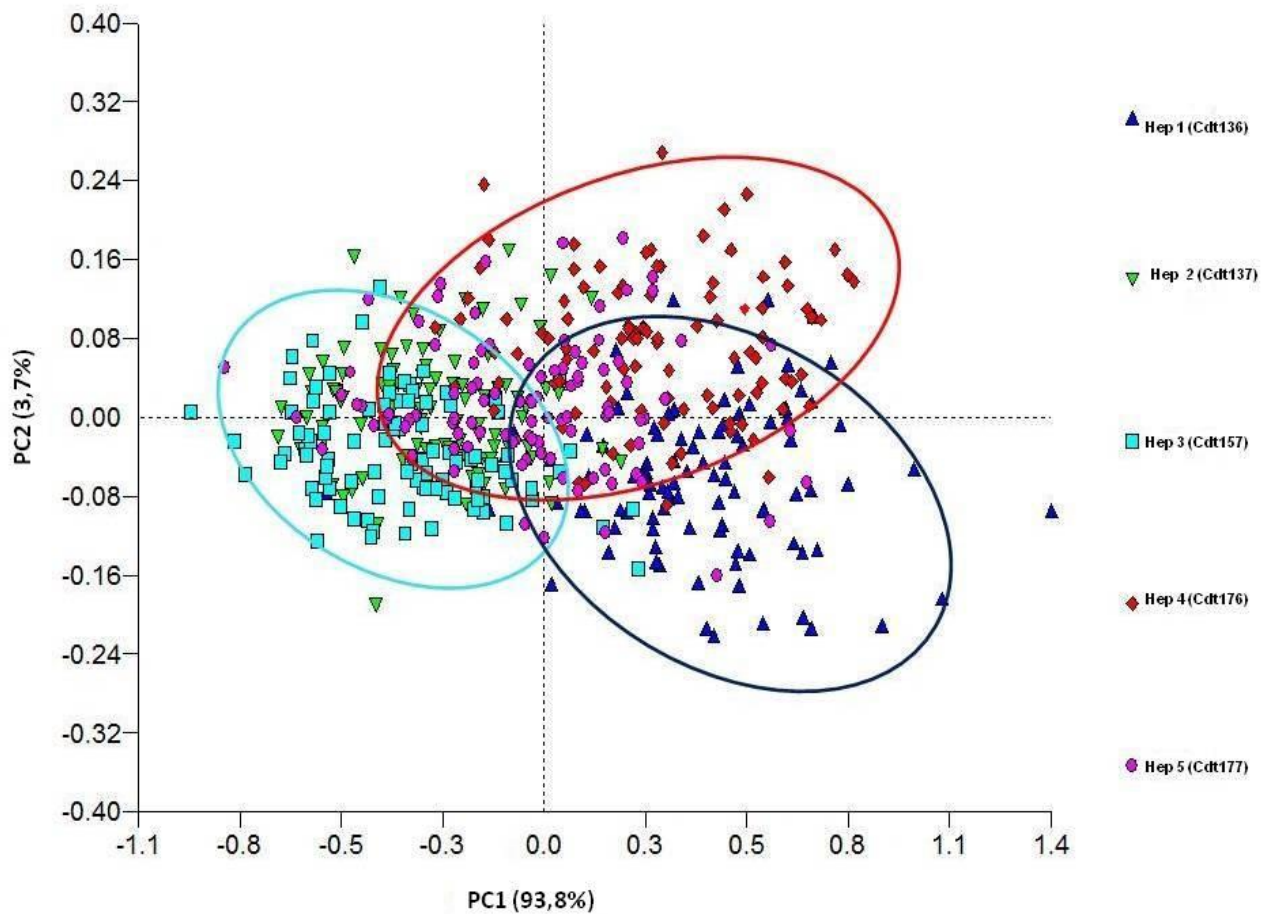


Figura 7. Análise Multivariada dos principais componentes (PCA) dos gamontes de *Hepatozoon* spp. dos cinco exemplares de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt).

2 – Testes dos oligonucleotídeos e caracterização molecular

- Oligonucleotídeos 18S/ 5.8S

Inúmeros testes de concentrações de reagentes e gradientes de temperatura de anelamento foram realizados na tentativa de padronizar a reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos 18S e 5.8S, a fim de conseguir produtos de amplificação com o tamanho esperado (Tabela 3), mas as tentativas foram falhas. Todas as 15 amostras em que obtivemos regiões amplificadas e sequenciáveis (Figura 8), utilizando-se o perfil de ciclo descrito na Tabela 3, com reagentes nas concentrações de: 10 µl “Go Taq® Colorless Master Mix”, 0,75 µl de oligonucleotídeos (R/F) e 2µl-3µl de DNA diluído (1 DNA: 9 H₂O), quando submetidas ao sequenciamento, não obtiveram homologia a *Hepatozoon* spp. e sim, amplificaram fragmentos inespecíficos homólogos a organismos como algumas espécies de fungos.

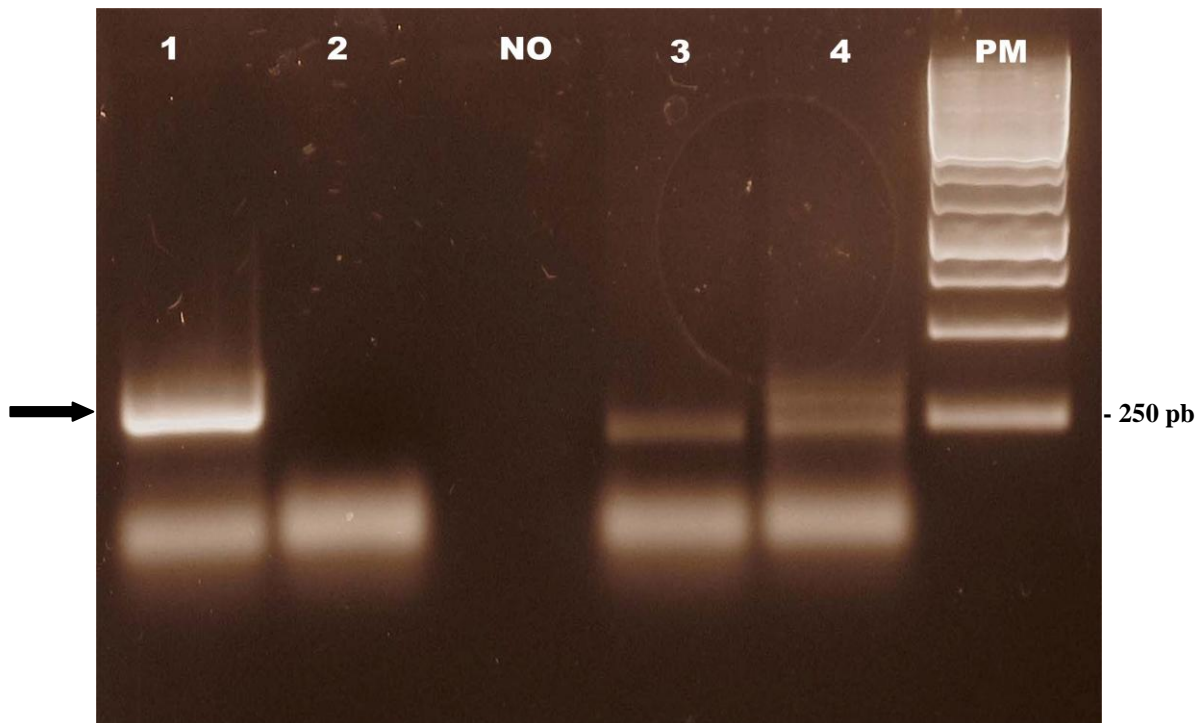


Figura 8. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene ITS1 rRNA de *Hepatozoon* spp. amplificados utilizando-se oligonucleotídeos 18S e 5.8S. Poços 1, 2, 3 e 4: Gamontes 1, 2, 3 e 4 (respectivamente); NO: controle negativo; PM: Marcador de Peso Molecular (1kb). Seta indica fragmento amplificado de aproximadamente 300 pb.

- Oligonucleotídeos ITS5/ ITS4

Vários testes de concentrações de reagentes também foram realizados para os oligonucleotídeos ITS5 e ITS4, baseados no perfil de ciclo e condições de amplificação propostos em literatura (10 µl “Go Taq® Colorless Master Mix”, 1 µl de oligonucleotídeos (R/F) e 5ul de DNA) (Tabela 2), na tentativa de padronizar essa reação de PCR e conseguir produtos de amplificação do fragmento esperado. Entretanto, essas tentativas também foram falhas.

- Oligonucleotídeos 4558/ 2733 (G)

Na tentativa de padronização da reação da PCR para os oligonucleotídeos 4558 e 2733, também foram realizados vários testes de concentração de reagentes, baseando-se no perfil de ciclo proposto em literatura (Tabela 2), mas as únicas amostras em que foram amplificados os fragmentos desejados foram as correspondentes aos Gamontes 2 e 3 (Figura 9) nas condições: 2,5 ul de Tampão, 0,75 ul de MgCl₂, 0,5 ul de dNTPs, 0,5 ul de oligonucleotídeos (F/R), 0,3 ul de Taq DNA Polymerase e 1 ul de DNA diluído (1DNA: 69 H₂O).

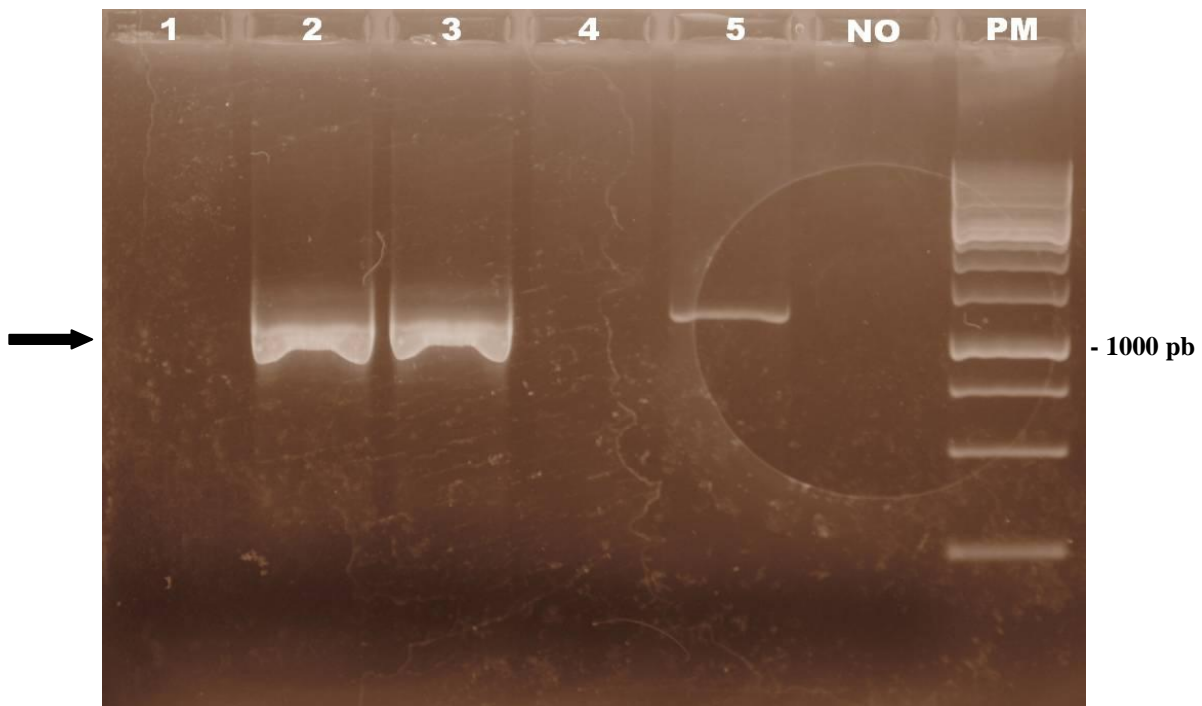


Figura 9. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos G. Poços 1- 5: Gamontes 1 – 5; NO: controle negativo; PM: Marcador de Peso Molecular (1kb). Seta indica fragmento amplificado de 1200 pb.

- Oligonucleotídeos 4374/ 2733 (M)

Na tentativa de padronização da reação da PCR para os oligonucleotídeos 4374 e 2733 (internos aos 4558/ 2733), também foram realizados testes de concentração de reagentes, baseando-se no perfil de ciclo proposto em literatura (Tabela 2), obtendo-se amostras sequenciáveis para os cinco gamontes (Figura 10) nas condições: 2,5 ul de Tampão, 0,75 ul de MgCl₂, 0,5 ul de dNTPs, 0,5 ul de oligonucleotídeos (F/R), 0,3 ul de Taq DNA Polymerase e 1 ul de DNA puro. Entretanto, após sequenciadas, as amostras referentes aos Gamontes 1, 4 e 5 amplificaram fragmentos inespecíficos e apenas as amostras 2 e 3 apontaram homologia a *Hepatozoon* spp.

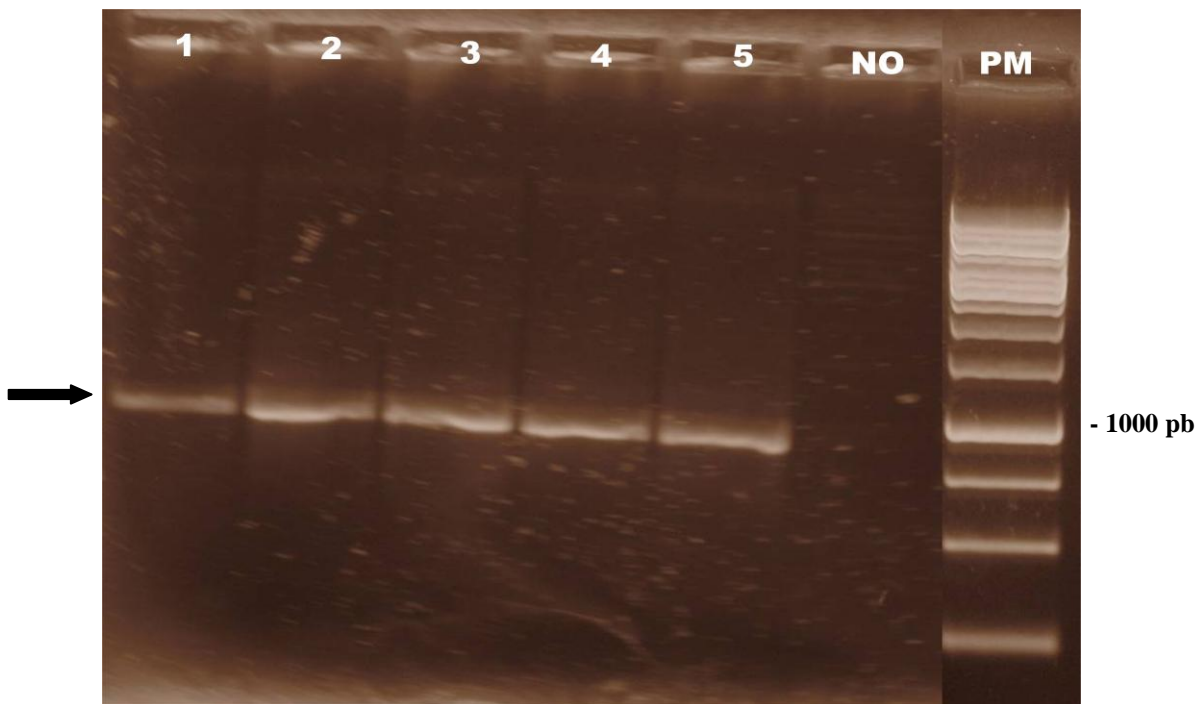


Figura 10. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos M. Poços 1- 5: Gamontes 1 – 5; NO: controle negativo; PM: Marcador de Peso Molecular (1kb). Seta indica fragmento amplificado de 900 pb.

As sequências correspondentes às amostras 2 e 3 (Hep 2 e Hep 3), obtidas utilizando-se os pares de oligonucleotídeos 4558/ 2733(G) e 4374/ 2733 (M), respectivamente, foram analisadas em sobreposição (G + M) pois seu sequenciamento apresentou diversos pontos falhos. Dessa forma, obteve-se uma sequência de 1140 pb cujo alinhamento, obtido utilizando-se o programa CLUSTAL X, apresentou 158 posições informativas, sendo que, em toda a extensão do fragmento analisado, a diferença entre o Hep 2 (Cdt137) e Hep 3 (Cdt157) é de apenas um nucleotídeo, ou seja, existe apenas um ponto de mutação dos sítios polimórficos, especificamente uma transversão (Figura 11).

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAATGCATGCTTTTAAAGCATGAAT
GAGATGCATTATTAGATAAAAAACCAATACATACTTTTAAAGTATGAAT
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAATGCATGTTTTTAAAGCATGAAA
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAATGCATGTTTTTAAAGCATGAAA
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAATGTATGTTTTTAAAGCATAAAA
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAATATATGTTCTTAAAGCATAAAA
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAATATATGTTTTTAAAGCATAAAA
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAATCAATATATGTTTTTAAAGCATAAAA
GAGAAGCATTATTAGATAAAAAACCAGTGCATGTTTTTAAACATGAAG

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

GTTGGTGATTACAATAACTAAGCAAATCGCATAGTGAAAACCTGGCGATA
GTTGGTGATTACAATAACTTAGCAAATCGCATAGTGTAACAGGCGATA
ATTGGCGATTACAATAACTAAGCAAATCGCATAGTGCAAACCTGGCGATA
ATTGGCGATTACAATAACTAAGCAAATCGCATAGTGCAAACCTGGCGATA
ATTGGTGATATAACAATAACTAAGCAAATCGCACAGTGCAAACCTGGCGATA
GTTGGTGATTACAATAACTAAGCAAATCGCACAGTGCAAACCTGGCGATA
GTTGGTGATTACAATAACTAAGCAAATCGCACAGTGCAAACCTGGCGATA
GTTGGTGATTACAATAACTAAGCAAATCGCACAGTGCAAACCTGGCGATA
TGTAATGATATAAAAATAACTAAGCAAATCGCACAGTGTAACCTAGCGATA
* *** ** ***** ***** *** *** **** ** ***

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT
AATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTT

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG
ACCGTGGCAGTGACGGTTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGG

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02.
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT
AGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAAT

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

ACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAA
ACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAA
ACCCAATTCTAACAGTATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAA
ACCCAATTCTAACAGTATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAA
ACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAA
ACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAA
ACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAA
ACCCAATTTTAACAGCATAAAAAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAA

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATATAAACACTTTTT
GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACACTTTTT
GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACACTTTTT
GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACTTTTT
GGCAATTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTT
GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTT
GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTT
GGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACAATTTTT
**** *

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA-CAGCCGCGGTAATTCCA
AAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G
-CTCCA-TAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT-G

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

AATTTCTGCTAAAAAACCAGGTCTGCTTTT-TTAATAAAAGTAGTATCT
AATTTCTGCTATAAATAACCAGTCTGCTTT---TAATAGAAGTAGTACCT
AATTTCTGCTAAAAAATAACCAGGTGTGCTTTTATTAATAAAAGTGGTATCT
AATTTCTGCTAAAAAATAACCAGGTGTGCTTTTATTAATAAAAGTGGTATCT
AATTTTTGCTAGAAATAACCAGGTCTGCTTTTATTTATAAGAGTGGTATCT
AATTTTTGCTAAAAAATAACCAGGTGTGCTTTTAAATTATAAAAGTGGTATCA
AATTTTTGCTAAAAAATAACCAGGTCTGCTTTTATTAATAAAAGTGGTATCT
AGTTTTGCTAAAAATAATCAAGCTGCTTTTATTAATAAAAGTAGTATCT
AATTTATGCTAGAAATAGCCGGTGTGCTTTTAAATAATAAAAGTAATATCT
* * * * *

```

Hepatozoon_sp_DG1      TGGTGTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTT--GAAATGTTTTTTA--C
Hepatozoon_sp_European_pine_ma TGGTCTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTT--GAAATGTTTTTTA--C
Hep02                  TGGTGTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTA--GAAATGTTTTTTA--C
Hep03                  TGGTGTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTA--GAAATGATTTTTTA--C
Hepatozoon_sp_BV1      TGGTGTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTT--GGAATGTTTTTTA--C
Hepatozoon_sp_Squirrel TGGTGTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTT--GAAGTTTTTTTA--C
Hepatozoon_ayorgbor    TGGTGTG--TTTTAGC--ATAATGTCCTTT--GAAATGTTTTTTA--C
Hepatozoon_sp_Boiga    TGGTGGGGTTTTAAACCAAATAATGGCCCTTTGAAAATGTTTTTTTACT
Hepatozoon_catesbianae TAGTGTG--TACTAGC--ATAATGTCCTTT--GAAATGTTTTTTA--C
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Hepatozoon_sp_DG1      TTTATTGTAAAAAGCAATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hepatozoon_sp_European_pine_ma TTTATTGTAAATAAATTATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hep02                  TTTATTGTAAAGAAGCAATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hep03                  TTTATTGTAAAGAAGCAATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hepatozoon_sp_BV1      TTTATTGTAGAATGCAATTTTGAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hepatozoon_sp_Squirrel TTTATTGTAAAAAGCGATTTTCAAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hepatozoon_ayorgbor    TTTATTGTAAAGAAGCAATTTTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
Hepatozoon_sp_Boiga    TTTATTGTAAAAAGCAAAATTTTCGCGTTTTTTT-CTTTGAAAATAATTAGAGT
Hepatozoon_catesbianae TTTATTGTAAAAACAATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Hepatozoon_sp_DG1      GTTTC AAGCAGGCTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma GTTTC TAGCAGGCTAACGCTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hep02                  GTTTC AAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hep03                  GTTTC AAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hepatozoon_sp_BV1      GTTTC AAGCAGGCTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hepatozoon_sp_Squirrel GTTTC AAGCAGGCTAACGTTTCGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hepatozoon_ayorgbor    GTTTC AAGCAGGCTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
Hepatozoon_sp_Boiga    GTTTC AAGCAGGCTAACGTTTTAAAT-CCGCAGCATGTAATAATAAAAATA
Hepatozoon_catesbianae GTTTC AAGCAGGCTAACGCTATGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAAATA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Hepatozoon_sp_DG1      GGATTTTGGTTCACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma GGATTTTGGTTCACATTATTGGTTTTAAGAGCTAAATTAATGATTGATA
Hep02                  GGATTTTGGTTCACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hep03                  GGATTTTGGTTCACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hepatozoon_sp_BV1      GGATTTTGGTTCACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hepatozoon_sp_Squirrel GGATTTTGGTTCACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hepatozoon_ayorgbor    GGATTTTAGTTCACGTTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hepatozoon_sp_Boiga    GGATTTTAGTTCACGTTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
Hepatozoon_catesbianae GGATTTTAGTTCACGTTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Hepatozoon_sp_DG1      GGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma GGGACAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hep02                  GGGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hep03                  GGGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hepatozoon_sp_BV1      GGAGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hepatozoon_sp_Squirrel GGAGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hepatozoon_ayorgbor    GGAGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hepatozoon_sp_Boiga    GGGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
Hepatozoon_catesbianae GAGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

TTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGTCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGCCACACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
TTTGTTAAAGACAAACTATGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTTCATT
***** ** **** *****

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT
AATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGT

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep03
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTAATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTAATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTAATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACG
CTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGAAGGTCGTCTTAATAAACG

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTAGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-
ACTCCTTCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTCTTGGGGGGA-

Hepatozoon_sp_DG1
Hepatozoon_sp_European_pine_ma
Hep02
Hep03
Hepatozoon_sp_BV1
Hepatozoon_sp_Squirrel
Hepatozoon_ayorgbor
Hepatozoon_sp_Boiga
Hepatozoon_catesbianae

GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA
GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCA

```

Hepatozoon_sp_DG1      GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma  GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGG
Hep02                  GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGG
Hep03                  GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGG
Hepatozoon_sp_BV1     GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGG
Hepatozoon_sp_Squirrel  GCGTGGAGCCCGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGG
Hepatozoon_ayorgbor   GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGG
Hepatozoon_sp_Boiga   GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAATTTACCAGG
Hepatozoon_catesbiana  GCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACTAGG
*****

Hepatozoon_sp_DG1      TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma  TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTTTATG
Hep02                  TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hep03                  TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hepatozoon_sp_BV1     TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hepatozoon_sp_Squirrel  TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hepatozoon_ayorgbor   TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hepatozoon_sp_Boiga   TCCAGACATAGAAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATG
Hepatozoon_catesbiana  TCCAGACATAAAAAGGATTGACAGAT-GATAGCTCTTTCTTAATTCTATG
*****

Hepatozoon_sp_DG1      GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma  GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hep02                  GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hep03                  GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hepatozoon_sp_BV1     GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hepatozoon_sp_Squirrel  GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGGGGATGGTCTGGTTA
Hepatozoon_ayorgbor   GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hepatozoon_sp_Boiga   GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
Hepatozoon_catesbiana  GGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTA
*****

Hepatozoon_sp_DG1      ATTCC
Hepatozoon_sp_European_pine_ma  ATTCC
Hep02                  ATTCC
Hep03                  ATTCC
Hepatozoon_sp_BV1     ATTCC
Hepatozoon_sp_Squirrel  ATTCC
Hepatozoon_ayorgbor   ATTCC
Hepatozoon_sp_Boiga   ATTCC
Hepatozoon_catesbiana  ATTCC
*****

```

Figura 11. Alinhamento múltiplo das sequências obtidas através da amplificação de uma região do 18S rDNA pela PCR, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos G e M, realizado pelo programa CLUSTAL X (1.8). Os nucleotídeos marcados representam pontos de mutação dos sítios polimórficos das amostras em estudo.

A análise da árvore filogenética, relacionada a esse fragmento, apontou a separação de Hep2 (Gamontes 2) e Hep3 (Gamontes 3) em um ramo, formando um grupo robusto com alto valor de *bootstrap* (100%). Essa mesma árvore também demonstra as relações filogenéticas entre os isolados em questão e os de outras hemogregarinas disponíveis no *GenBank* (Figura 12). A comparação com tais sequências apontou um alto índice de similaridade com *Hepatozoon* sp. DG1 para ambas amostras. As demais sequências não foram apresentadas, uma vez que a reação de PCR gerou produtos inespecíficos identificados após o sequenciamento das mesmas.

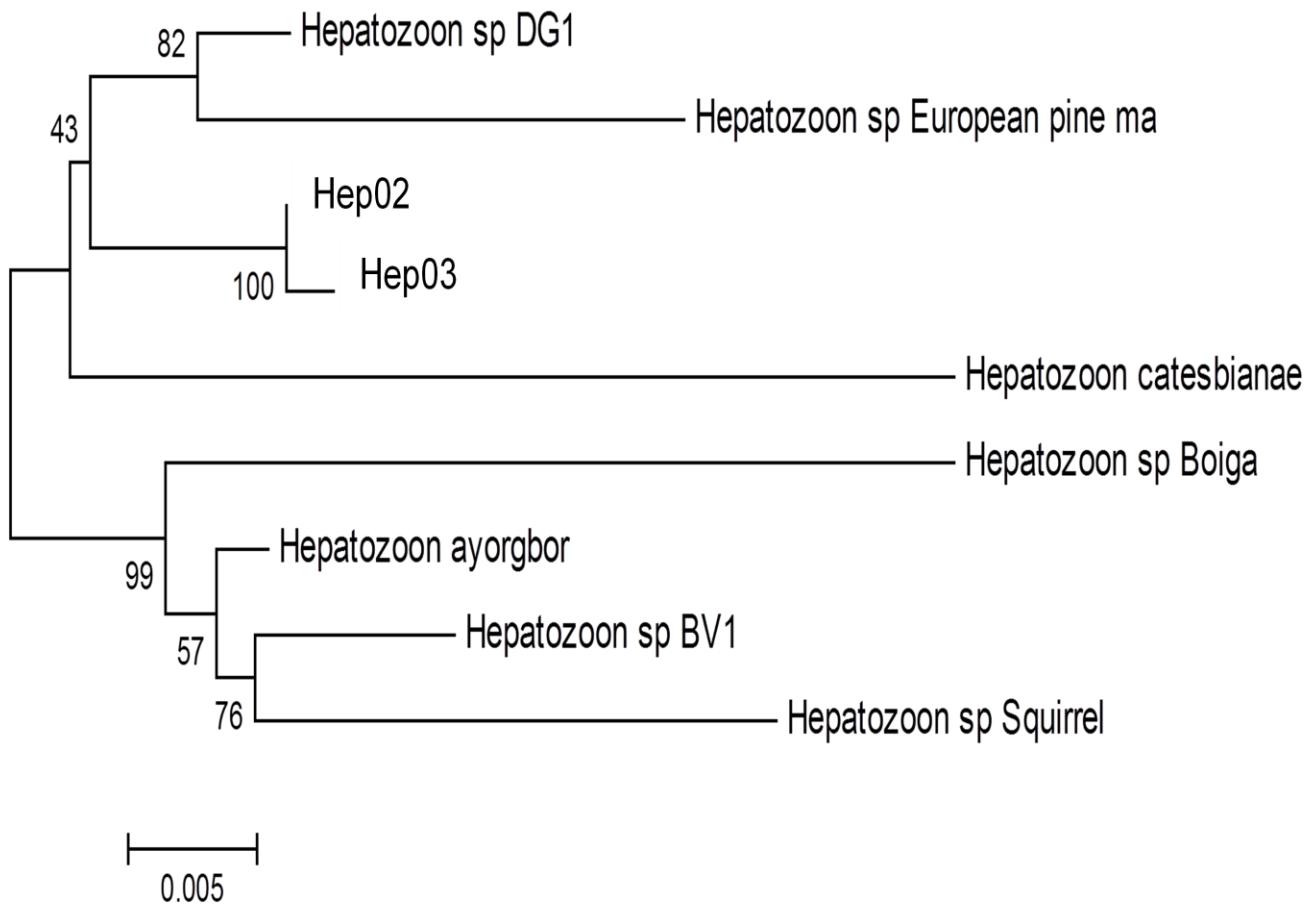


Figura 12. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp., relacionados às sequências obtidas com a associação dos pares de oligonucleotídeos G e M. Números nos nós indicam valores de *bootstrap* sobre 1000 réplicas. Escala indica a distância evolucionária de 0.005 nucleotídeos por posição na sequência.

- Oligonucleotídeos 4558/ 4559 (P)

Na tentativa de padronização da reação da PCR para os oligonucleotídeos 4558 e 4559 (internos aos 4558/ 2733), foram, assim como para os demais, realizados vários testes de concentração de reagentes, baseando-se no perfil de ciclo proposto em literatura (Tabela 2), mas as únicas amostras em que obtivemos sucesso na amplificação de fragmentos foram as correspondentes aos Gamontes 2, 3 e 5 (Figura 13) nas condições: 2,5 ul de Tampão, 0,75 ul de MgCl₂, 0,5 ul de dNTPs, 0,5 ul de oligonucleotídeos (F/R), 0,3 ul de Taq DNA Polymerase e 1 ul de DNA puro. Entretanto, submetidas ao sequenciamento, tais amostras não apontaram homologia a *Hepatozoon* spp., amplificando fragmentos inespecíficos, como o ocorrido para os pares de oligonucleotídeos 18S/5.8S, 4558/2733 e 4374/2733.

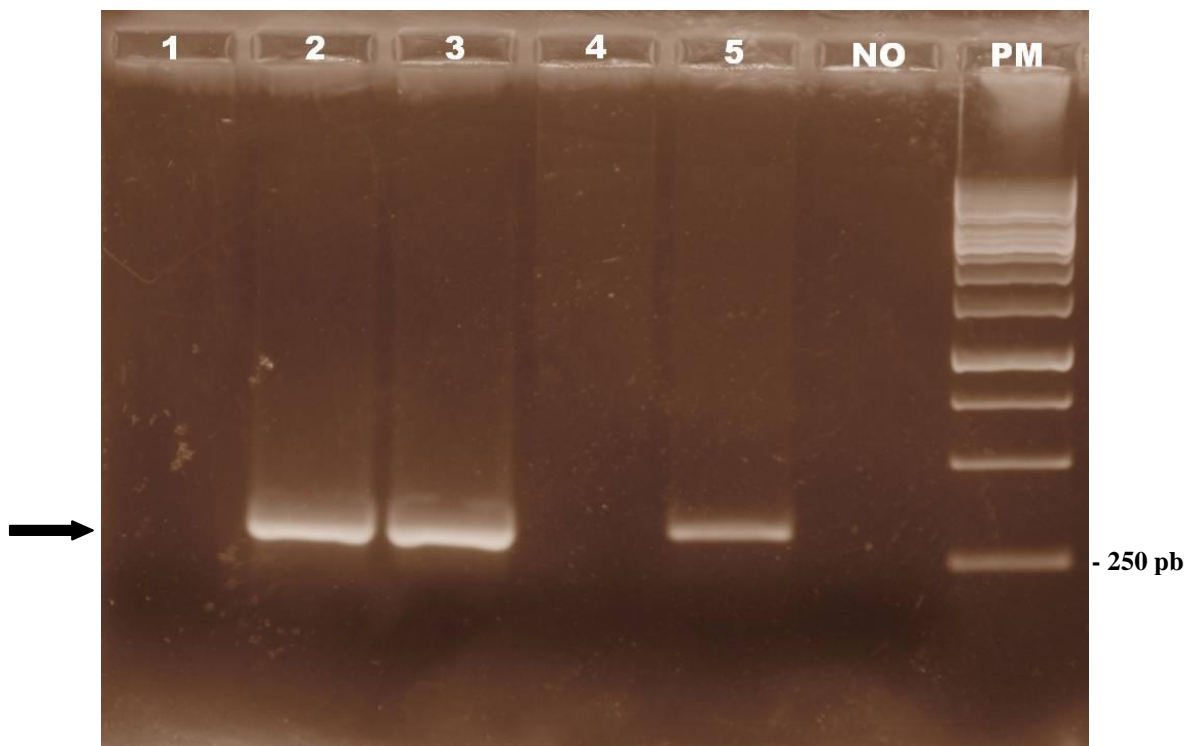


Figura 13. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos P. Poços 1- 5: Gamontes 1 – 5; NO: controle negativo; PM: Marcador de Peso Molecular (1kb). Seta indica fragmento amplificado de 300 pb.

- Oligonucleotídeos HepF300/ Hep900

Na tentativa de padronização da reação da PCR para os oligonucleotídeos HepF300 e Hep900, foram realizados testes de concentração de reagentes e gradiente de temperatura de anelamento, baseando-se no perfil de ciclo proposto em literatura (Tabela 2), obtendo-se sucesso na amplificação das cinco amostras (Figura 14) nas condições: 2,5 ul de Tampão, 1,75 ul de MgCl₂, 0,5 ul de dNTPs, 0,75 ul de oligonucleotídeos (F/R), 0,3 ul de Taq DNA Polymerase e 1 ul de DNA diluído (1 DNA: 49 H₂O). Todas amplificaram o fragmento esperado (Tabela 3).

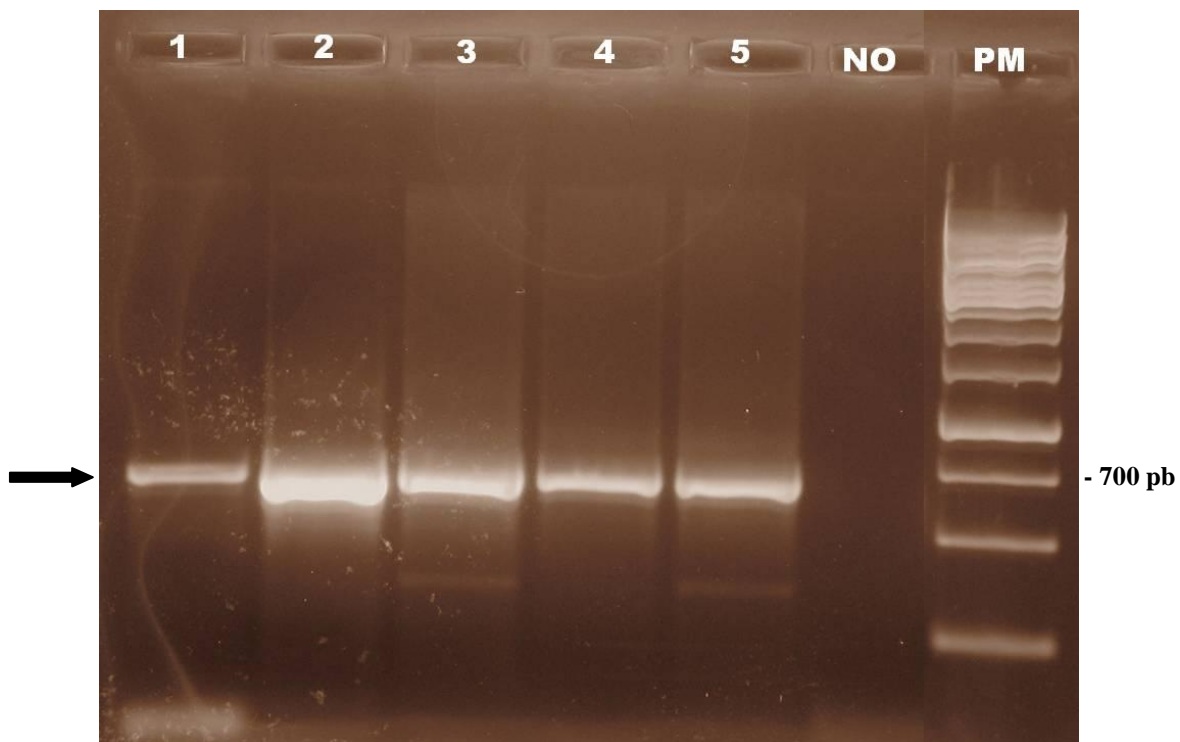


Figura 14. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos HepF300/Hep900. Poços 1- 5: Gamontes 1 – 5; NO: controle negativo; PM: Marcador de Peso Molecular (1kb). Seta indica fragmento amplificado de 600 pb.

Hep04	CATACCGTCGAAAGCTG
Hep05	CATACCGTCGAAAGCTG
Hep01	CATACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_sp_Varanus_scalaris	CATACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_sp_Boiga	C-----GTCGAAAGCTG
Hepatozoon_ayorgbor	CTTACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_sp_Squirrel	CTTACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_sp_BV1	CTTACCGTCGAAAGCTG
Hep02	CATACCGTCGAAAGCTG
Hep03	CATACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_sp_DG1	CATACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma	CATACCGTCGAAAGCTG
Hepatozoon_catesbiana	TATACCGTCGAAAGCTG

Figura 15. Alinhamento múltiplo das sequências obtidas através da amplificação de uma região do 18S rDNA pela PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos HepF300/Hep900, realizado pelo programa CLUSTAL X (1.8). Os nucleotídeos marcados representam pontos de mutação dos sítios polimórficos das amostras em estudo.

A análise da árvore filogenética, relacionada a tal fragmento, apontou a separação de Hep1 (Gamontes 1), Hep4 (Gamontes 4) e Hep5 (Gamontes 5) em um ramo, formando um grupo robusto com alto valor de *bootstrap* (99%). Tal árvore demonstra também, as relações filogenéticas entre os isolados em questão e os de outras hemogregarinas disponíveis no *GenBank* (Figura 16). A comparação com tais sequências apontou um alto índice de similaridade com *Hepatozoon* sp. de *Varanus scalaris*, bem como a monofilia desse grupo com a espécie de *Hepatozoon* parasita do varanídeo em questão.

As sequências das hemogregarinas encontradas em Hep2 (Gamontes 2) e Hep3 (Gamontes 3) mostraram-se claramente distinta das demais. Tais sequências demonstraram alto índice de similaridade com *Hepatozoon ayorgbor*, bem como com *Hepatozoon* sp. DG1.

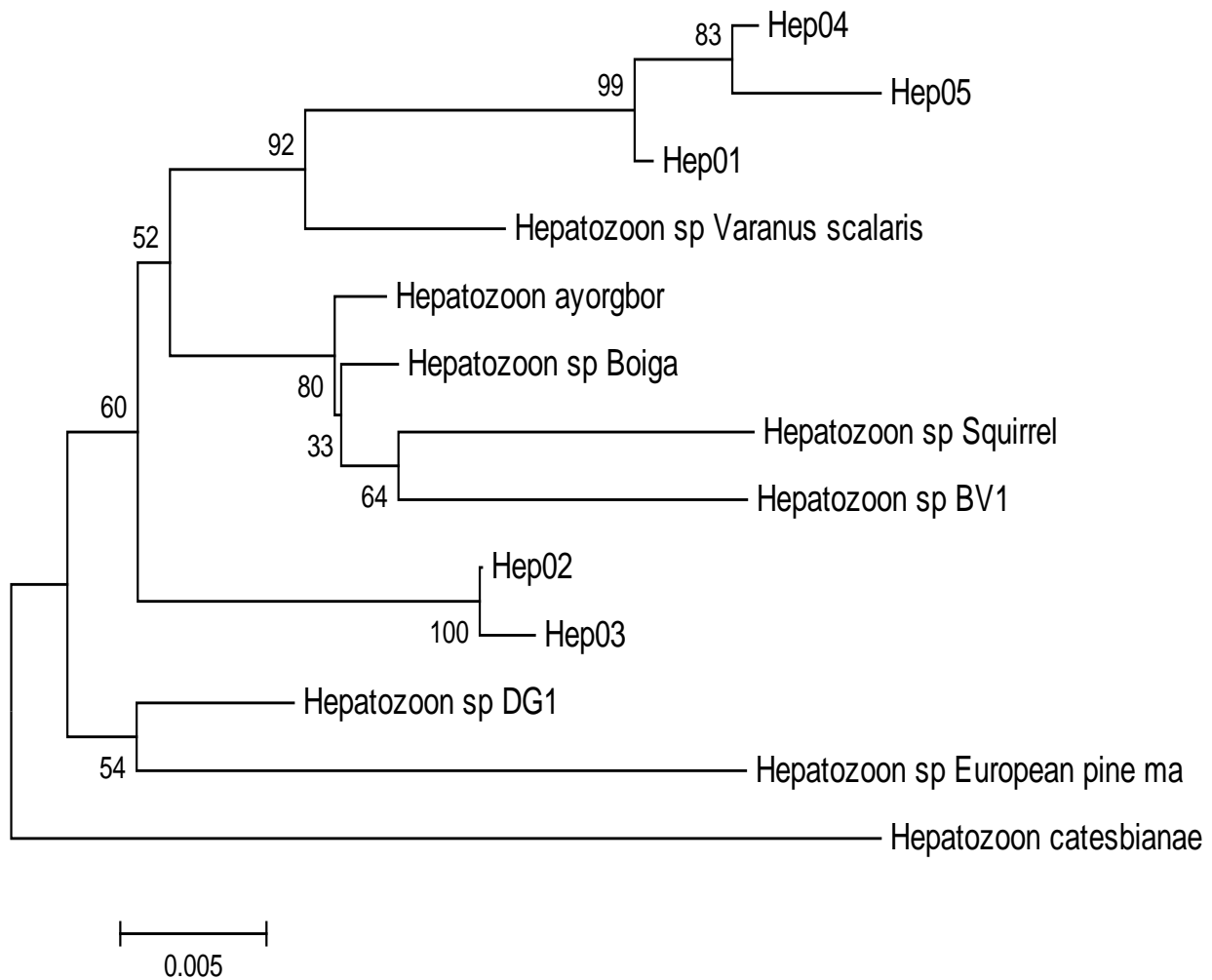


Figura 16. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp., relacionados às sequências obtidas com a utilização dos oligonucleotídeos HepF300/Hep900. Números nos nós indicam valores de *bootstrap* sobre 1000 réplicas. Escala indica a distância evolucionária de 0.005 nucleotídeos por posição na sequência.

- Oligonucleotídeos HEMO1/ HEMO2

Para a padronização da reação da PCR usando os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2, também foram realizados testes de concentração de reagentes e gradiente de temperatura de anelamento, baseando-se no perfil de ciclo proposto em literatura (Tabela 2), com sucesso na amplificação do fragmento desejado (Tabela 3), para os cinco gamontes (Figura 17), nas condições: 2,5 ul de Tampão, 1,75 ul de MgCl₂, 0,5 ul de dNTPs, 0,75 ul de oligonucleotídeos (F/R), 0,3 ul de Taq DNA Polymerase e 1 ul de DNA.

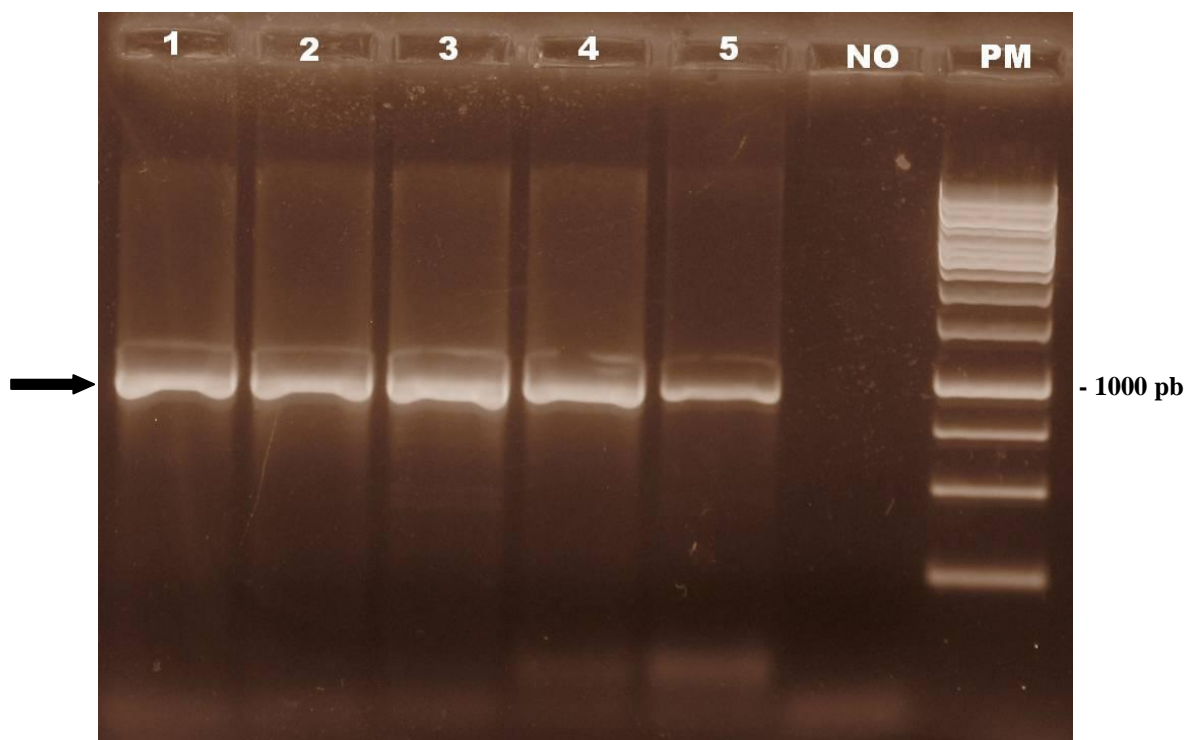


Figura 17. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2. Poços 1- 5: Gamontes 1 – 5; NO: controle negativo; PM: Marcador de Peso Molecular (1kb). Seta indica fragmento amplificado de 1000 pb.

O sequenciamento dessas cinco amostras obteve fragmentos de 879 pb, cujo alinhamento, obtido utilizando-se o programa CLUSTAL X, apontou 117 posições informativas, distribuídas por toda a extensão do fragmento, sendo que 11 pontos de mutações dos sítios polimórficos, diferenciam o isolado 3 (Hep3) das demais amostras, que se mostraram idênticas. Dentre tais mutações, foram identificadas 8 transições e 3 transversões (Figura 18).

```

Hep01      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hep02      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hep04      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hep05      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_sp_BV1      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_sp_squirrel      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_ayorgbor      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_sp_Boiga      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hep03      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_sp_DG1      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma      CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
Hepatozoon_catesbiana     CAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTG
*****

Hep01      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hep02      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hep04      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hep05      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_sp_BV1      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_sp_squirrel      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_ayorgbor      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_sp_Boiga      TTAAAGACACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hep03      TTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_sp_DG1      TTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_sp_European_pine_ma      TTAAAGACAAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
Hepatozoon_catesbiana     TTAAAGACAAACTATTGCGAAAGCATTGCGCAAAGATGTTTTCATTAATC
*****

Hep01      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hep02      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hep04      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hep05      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_sp_BV1      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_sp_squirrel      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_ayorgbor      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_sp_Boiga      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hep03      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_sp_DG1      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma      AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA
Hepatozoon_catesbiana     AAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTTA
*****

```

Hep01 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATGAACGACTC
Hep02 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATGAACGACTC
Hep04 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATGAACGACTC
Hep05 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATGAACGACTC
Hepatozoon_sp_BV1 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTT-TAAACGACTC
Hepatozoon_sp_squirrel ACTATAAACTATGCCTACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACGACTC
Hepatozoon_ayorgbor ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACGACTC
Hepatozoon_sp_Boiga ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACGACTC
Hep03 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTATAAACGACTC
Hepatozoon_sp_DG1 ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACGACTC
Hepatozoon_sp_European_pine_ma ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTATAAACGACTC
Hepatozoon_catesbianaee ACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGAAGGTCGTCTTATAAACGACTC

Hep01 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hep02 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hep04 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hep05 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_sp_BV1 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_sp_squirrel CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_ayorgbor CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_sp_Boiga CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hep03 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_sp_DG1 CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTAGGTTCTGGGGGAGTATG
Hepatozoon_catesbianaee CTTCAGCACCTTACAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATG

Hep01 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hep02 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hep04 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hep05 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_sp_BV1 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_sp_squirrel GTGGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_ayorgbor GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_sp_Boiga GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hep03 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_sp_DG1 GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_sp_European_pine_ma GTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
Hepatozoon_catesbianaee GTCGCAACGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGT
** **** *****

Hep01 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCGG
Hep02 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCGG
Hep04 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCGG
Hep05 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCGG
Hepatozoon_sp_BV1 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAG
Hepatozoon_sp_squirrel GGAGCCC GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAG
Hepatozoon_ayorgbor GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAG
Hepatozoon_sp_Boiga GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAATTTACCAGGTCCAG
Hep03 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAG
Hepatozoon_sp_DG1 GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma GGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAG
Hepatozoon_catesbianaee GGATCCTGCTGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACTACGTCTCA
*** ** * *****

Hep01 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hep02 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hep04 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hep05 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hepatozoon_sp_BV1 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hepatozoon_sp_squirrel ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hepatozoon_ayorgbor ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hepatozoon_sp_Boiga ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hep03 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hepatozoon_sp_DG1 ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTCTATGG
Hepatozoon_sp_European_pine_ma ACATAG----AAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTTTATGG
Hepatozoon_catesbianaee GTACATTCCTAATGGATTGACTTATTGATCTCTCTCTTACTTCTATGG

* * * * * ** *

Hep01 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hep02 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hep04 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hep05 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_sp_BV1 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_sp_squirrel GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_ayorgbor GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_sp_Boiga GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hep03 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_sp_DG1 GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA
Hepatozoon_catesbianaee GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG-ATTTGTCTGGTTAA

***** *

Hep01 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACTTGCTAAATAGGGTTAAAAACATT
Hep02 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACTTGCTAAATAGGGTTAAAAACATT
Hep04 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACTTGCTAAATAGGGTTAAAAACATT
Hep05 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACTTGCTAAATAGGGTTAAAAACATT
Hepatozoon_sp_BV1 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTTAAAAACTTT
Hepatozoon_sp_squirrel TTCCGTTAACGAACGGAGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTCAACACACTTT
Hepatozoon_ayorgbor TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTTAAAAACTTT
Hepatozoon_sp_Boiga TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTTAA----TTT
Hep03 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTTAAAAACTTT
Hepatozoon_sp_DG1 TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTTAAAAACTTT
Hepatozoon_sp_European_pine_ma TTCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTGCTAAATAGGGTGAAAAGCTTT
Hepatozoon_catesbianaee TTCAGTTAACGAACG-ACACCTTAACCTGCTAAATAGGGTTAAAAACTTT

*** *

Hep01 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hep02 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hep04 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hep05 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_sp_BV1 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_sp_squirrel GGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_ayorgbor TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_sp_Boiga TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hep03 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_sp_DG1 TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA
Hepatozoon_catesbianaee TGTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGCGTGTCTAACGCAAGG-AA

***** *


```

Hep01      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hep02      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hep04      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hep05      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_sp_BV1      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_sp_squirrel      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_ayorgbor      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_sp_Boiga      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hep03      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_sp_DG1      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
Hepatozoon_catesbianaee      GATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGA
*****

Hep01      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hep02      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hep04      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hep05      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hepatozoon_sp_BV1      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hepatozoon_sp_squirrel      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hepatozoon_ayorgbor      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hepatozoon_sp_Boiga      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hep03      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hepatozoon_sp_DG1      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAGA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAACAGTTTATGTGTTAAA
Hepatozoon_catesbianaee      GTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATTAAA
*****

Hep01      TATAGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAA
Hep02      TATAGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAA
Hep04      TATAGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAA
Hep05      TATAGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAA
Hepatozoon_sp_BV1      TATAGAAAGTTTTG-AAATCTTATCACTTAGACGAA
Hepatozoon_sp_squirrel      TATAGAAAGTTTTGTAAATCTTATCACTTAGAC---
Hepatozoon_ayorgbor      TATAGAAAGTTTTGTAAATCTTATCACTTAGAGGAA
Hepatozoon_sp_Boiga      TATAGAAAGTTTTGTAAATCTTATTACTTAGACGAA
Hep03      TATAGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAA
Hepatozoon_sp_DG1      TATAGAAAGTTTTGTAAACCTTATCACTTAGACGAA
Hepatozoon_sp_European_pine_ma      TA-AGAAAGTTTTGTAAATCTTATCACTTAGACGAA
Hepatozoon_catesbianaee      TATAGAAAGTTTTGTAAATCTTATCACTTAGAGGAA
** ***** ** ***** ***** *

```

Figura 18. Alinhamento múltiplo das sequências obtidas através da amplificação de uma região do 18S rDNA pela PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2, realizado pelo programa CLUSTAL X (1.8). Os nucleotídeos marcados representam pontos de mutação dos sítios polimórficos das amostras em estudo.

A análise da árvore filogenética apontou que, com relação ao fragmento estudado, Hep3 (Gamontes 3) se encontra distante filogeneticamente de Hep1 (Gamontes 1), Hep2 (Gamontes 2), Hep4 (Gamontes 4) e Hep5 (Gamontes 5), que se mostraram idênticos, apesar de suas diferenças morfológicas e que formaram um grupo robusto com alto valor de *bootstrap* (100%). Tal árvore também demonstra as relações filogenéticas entre os isolados em questão e os de outras hemogregarinas disponíveis no *GenBank* (Figura 19), cuja comparação apontou, para tais amostras,

alto índice de similaridade com *Hepatozoon* sp. *Boiga*, bem como a monofilia deste grupo com a espécie de *Hepatozoon* parasita da serpente em questão (*Boiga* sp.).

A sequência de Hep3 foi única e claramente distinta das amplificadas dos demais espécimes. Essa sequência demonstrou alto índice de similaridade com *Hepatozoon* sp. DG1, bem como com *H. ayorgbor*.

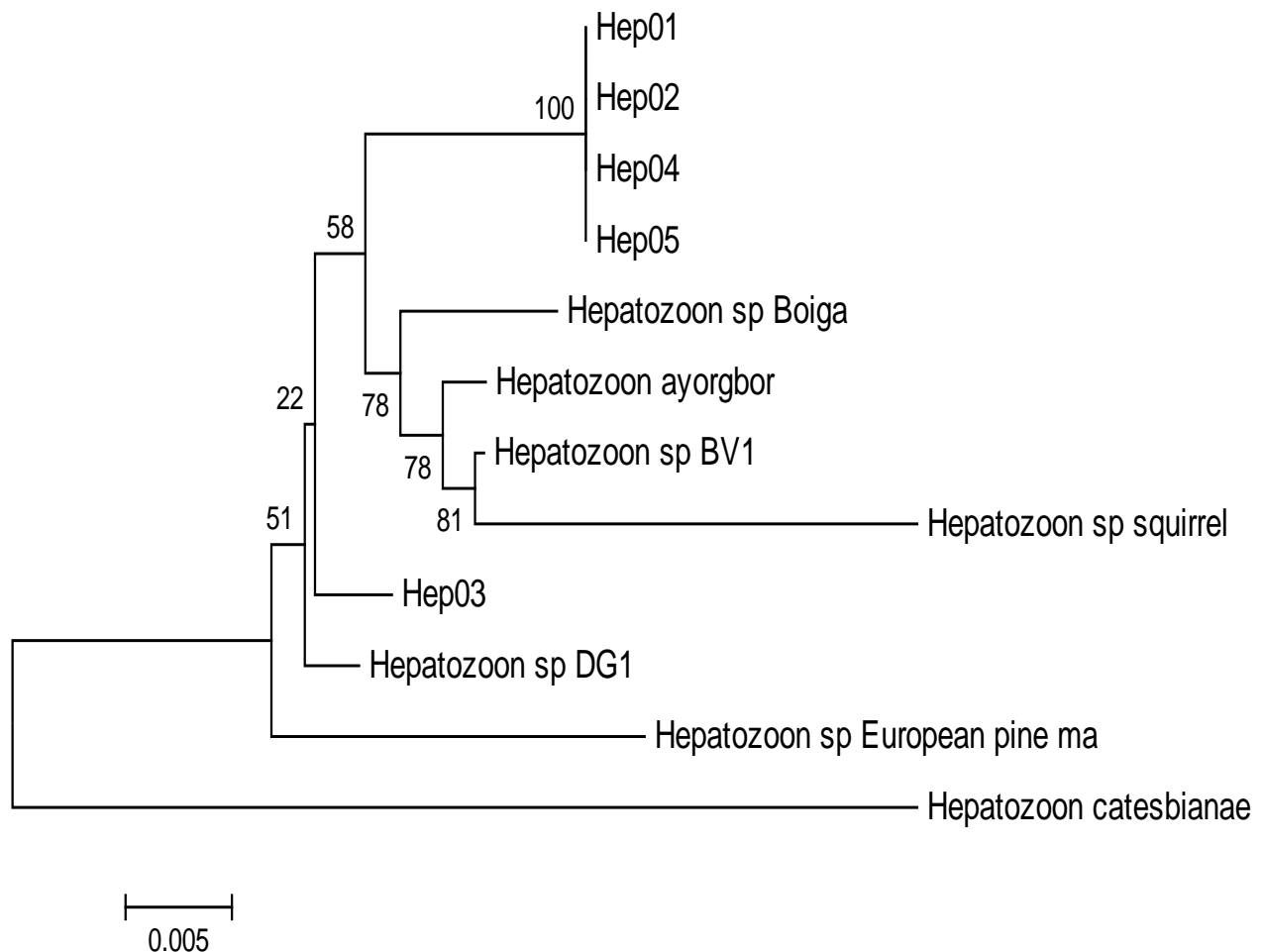


Figura 19. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp., relacionados às sequências obtidas com a utilização dos oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2. Números nos nós indicam valores de *bootstrap* sobre 1000 réplicas. Escala indica a distância evolucionária de 0.005 nucleotídeos por posição na sequência.

As sequências das cinco amostras (Hep1, Hep2, Hep3, Hep4 e Hep5) obtidas pela utilização dos pares de oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2 e HepF300/Hep900, também foram analisadas em associação, resultando em um fragmento de 1395pb, cujo alinhamento obtido, utilizando-se o programa CLUSTAL X, apontou 186 posições informativas, distribuídas por toda sua extensão, demonstrando 29 pontos de mutações dos sítios polimórficos, dentre estes, identificadas 19 transições e 10 transversões.

A análise da árvore filogenética, relacionada à associação destes dois fragmentos, apontou todas as amostras como sendo um grupo monofilético, composto por subgrupos. Um primeiro, que agrupou os Gamontes 1, 4 e 5 (Hep1, Hep4 e Hep5) em um ramo robusto, com alto valor de *bootstrap* (99%), outro, separando este primeiro dos Gamontes 2 (Hep2) (73% *bootstrap*), e um terceiro, separando os Gamontes 3 (Hep3) (75% *bootstrap*) dos demais subgrupos. Essa árvore demonstra também, as relações filogenéticas entre os isolados em questão e os de outras hemogregarinas disponíveis no *GenBank* (Figura 20). Essa comparação sugere uma proximidade filogenética desse grupo monofilético com *Hepatozoon* sp. *Boiga* e com *H. ayorgbor*.

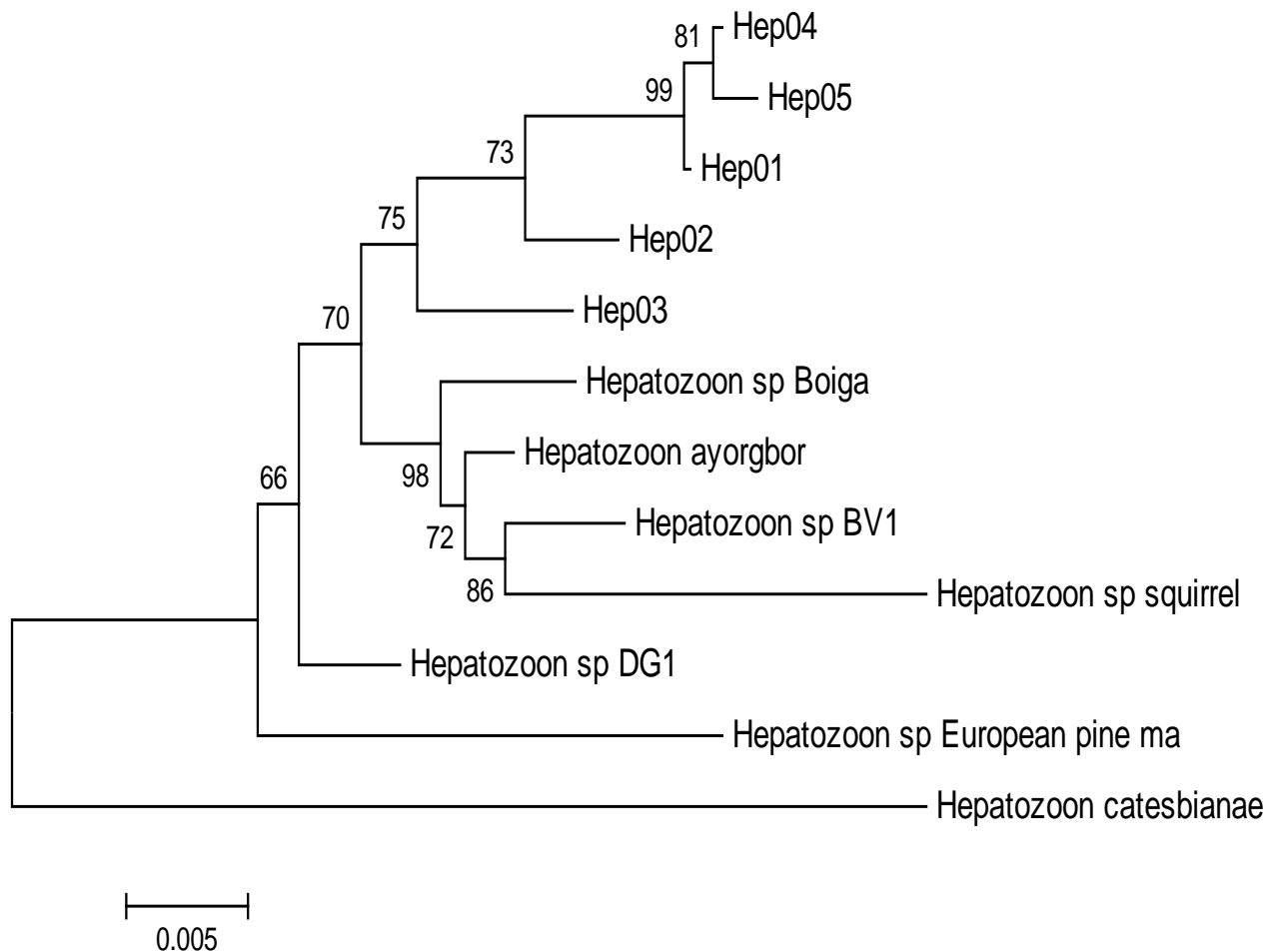


Figura 20. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp., relacionados às sequências obtidas com a associação dos oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2 e HepF300/900. Números nos nós indicam valores de *bootstrap* sobre 1000 réplicas. Escala indica a distância evolucionária de 0.005 nucleotídeos por posição na sequência.

Tabela 7. Espécies de *Hepatozoon* utilizadas para construção da árvore filogenética, seus respectivos números de acesso do *GenBank* e hospedeiros intermediários.

Espécies	Número de acesso do GenBank	Hospedeiros intermediários
<i>Hepatozoon</i> sp. <i>Varanus scalaris</i>	AY252108	Varanídeo australiano
<i>Hepatozoon</i> <i>ayorgbor</i>	EF157822	Serpente (<i>Python regius</i>)
<i>Hepatozoon</i> sp. <i>Boiga</i>	AF297085	Serpente (<i>Boiga</i> sp.)
<i>Hepatozoon</i> sp. Squirrel	EF222259	Esquilo
<i>Hepatozoon</i> sp. BV1	AY600626	Roedor (<i>Clethrionomys glareolus</i>)
<i>Hepatozoon</i> sp. DG1	FJ719813	Marsupial Chileno (<i>Dromiciops gliroides</i>)
<i>Hepatozoon</i> sp. European pine marten	EF222257	Mamífero mustelídeo
<i>Hepatozoon</i> <i>catesbiana</i>	AF176837	Anuro (<i>Rana catesbeiana</i>)

Discussão

Os espécimes de *C. durissus terrificus* são parasitados por, aparentemente, uma grande variedade de gamontes de *Hepatozoon* spp. Alguns indivíduos estavam infectados por até cinco formas, morfológica e morfometricamente, diferentes entre si (O'Dwyer et al., 2004b). Moço et al., (2002) levantaram a hipótese de que através de estudos morfológicos e morfométricos mais detalhados fosse possível separar espécies de *Hepatozoon* de serpentes. Contudo, os dados obtidos apontaram a necessidade de se lançar mão de técnicas moleculares para tal propósito.

No presente estudo, quando os gamontes foram analisados morfologicamente, das cinco formas parasitárias visualizadas, os Gamontes 1, 4 e 5 se apresentaram mais semelhantes entre si, com exceção de seus núcleos. Esses gamontes são grandes e largos, com citoplasma claro e extremidades abauladas. Já os Gamontes 2 e 3 são visivelmente distintos, tanto entre si, como em relação aos demais. Ambos possuem uma extremidade mais larga e outra afilada, mas se diferenciam pela coloração do citoplasma, mais basofílico no Gamonte 3. Assim, a análise morfológica apontou três grupos distintos de gamontes.

Com relação à caracterização morfométrica, estudando separadamente cada uma das variáveis, notamos que os Gamontes 1, 4 e 5, embora sejam morfológicamente semelhantes, possuem algumas variáveis distintas entre si, tanto relacionadas ao parasita, como ao seu núcleo. Assim, os três gamontes possuem comprimentos distintos, sendo que o Gamonte 1 possui maior comprimento e maior largura do núcleo, se comparado aos demais, sendo o Gamonte 5 o menor deles em comprimento. Com relação às suas áreas, o Gamonte 5 é ligeiramente menor do que os Gamontes 1 e 4. Por outro lado, nos Gamontes 2 e 3, morfológicamente distintos, quatro das seis variáveis analisadas não apresentaram diferenças estatísticas entre si. O Gamonte 2 possui maior área do núcleo, bem como maior largura do núcleo com relação ao Gamonte 3. De acordo com Ball (1970), os gamontes de uma mesma espécie podem apresentar pequenas alterações, dependendo do hospedeiro, o que poderia justificar as diferenças morfométricas entre os Gamontes 1, 4 e 5.

Apesar do apontado pela análise morfológica, o resultado da análise multivariada dos componentes de comparação entre os gamontes, também sugeriu a existência de três populações de parasitas, embora tenham revelado muitas sobreposições entre seus elementos e essas três populações tenham sido agrupadas diferentemente das apontadas pela morfologia. Aqui, uma primeira população foi formada por elementos correspondentes aos Gamontes 1, parasitas do exemplar Cdt136, outra, onde

se mesclam elementos correspondentes aos Gamontes 2 e 3, parasitas dos exemplares Cdt137 e Cdt157, respectivamente, e uma terceira, onde estão representados os Gamontes 4 e 5, parasitas dos exemplares Cdt176 e Cdt177, respectivamente. Assim, a morfometria não pode ser tida como parâmetro único para diferenciar as espécies desses parasitas, e sim como ferramenta adicional ao estudo da diferenciação de *Hepatozoon* spp. em serpentes, como também sugeriram Moço et al. (2002, 2011).

Moço et al. (2002) observaram, também em um exemplar de *C. durissus terrificus*, gamontes que apresentavam corpo afilado e alongado, citoplasma claro, sem granulações e núcleo denso e homogêneo, localizado centralmente ou ligeiramente deslocado para uma das extremidades, distintos dos aqui encontrados, bem como dos descritos em literatura, para essa espécie de serpente, podendo representar uma outra espécie de *Hepatozoon*.

Uma pequena espécie de *Hepatozoon*, também de *C. durissus terrificus*, foi descrita por O'Dwyer et al. (2004a). Seus gamontes possuíam dimensões muito menores dos que os usuais, com citoplasma claro, sem granulações e núcleo grande ocupando boa parte do citoplasma.

O'Dwyer et al. (2011) descreveram, em três exemplares de *C. durissus terrificus*, três espécies de *Hepatozoon*, uma das quais, muito parecidas com os Gamontes 1, 4 e 5, aqui descritos (gamontes grandes e largos, com citoplasma claro e extremidades abauladas).

Gamontes de dimensões e morfologia muito parecidas com alguns dos encontrados no presente estudo, todos parasitas de *C. durissus terrificus*, também foram descritos por Moço et al. (2011). Um, semelhante aos Gamontes 2 e 3 deste estudo, com uma extremidade afilada e apenas sutis diferenças quanto ao formato dos núcleos e coloração do citoplasma (intermediária entre 2 e 3); outros, semelhantes aos Gamontes 1, 4 e 5 deste estudo.

Formas parecidas com os gamontes 1, 4 e 5 também foram descritas parasitando outras espécies de serpentes (Pessoa, 1967a,b,c, 1968; Pessoa e Cavalheiro, 1969). Fato que reitera a hipótese de *Hepatozoon* spp. possuírem baixa especificidade aos hospedeiros vertebrados (Smith, 1996).

Com relação às alterações induzidas pelos gamontes nos eritrócitos, todos os cinco alteraram as hemácias parasitadas em pelo menos cinco das seis variáveis analisadas, sendo que, duas (Gamontes 2 e 3), das cinco formas, alteraram todas as variáveis. Fato corroborado pela análise multivariada dos componentes de comparação entre hemácias parasitadas e não parasitadas, que apontou a separação (em diferentes níveis) entre esses grupos em todos os casos, sugerindo não deformações, como ocorre

nos eritrócitos parasitados por *Hepatozoon fusifex* de *Boa constrictor* (Ball et al., 1969), mas apenas alterações provocadas pelos parasitas, nas hemácias que os albergavam.

Em muitos artigos nos quais se descreveram gamontes morfológicamente semelhantes aos encontrados neste estudo (Pessoa, 1967a,b,c, 1968; Pessoa e Cavalheiro, 1969; O'Dwyer et al., 2011; Moço et al., 2011), também foram detectadas alterações nos eritrócitos infectados, mesmo que em níveis distintos. Entretanto, raros são os dados disponíveis em literatura que relacionem tais alterações com possíveis alterações patológicas. Wozniak et al. (1994a) descreveram uma espécie de hemogregarina que infecta serpentes, cujos gamontes provocavam hipertrofia eritrocítica e dehemoglobinação, mas não observaram evidências de processos inflamatórios associados com a presença dos merontes. Miyamoto e Mello (2007) observaram que infecção por *Hepatozoon* sp. acelerou a destruição de eritrócitos infectados e não infectados. Estas alterações nas hemácias poderiam levar à anemia e conseqüentemente, à doença nas serpentes. Nós observamos morte de algumas serpentes infectadas, algumas com alta parasitemia, sem causa aparente. Desta forma, estudos mais aprofundados devem ser conduzidos, no futuro, para verificarmos o potencial patogênico de *Hepatozoon* spp. para serpentes.

Moço et al. (2011) conduziram estudos moleculares com *Hepatozoon* spp. de *C. durissus terrificus* utilizando os oligonucleotídeos HepF/HepR (Inokuma et al., 2002) e PiroA1/PiroB (Jefferies et al., 2003), que amplificaram regiões do gene 18S rDNA, mas que se mostraram incapazes de diferenciar espécies de *Hepatozoon* das serpentes em questão. Assim, no presente estudo, foram testados outros oligonucleotídeos, alguns que amplificassem outras regiões e outros que amplificaram regiões do gene 18S rDNA, a fim de conseguir seqüências que apontassem diferenças entre esses parasitas.

Apesar de Smith et al. (1999) terem tido sucesso ao inferir relações filogenéticas de espécies de *Hepatozoon* de serpentes e rãs do Canadá, utilizando os oligonucleotídeos 18S e 5.8S, os mesmos não se mostraram eficientes na caracterização molecular de *Hepatozoon* spp., amplificando fragmentos inespecíficos. O motivo do fracasso é, por hora, desconhecido, mas pode estar relacionado às diferenças genômicas entre as amostras, já que são oriundas de regiões geográficas distintas e os oligonucleotídeos em questão foram desenhados especificamente para amplificar a região ITS-1 de serpentes e anfíbios de Ontário, Canadá.

A caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. utilizando-se os oligonucleotídeos ITS5 e ITS4 (White et al., 1990), “universais”, que amplificam as regiões ITS-1, 5.8S e ITS-2, também foi falha e o motivo de tal fato também é, por hora, desconhecido, mesmo porque tais oligonucleotídeos têm sido utilizados, principalmente, para a caracterização molecular de algumas espécies de fungos, não existindo, na literatura científica, dados sobre tentativas de sequenciamento dessas regiões genômicas de *Hepatozoon* spp. de serpentes.

Mathew et al. (2000) obtiveram sucesso nas inferências filogenéticas de *Hepatozoon* spp. parasitas de cães e anfíbios, utilizando os oligonucleotídeo desenhados por Medlin et al. (1988), Wozniak et al. (1994b) e outros, entre eles 4558/2733, 4374/2733 e 4558/4559, desenhados para amplificar regiões de gene 18S rDNA. Com relação ao presente estudo e à caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. utilizando-se os oligonucleotídeos 4558 e 2733 (G), as únicas amostras em que foram amplificados os fragmentos desejados foram as correspondentes aos Gamontes 2 e 3, cujos sequenciamentos apresentaram muitos pontos falhos, obrigando-nos a sobrepor as sequências originadas por tais oligonucleotídeos e as originadas pelos oligonucleotídeos 4374/ 2733 (M), internos aos anteriores, que amplificaram as cinco amostras, mas apenas 2 e 3 correspondiam ao fragmento desejado. A análise da árvore filogenética gerada apontou tais oligonucleotídeos como ineficientes para tal propósito, já que, além de amplificar fragmentos inespecíficos, não apontou diferenças relevantes (apesar do grande tamanho do fragmento sequenciado) entre as amostras citadas, embora morfologicamente, estas sejam distintas.

Os oligonucleotídeos 4558 e 4559 (P), também internos aos 4558 e 2733 (G), foram considerados, assim como os supracitados, ineficientes na caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. das serpentes em questão, já que as únicas amostras sequenciáveis (2, 3 e 5) também amplificaram fragmentos inespecíficos.

Com relação à sequência gerada pelo uso dos oligonucleotídeos HepF300/900 (Ujvari et al., 2004), a árvore filogenética apontou a separação de dois grupos robustos e muito distantes filogeneticamente. Um ramo que agrupou os Gamontes 1, 4 e 5, formando um grupo monofilético com *Hepatozoon* sp. de *V. scalaris* e filogeneticamente muito próximo a outro, em que se encontram espécies descritas como parasitas de serpentes e mamíferos de regiões geográficas distintas da região onde foi realizado nosso estudo. Outro ramo, agrupou os Gamontes 2 e 3, próximos a *Hepatozoon* sp. DG1, parasita do marsupial chileno *Dromiciops gliroides*. Tais resultados, embora, no caso dos

Gamontes 1, 4 e 5 coincidam com nossos achados morfológicos e morfométricos, não nos parecem ideais, já que, além da separação sutil entre as amostras 2 e 3, morfológicamente distintas, distanciaram tais grupos, que teoricamente, por habitarem a mesma região geográfica e parasitarem uma mesma espécie de serpente, deveriam estar mais próximos.

Analisando a sequência gerada pela utilização dos oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 (Perkins e Keller, 2001), os resultados também não foram considerados ideais, já que a análise de sua árvore filogenética apontou a separação do Gamonte 3 dos demais, que se mostraram idênticos (apesar das diferenças apontadas pelas demais análises), bem como a grande distância filogenética entre os Gamontes 2 e 3, que segundo as análises morfológicas e morfométricas, teriam grande probabilidade de aparecerem mais próximas. Mais uma observação que corrobora as nossas suspeitas com relação a estes resultados: assim como nos resultados anteriores, as relações filogenéticas apontadas não condizem com as relações biológicas e geográficas naturalmente encontradas, distanciando espécies, que teoricamente, deveriam estar mais próximas.

Também utilizando os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2, Telford et al. (2004, 2005) obtiveram sucesso em inferir as relações filogenéticas de isolados de hemogregarinas de serpentes da Flórida, bem como, descreveram uma nova espécie de *Hepatozoon* parasita de *Coluber constrictor priapus* e *Thamnophis sauritus sackenii*.

Já, no presente estudo, devido aos resultados obtidos, decidimos lançar mão da associação das sequências originadas a partir dos pares de oligonucleotídeos HepF300/900 e HEMO1/HEMO2, como já realizado por Harris et al. (2011) e Maia et al. (2011), que obtiveram sucesso em tal associação, para inferir relações filogenéticas entre *Hepatozoon* spp. de serpentes.

A análise dessa nova árvore filogenética apontou todos os gamontes como sendo um grupo monofilético, composto por subgrupos: um primeiro, que agrupou os Gamontes 1, 4 e 5 em um ramo robusto; outro, separando este primeiro dos Gamontes 2; e um terceiro, separando os demais subgrupos dos Gamontes 3, sugerindo também, uma proximidade filogenética deste grupo com parasitas de outras espécies de serpentes. Tais resultados sim, nos pareceram mais confiáveis, hipótese esta, sustentada pela estrita relação entre esses dados moleculares e nossos achados morfológicos e morfométricos. Além do que, as relações filogenéticas entre tais isolados, refletiriam relações naturais mais próximas das reais, com a proximidade entre espécies de uma mesma região geográfica e entre espécies animais relacionadas.

Embora vários trabalhos sobre caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. também tenham incluído dados morfológicos e morfométricos das fases esporogônicas ou até merogônicas do parasita, no presente estudo, a inclusão de tais dados não foi possível, já que os exemplares de serpentes eleitos vieram a óbito no decorrer do experimento, antes mesmo do estabelecimento de matrizes (viáveis) de colônias de vetores que seriam utilizadas na infecção experimental. Tal fato, provavelmente, não comprometeu nossos resultados já que, os estágios esporogônicos e esquizogônicos de diferentes espécies de *Hepatozoon* são muito semelhantes (Pessoa et al., 1970a,b,c, 1971a,b, 1974a,b; Pessoa e De Biasi, 1972, 1973a,b, 1974) e os oocistos de uma mesma espécie, além de não apresentarem uma sincronia no desenvolvimento, têm dimensões muito variadas, quando maduros. Assim, tais medidas teriam pouco valor taxonômico (Desser et al., 1995; Moço et al., 2011).

Podemos inferir, assim, que trabalhamos, provavelmente, com três espécies de *Hepatozoon*: uma, que compreende os Gamontes 1, 4 e 5, outra que inclui os Gamontes 2, e uma última, representada, aqui, pelos Gamontes 3. Estas duas últimas, embora estejam agrupadas pela análise morfométrica, pela análise molecular se separam por uma distância evolutiva bem superior à distância entre duas espécies já descritas, no caso *Hepatozoon*. sp. *Boiga* e *H. ayorgbor*, justificando assim sua separação em espécies distintas.

Apesar do sucesso na separação das espécies em questão, nomeações de novas espécies não se justificam (como o ocorrido no estudo conduzido por Ujvari et al., 2004), por falta de mais dados biológicos e epidemiológicos para uma caracterização completa de tais protozoários.

Provavelmente, utilizando associações de oligonucleotídeos, incluindo, principalmente, os que amplifiquem regiões com conservadorismo intermediário como ITS-1 e ITS-2 (Navajas et al., 1999), a exemplo dos utilizados por Boulianne et al. (2007), associados às análises morfológicas e morfométricas, tanto da fase sanguínea, como das fases esporogônica e merogônica, aliados a estudos sobre capacidade vetorial de diferentes espécies, poderemos apurar cada vez mais a caracterização de tais parasitas, tentando elucidar as questões filogenéticas, tendo em vista toda problemática com relação à taxonomia e às relações epidemiológicas de *Hepatozoon* spp. de serpentes.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências¹

BALL, H.G. Hemogregarine life cycles. **J. Parasitol.**, v. 56, p. 17, 1970.

BALL, H.G.; CHAO, J.; TELFORD, S.R. *Hepatozoon fusifex* sp. n., a hemogregarine from *Boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. **J. Parasitol.**, v. 55, n. 4, p. 800-813, 1969.

BOULIANNE, B.; EVANS, R.C.; SMITH, T.G. Phylogenetic analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. **J. Parasitol.**, v. 93, n. 6, p. 1435-1441, 2007.

DESSER, S.S., HONG, H., MARTIN, D.S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbiana* N. Comb., an apicomplexan parasite of the Bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. **J. Parasitol.**, v. 81, p. 212-222, 1995.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

HARRIS, D.J.; MAIA, J.P.M.C.; PERERA, A. Molecular Characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. **J. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 106-10, 2011.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 265-271, 2002.

BARTA, J. R. Suborder Adeleorina Léger, 1911. In: Lee, J.J., Leedale, G.F.; Bradbury, P. **An Illustrated Guide to the Protozoa**. Kansas: Lawrence, 2000. p. 305-318.

¹Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023: Informação e documentação-Referências-Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. **Serious sources of the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; MUHINICKEL, C.J.; IRWIN, P.J. Two Species of Canine *Babesia* in Australia: Detection and Characterization by PCR. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 409-12, 2003.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. **Bioinformatics**, v. 17, p. 1244-1245, 2001.

MAIA, J.P.M.C.; HARRIS, D.J.; PERERA, A. Molecular survey of *Hepatozoon* species in lizards from North Africa. **J. Parasitol.**, v. 97, n. 3, p. 513-517, 2011.

MATHEW, J.S.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; EWING, S.A.; MALAYER, J.R.; LATHA, B.R.; PANCIERA, R.J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Adeleina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **J. Parasitol.**, v. 86, n. 2, p.366-372, 2000.

MEDLIN, L.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA- coding regions. **Gene**, v. 71, p. 491-499, 1988.

MIYAMOTO, M.; MELLO, M.L.S. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in erythrocytes of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae), infected with the protozoan, *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae). **Cell Biol. Intern.**, v.31, p. 494-499, 2007.

MOÇO, T.C.; O'DWYER, L.H.; VILELA, F.C.; BARRELLA, T.H.; SILVA, R.J. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1169-1176, 2002.

MOÇO, T.C.; SILVA, R.J.; MADEIRA, N.G.; PADUAN, K.S.; RUBINI, A.S.; LEAL, D.D.M.; O'DWYER, L.H. Morphological, morphometric and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisoma durissa terrifica*. **Parasitol. Res.**, setembro 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com> > Acesso em: 16 set. 2011.

NAVAJAS, M.; LAGNEL, J.; FAUVEL, G.; DE MORAES, G. Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, p. 851-859, 1999.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; SILVA, R.J. Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). **Parasitol. Res.**, v. 92, n. 2, p. 110-112, 2004a.

O'DWYER, L.H.; SANTOS, M.M.; SILVA, R.J. Análise morfométrica de cinco tipos de *Hepatozoon* sp. (Sporozoa, Hepatozoidade) parasitando um exemplar de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., 2004, Ouro Preto. **Anais...**Ouro Preto: Minas Gerais, p. 246, 2004b.

O'DWYER, L.H.; SILVA, R.J.; MADEIRA, N.G. Description of gamontogonic and sporogonic stages of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Caudisona durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitol. Res.**, v. 108, p. 845-851, 2011.

PERKINS, S.L.; KELLER, A.K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotídeos. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 870-876, 2001.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras II: Hemogregarinas de algumas espécies de serpentes das famílias colubridae e boidae. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 1, p. 49-56, 1967a.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. III: Novas observações sobre hemogregarinas de serpentes das famílias colubridae e crotalidae. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 2, p. 159-164, 1967b.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras IV: Hemogregarinas da *Dryadophis bifossatus bifossatus*. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 27, n. 3, p. 333-335, 1967c.

PESSOA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. VI. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 28, n. 1, p. 71-76, 1968.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras - VII. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 29, n. 3, p. 351-354, 1969.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P. Esporulação no *Culex dolosus* (L. Arribáizaga, 1891), do *Hepatozoon roulei* (Phisalix & Laveran, 1913), parasita da *Bothrops alternatus* (D. & B., 1854), transfundido com o sangue na *Bothrops moojeni* Hoge, 1965. **Mem. Inst. Butantan**, v. 36, p. 241-245, 1972.

PESSOA, S.B., DE BIASI, P. Considerações taxomômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. **Mem. Inst. Butantan**, v. 37, p. 291-298, 1973a.

PESSOA, S.B., DE BIASI, P. Nota taxomômica sobre cistos esporogônicos de algumas espécies de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. **Mem. Inst. Butantan**, v. 37, p. 299-307, 1973b.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P. Nota sobre a formação de cistos esporogônicos de *Hepatozoon* sp., parasita da *Leimadophis poecilogyrus* (Wied.), (Serpentes: Colubridae) em sanguessuga experimentalmente infectada. **Rev. Pat. Trop.**, v. 3, n. 2, p. 221-224, 1974.

PESSOA, S.B.; BELLUOMINI, H.E.; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIV – Esporogonia da hemogregarina da *Bothrops moojeni* Hoge, 1965 no *Culex* (*Culex*) *dolosus* (L. Arribálzaga, 1891). **Arq. Inst. Biol.**, v. 38, n. 4, p. 253-258, 1971a.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J.; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XII – hemogregarinas de serpentes do gênero *Corallus*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 37, n. 3, p. 205-211, 1970a.

PESSOA, S.B.; CAVALHEIRO, J.; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIII – Evolução esporogônica da Hemogregarina da *Thamnodynastes strigatus* (Colubridae). **Arq. Inst. Biol.**, v. 37, n. 3, p. 213-217, 1970b.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P.; PUORTO, G. Nota sobre a prevalência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. **Mem. Inst. Butantan**, v. 38, p. 68-118, 1974a.

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P.; PUORTO, G. Transferência do *Hepatozoon tupinambis* parasita do lagarto *Tupinambis teguixin*, para a serpente cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) por intermédio de mosquito *Culex fatigans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 72, p. 295-299, 1974b.

PESSOA, S.B.; SACCHETTA, L.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras X- Hemogregarinas da *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v. 12, p. 197-200, 1970c.

PESSOA, S.B.; SACCHETTA, L.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XV. Sobre uma nova espécie do gênero *Haemogregarina* (S.S.) parasita de *Thamnodynastes pallidus nattereri* (Thumberg) e sua evolução em mosquitos. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v. 13, p. 29-32, 1971b.

PHISALIX, M. Les hémogrégarines de *Crotalus terrificus* Lau. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 24, p.190-194, 1931.

SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **J. Parasitol.**, v. 82, n.4, p. 565-585, 1996.

SMITH, T.G.; KIM, B.; DESSER, S.S. Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 293-304, 1999.

TELFORD, S.R.; BUTLER, J.F.; TELFORD, R.S. *Hepatozoon polytopis* n. sp. parasitic in two genera and species of Colubrid snakes in Southern Florida. **J. Parasitol.**, v. 91, p. 144-147, 2005.

TELFORD, S.R.; ERNST, J.A.; CLARCK, A.M.; BUTLER, J.F. *Hepatozoon sauritus*: A polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome analysis. **J. Parasitol.**, v. 90, n. 2, p. 352-358, 2004.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Acids. Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) from Tropical Australia. **J. Parasitol.**, v. 90, p. 670-672, 2004.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in INNIS, M. A.; GELFAND, D.H. SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds **PCR protocols a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990, p. 315-322.

WOSNIAK, E.J.; MCLAUGHLIN, G.L.; TELFORD, S.R. Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert Sidewinders (*Crotalus cerastes cerastes*). **J. Zoo.Wild. Med.**, v. 25, n. 1, p. 103-110, 1994a.

WOSNIAK, E.J.; TELFORD, S.R.; MCLAUGHLIN, G.L. Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine. **J. Zoo.Wild. Med.**, v. 23, n. 4, p. 538-547, 1994b.



Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

O estudo realizado com *Hepatozoon* spp. de serpentes brasileiras, a partir da metodologia empregada, nos permitiu concluir que:

- 1- Dentre os sete pares de oligonucleotídeos testados, apenas HepF300/Hep900 e HEMO1/HEMO2 foram eficientes na amplificação de fragmentos esperados e na caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. das serpentes em questão.

- 2- Somente pela associação dos fragmentos gerados pelos pares oligonucleotídeos HepF300/Hep900 e HEMO1/HEMO2, em somatório com as análises morfológicas e morfométricas, pudemos sugerir que estamos trabalhando com três espécies de *Hepatozoon*.

- 3- As três espécies sugeridas provocam alterações nos eritrócitos