

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

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

Tatiana Cristina Moço

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada.

**Botucatu - SP
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

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

**Mestranda: Tatiana Cristina Moço
Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada.

**Botucatu - SP
2008**



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

*“Se vi mais longe, foi porque apoiei-me em ombros de gigantes...”
(Newton)*

Agradecimentos

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

À FAPESP, FUNDAF e à CAPES, pelo apoio financeiro...

Ao professor Reinaldo, pela parceria, amizade e paciência...

Aos professores Newton, Paulo e Teresa Cristina, por cederem seus respectivos laboratórios para que esse trabalho pudesse ser concluído...

À professora Luciene, pela paciência e ajuda nas análises estatísticas...

À Karis e Adriano (Barnabé), pelos risos, amizade e imprescindível ajuda com a genética molecular...

Aos amigos do Departamento de Parasitologia, em especial, Valdir, Márcia, Bicho, Saete, Nilza, Bruna, Aruaque, Giãne, Betina, Jú, Karina, Zica, Denise e Satie, pela ajuda, amizade e muita diversão...

Ao CEVAP, onde tudo começou, e aos amigos que lá conquistei, em especial, Mixa, Tidei, Thomaz, Bráz, Rui, Ana Silvia, Paulinho, Melissa, André, Fabiana, César, Lú, Marli, Rolão, Corvo, Guima e Meso, pelos anos de convivência, parceria, cumplicidade, amizade, carinho e muitas risadas...

Ao casal Benedito e Silvia Barraviera, pela parceria e amizade...

Aos amigos próximos, em especial, Coruja, Vaca, Rita, Vivi, Nice e Bucha, pelas risadas, amizade e paciência...

Aos amigos distantes, mas não menos queridos, Luciana, Aninha, Marco, Ana Rita, Sagüi, Chris, Xixa, Fabrício, Bié, Éder, Polato, Mê, Neto, Everaldo, Gule e Léo, por continuarem a fazer parte da minha vida...

Aos amigos da XXXIV, em especial ao "Grupo 6", Xarlene, Pimpo, Koala e Macuco...

À minha família, pelo apoio e paciência...

Aos meus cães, em especial ao Bico, pelo amor incondicional...

Ao Gordo, por me "acolher" em tantos momentos e ter me poupado das naturais crises de estresse...



Sumário

Sumário

Introdução Geral	1
Ciclo de vida de <i>Hepatozoon</i> spp. em serpentes.....	2
Vetores e hospedeiros intermediários de <i>Hepatozoon</i> spp.....	2
Sintomatologia da infecção por <i>Hepatozoon</i> spp.....	3
Critérios taxonômicos para identificação de <i>Hepatozoon</i> spp.....	3
Frequência de <i>Hepatozoon</i> spp. em serpentes.....	4
Descrição de espécies de <i>Hepatozoon</i> spp. em algumas serpentes brasileiras.....	5
Caracterização molecular de <i>Hepatozoon</i> spp. em serpentes.....	7
Considerações finais.....	9
Referências Bibliográficas.....	10
Artigo 1: Frequência de infecção por <i>Hepatozoon</i> spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes brasileiras recém capturadas.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	21
Discussão.....	25
Referências Bibliográficas.....	27
Artigo 2: Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de <i>Hepatozoon</i> spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Serpentes, Viperidae) naturalmente infectadas.....	28
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	34
Resultados.....	39
Discussão.....	56
Referências Bibliográficas.....	61
Conclusões gerais	67



Introdução Geral

Introdução Geral

O termo hemogregarina é usado para descrever coletivamente parasitas sangüíneos pertencentes às subordens Adeleina e Eimeriina do Filo Apicomplexa (Levine et al., 1980). Os principais gêneros deste grupo são *Hepatozoon* (Hepatozoidae) e *Haemogregarina* (Hemogregarinidae).

As hemogregarinas são os mais comuns protozoários hemoparasitas de répteis (Wosniak et al., 1994). A subordem Eimeriina inclui os gêneros *Skellackia* e *Lainsonia*, que parasitam répteis, e *Lankesterella*, parasitas de anfíbios. Em Eimeriina, tanto a esporogonia como a merogonia ocorrem no hospedeiro vertebrado e o hospedeiro invertebrado atua apenas como vetor mecânico para a transmissão dos parasitas. Por outro lado, na subordem Adeleina, do qual fazem parte os gêneros *Hepatozoon*, *Haemogregarina* e *Karyolysus*, a esporogonia ocorre no vetor e a merogonia no hospedeiro vertebrado (Lane & Mader, 1996).

Historicamente, parasitas sangüíneos de anfíbios, serpentes, lagartos, crocodilianos, aves e mamíferos foram incluídos no gênero *Haemogregarina*, como resultado da similaridade morfológica de gamontes entre hemogregarinas de diferentes gêneros (Smith, 1996). Espécies de *Haemogregarina* não podem ser distinguidas de *Hepatozoon* spp. tendo como base somente a aparência de seus gamontes intraeritrocíticos e merontes hepáticos. A identificação genérica é também dependente da natureza do desenvolvimento esporogônico no vetor (Desser et al., 1995).

Em *Hepatozoon* spp. a esquizogonia ocorre somente nos tecidos do hospedeiro vertebrado, enquanto que em *Haemogregarina*, além de ocorrer nos tecidos, a esquizogonia 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 o gênero *Haemogregarina*, 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).

Após vários estudos, os espécimes de hemogregarinas, encontrados em serpentes, foram identificados como pertencentes ao gênero *Hepatozoon*, com exceção da *Haemogregarina pallida*, de *Thamnodynastes pallidus nattereri*, que apesar de apresentar esporozoítas contidos em esporocistos, o que não era admitido para o gênero *Haemogregarina* (Mackerras, 1961; Ball, 1967), apresenta desenvolvimento esquizogônico tanto nos tecidos quanto no sangue periférico da serpente (Pessoa et al., 1971b).

Ciclo de vida

As hemogregarinas da subordem Adeleina têm ciclo heteroxênico, envolvendo um estágio merogônico (fase assexuada) no hospedeiro vertebrado e outro gametogônico e esporogônico (fase sexuada) no vetor invertebrado (Wosniak et al., 1994). 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 e posterior fecundação, originando um zigoto, que tem rápido crescimento, formando um oocisto, contendo muitos esporocistos com esporozoítas, que permanecem na hemocele do vetor. O hospedeiro vertebrado, no caso de *Hepatozoon* spp., adquire a infecção pela ingestão direta do vetor portador do oocisto, ou indiretamente, através da ingestão de outros hospedeiros intermediários vertebrados, como peixes e anfíbios, 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. Após a ingestão do hospedeiro intermediário ou do esporocisto do vetor hematófago, ocorre a formação de esquizontes nos tecidos da serpente e posterior liberação de merozoítas na circulação, os quais, após invadirem as células sangüíneas, formam os gamontes infectivos para os vetores hematófagos (Smith, 1996).

Vetores e hospedeiros intermediários de *Hepatozoon* spp.

Os principais vetores invertebrados de *Hepatozoon* spp. são mosquitos (Culicidae), moscas (Diptera), mosquito-palha (Phlebotominae), moscas tse-tse (Muscidae), triatomíneos (Hemíptera), piolhos (Anoplura), pulgas (Siphonaptera), carrapatos (Ixodidae e Argasidae) e ácaros (Acari) (Smith, 1996). Há relatos não confirmados de sanguessugas atuando como vetores destes parasitas (Pessoa & Cavalheiro, 1969 a,b; Smith, 1996).

Espécies do gênero *Hepatozoon* podem ser encontradas parasitando aves, mamíferos, anfíbios e répteis, dentre os últimos, 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).

Até 1996 eram conhecidas 121 espécies de *Hepatozoon* parasitas de serpentes, 46 espécies parasitas de mamíferos e 42 de anfíbios (Smith, 1996). Após 1996, pelo menos mais 12 novas espécies de *Hepatozoon* foram descritas infectando serpentes (Telford Jr et al., 2001, 2002, 2005 a,b, Sloboda et al., 2007).

Sintomatologia da infecção por *Hepatozoon* spp.

Hepatozoon spp. de répteis são, aparentemente, bem adaptados, causando pouca ou nenhuma patologia nos seus hospedeiros naturais. Em um hospedeiro não natural, as infecções podem causar doenças inflamatórias clinicamente significativas, entre elas, hepatite necrotizante, pancreatite e esplenite (Pessoa et al., 1974; Wosniak & Telford Jr, 1991). Merontes também foram encontrados no cérebro de um exemplar de *Crotalus durissus terrificus* que apresentou problemas neurológicos em cativeiro (Wosniak et al., 1996). Campbell (1996) também relatou que em infecções com alta parasitemia pode-se observar um quadro de anemia hemolítica. Madsen et al. (2005) relataram que o parasitismo por *Hepatozoon* sp. provocou uma significativa redução no crescimento de *Liasis fuscus* na natureza. Além disso, os autores observaram que 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.

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 Giemsa (Campbell, 1996; Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2003a,b). Atualmente, diagnósticos mais modernos incluem a avaliação do sangue pela técnica de PCR (Wosniak et al., 1994).

Miyamoto & Mello (2007) estudaram a relação entre a infecção por *Hepatozoon* spp. e a incidência da fragmentação do DNA e consequente 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 em *C. durissus terrificus*, afetando não somente as células parasitadas, como também células normais.

Critério taxonômico para identificação de *Hepatozoon* spp.

O critério taxonômico para identificação de *Hepatozoon* spp. tem sido baseado principalmente na caracterização morfológica dos gamontes no sangue do hospedeiro vertebrado e dos estágios esporogônicos no hospedeiro invertebrado. Contudo, o fato da indiscutível semelhança entre os oocistos e entre os gamontes de diversas espécies de

Hepatozoon torna falha a identificação baseada somente nessas características (Pessoa & De Biasi, 1973 a,b; O'Dwyer et al., 2002 a,b).

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. Porém, outras variáveis como medidas de área do parasita e do seu núcleo têm sido utilizadas, assim como, metodologias empregando técnicas moleculares (Telford Jr et al., 2004, Rubini et al., 2005b) e sistemas computacionais de análise de imagens para a biometria dos parasitas (Silva et al., 1999 a,b; Moço et al., 2002).

Contudo, para todos esses aspectos, encontramos na literatura dados conflitantes, devido, geralmente, à discrepância entre as técnicas antigas e recentes utilizadas em tais pesquisas. 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).

Prevalência de *Hepatozoon* spp. em serpentes

Até pouco tempo, eram raros os estudos sobre prevalência e caracterização de espécies de *Hepatozoon* em serpentes brasileiras. Em um destes estudos, foi relatada prevalência de 62% para *Boa constrictor*, 24% para *Bothrops jararaca* e 11% para *C. durissus terrificus* (Pessoa et al., 1974). Contudo, não há informação se esses animais foram recém capturados da natureza ou se já estavam em cativeiro por algum período de tempo. É válido notar que as prevalências em animais em condições de cativeiro podem não corresponder às prevalências em condições naturais.

O'Dwyer et al. (2003a), pesquisando somente animais recém capturados, relataram prevalência de 16,4% de infecção para *Hepatozoon* spp., com positividade de 38,9% para *Boa constrictor amarali*, 35,3% para *Bothrops jararaca* e 19,4% para *C. durissus terrificus*.

Moço et al. (2007), em um estudo realizado com 906 serpentes recém capturadas e doadas ao CEVAP – Centro de Estudos e Venenos de Animais Peçonhentos – UNESP, Botucatu, São Paulo; pertencentes a 33 espécies procedentes de 46 municípios do Estado de São Paulo, um município do Estado do Mato Grosso e outro do Estado do Paraná, relataram a infecção por *Hepatozoon* spp. em 125 (13,8%) serpentes. As prevalências da infecção em serpentes peçonhentas e não peçonhentas foram 15,1% e 8,7%, respectivamente. As espécies

com taxa de infecção mais significativas foram 21,8% em *B. jararaca*, 19,1% em *B. constrictor amarali* e 15,8% em *C. durissus*. Os municípios onde ocorreram maiores taxas de infecção foram Conchas, Itatinga e Pardinho com, respectivamente, 47,6%, 26,7% e 17,1% de positividade para *Hepatozoon* spp.

Descrição de *Hepatozoon* spp. parasitas de serpentes brasileiras

A descrição da maior parte das espécies de *Hepatozoon* de serpentes foi baseada apenas em características morfológicas de gamontes e formas esporogônicas, o que sugere dados subestimados para esses parasitas (Tabela 1). Por outro lado, várias descrições tiveram como base somente a espécie do hospedeiro e uma mesma espécie de *Hepatozoon* pode ter recebido vários nomes, de acordo com a espécie de serpente.

Além das espécies já descritas para *C. durissus terrificus*, *Hepatozoon romani* e *Hepatozoon capsulata* (Phisalix, 1931a), foram diagnosticados, na mesma espécie de serpente, gamontes que diferiam destes e que poderão, futuramente, ser caracterizados como novas espécies (Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2003b).

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. As dimensões desses gamontes foram $33,2 \pm 4,1 \mu\text{m}^2$ de área, $14,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de largura. O'Dwyer et al. (2003b) descreveram uma pequena espécie de *Hepatozoon*, encontrada em outro exemplar de *C. durissus terrificus*, cujos gamontes eram menores dos que os usuais e apresentavam citoplasma claro, sem granulações e núcleo grande ocupando boa parte do citoplasma. Suas dimensões foram $24,6 \pm 3,0 \mu\text{m}^2$ de área, $8,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de comprimento e $3,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de largura. A parasitemia observada foi extremamente elevada (56,6%), o que também é incomum, e os parasitas alteravam acentuadamente as hemácias infectadas. Além destas formas observadas, têm sido examinadas no Departamento de Parasitologia, IBB, exemplares de *C. durissus terrificus* infectadas com vários outros tipos de gamontes de *Hepatozoon* spp., demonstrando que o número de espécies desse gênero infectando essa espécie de serpente pode ser muito maior do que o já descrito na literatura (O'Dwyer et al., 2002 a,b, 2004).

Tabela 1. Espécies de *Hepatozoon* descritas e/ou relatadas em serpentes brasileiras.

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

É necessária a completa descrição destas espécies, incluindo a análise morfométrica dos gamontes, estágios esporogônicos e caracterização molecular para podermos responder quais são e quantas são as espécies de *Hepatozoon* que infectam serpentes brasileiras.

Caracterização molecular de *Hepatozoon* spp.

Os primeiros estudos realizados para caracterizar geneticamente espécies de *Hepatozoon* foram conduzidos por Wozniak et al. (1994). Os autores conseguiram amplificar o rDNA de cinco diferentes isolados de *Hepatozoon* de serpentes. A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) demonstrou padrões específicos de bandas, obtidas de diferentes hospedeiros, demonstrando que estas espécies podem ser molecularmente diferenciadas pela seqüência do locus rDNA. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenvolvidos a partir da seqüência específica para o locus de DNA ribossomal de hemoparasitos do filo Apicomplexa, identificados a partir da seqüência de rDNA dos genes estruturais 18S de *Plasmodium* e *Babesia*. Esses oligonucleotídeos foram: 18AP853.F e 18AP1488.R.

Smith et al. (1999) também conduziram estudos para caracterizar espécies de *Hepatozoon* de serpentes, utilizando sangue total, a partir do qual foram extraídas as amostras de DNA. Foi realizada amplificação da região ITS-1 utilizando oligonucleotídeo com o sítio de ligação do final 3' do gene 18S rDNA (5'-CGTAGGTGAACCTGCAGAAGG-3') e um oligonucleotídeo reverso com sítio de ligação do final 5' do gene 5.8S rDNA (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3').

Perkins & Martin (1999) avaliaram que os oligonucleotídeos desenvolvidos por Wozniak et al. (1994) não são específicos para hemogregarinas e amplificam também os genes SSU rRNA dos hospedeiros vertebrados, quando o DNA é extraído do sangue. Assim, Perkins & 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 seqüenciaram o gene 18S rRNA de *Hepatozoon americanum* e *Hepatozoon canis*, que infectam cães, e *Hepatozoon catesbiana*, de anfíbios, utilizando os mesmos oligonucleotídeos utilizados por Wozniak et al. (1994), entretanto, eles 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 seqüência parcial do gene 18S rRNA 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 seqüências idênticas e foram intimamente relacionadas com *H. canis* de Israel, com 99% (617/625) de identidade. Tanto *H. americanum* quanto *H. catesbiana* estavam relacionados distantemente com a amostra japonesa, com 94% (586/625) e 91% (566/625) de identidade, respectivamente. Os autores concluíram que a amostra de *Hepatozoon* encontrada no Japão deve ser uma variação da cepa de *H. canis*. A seqüência do gene 18S rRNA do *Hepatozoon* sp. do Japão foi depositada no Genbank sob o número AF418558.

Ujvari et al. (2004) utilizaram técnicas moleculares para diagnosticar a infecção por *Hepatozoon* sp. em *L. fuscus* encontrando altas taxas. Contudo, os autores não nomearam a espécie de *Hepatozoon* encontrada, pois observaram a mesma seqüência 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. Estes estudos demonstram a necessidade de se realizar estudos detalhados, biológicos e moleculares, para uma correta identificação das espécies de *Hepatozoon* que ocorrem em serpentes.

Telford Jr et al. (2004) compararam isolados de DNA de hemogregarinas, morfologicamente 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 morfologicamente distintos, também do Nordeste da Flórida. O alinhamento da seqüência de nucleotídeos de 530 pb do gene 18S rRNA revelou dois halotipos 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*. Entretanto, *H. sauritus* é tido como uma espécie politópica em contraste com outras oito espécies de *Hepatozoon* descritas em serpentes da Flórida, as quais parecem parasitar apenas uma espécie hospedeira.

No Brasil, Rubini et al. (2005a) caracterizaram geneticamente a espécie de *Hepatozoon* que acomete cães utilizando os oligonucleotídeos HepF e HepR desenhados por Inokuma et al. (2002) e os mesmos oligonucleotídeos foram utilizados para caracterizar a espécie de *Hepatozoon* encontrada em gatos (Rubini et al., 2006).

Recentemente, Rubini et al. (2005b) realizaram a primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. de serpentes, no caso, *Hydrodynastes gigas*, na América Latina. O DNA do

sangue da serpente foi extraído com kit “Nucleo Spin Blood mini kit”, segundo a recomendação do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados foram HepF e HepR. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose e foi, posteriormente, seqüenciado em ambas as direções, utilizando o “ABI Prism® BigDye^M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A PCR foi eficiente em detectar *Hepatozoon* sp. do sangue de *H. gigas* com amplificação de produto de 625 bp. O seqüenciamento indicou que é possível que se trate 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.

Criado-Fornelio et al. (2007) desenvolveram um ensaio de PCR quantitativo (qPCR) para o diagnóstico de *Hepatozoon* spp. em mamíferos carnívoros com reagente “SYBR Green I[®]”. O método consiste na amplificação de um fragmento de 235 pb do gene 18S rRNA, com capacidade de detectar menos de 0,1 fg de DNA parasitário. O qPCR foi testado em cães e gatos e, comparando-o ao PCR padrão, mostrou-se 15,8% mais sensível na detecção de *H. canis* (espécie identificada através de seqüenciamento). Futuramente, esse ensaio poderá ser testado para *Hepatozoon* spp. de serpentes.

Considerações finais

Estudos morfométricos, associados a estudos das diferentes fases do ciclo de vida do parasita, tanto no vetor invertebrado como no hospedeiro intermediário, e às recentes técnicas moleculares, podem contribuir sobremaneira para uma caracterização mais apurada das diferentes espécies do gênero *Hepatozoon* de serpentes, e procurar 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 falta de descrição destas espécies e a importância de tal infecção na ecologia e na manutenção de serpentes em cativeiro (Wosniak & Telford Jr, 1991; Mader, 1996; Madsen, 2005), justificam o estudo e caracterização destes protozoários

Assim, trabalhos acerca dessa temática são de fundamental importância para o conhecimento deste subestimado grupo de parasitas.

Referências Bibliográficas¹

- ARANTES, J.B. Estudos parasitológicos. II. *Haemogregarina butantanensis*, sp.n., parasita da boipeva, *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. Some Blood Sporozoans from East African Reptiles. **J. Protozool.**, v. 14, n. 2, p. 198-210, 1967.
- BALL, H.G.; CHAO, J.; TELFORD JR, 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.
- 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.
- CAMPBELL, T.W. Hemoparasites. In: Mader DR. **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.
- CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; CUNHA-FILHO, N.A.; RUAS, J. L.; FARIAS, N.A.R.; REY-VALEIRON, C.; PINGRET, J.L.; ETIEVANT, M.; BARBA-CARRETERO, J.C. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. **Vet. Parasitol.**, v.150, p.352-356, 2007.
- 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.
- DESSER, S.S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: J.P. Kreier (ed.). **Parasitic protozoa**, New york : Academic Press, 1993. p. 247-272.

Referências 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.

- 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 catesbiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algoquin Park, Ontario. **J. Parasitol.**, v.81, n.2, p. 212-222, 1995.
- 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.
- LANE, T.J.; MADER, DR. Parasitology. In: Mader DR. **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.
- LUTZ, A. Ueber die Drepanidien der Schlangen. Ein Beitrag zur Kenntnis der Hämosporidien. **Zbl. Bakt., Orig.**, v. 29, p 390-397, 1901.
- MACKERRAS, M.J. The Hematozoa of Australian reptiles. **Aust. J. Zool.**, v. 9, p. 61-122, 1961.
- 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.
- 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.
- 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.; BARRELLA, T.H.; TROMBETA, A.M.; CAMPAGNER, M.; GARZZESI, B.; TITTON JR, B.; LEAL, D.D. M. Prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes brasileiras recém capturadas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 31., CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO LATINO AMERICANA DE PARQUES ZOOLOGICOS E AQUÁRIOS, 14., ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 16., 2007, São Paulo. **Anais...**São Paulo: São Paulo, 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.

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, 2004.

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, 2003a.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; MADEIRA, N.G.; SILVA, R.J. *Hepatozoon* sp. from *Crotalus durissus terrificus*: Preliminary studies on the morphology of the gamonts and oocysts. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2002a.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; MADEIRA, N.G.; SILVA, R.J. *Hepatozoon terzii* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Boa constrictor amarali*: Description of the gamonts and preliminary studies on the sporogonic cycle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2002b.

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, 2003b.

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 oligonucleotídeos fail in the diagnosis of parasitic infection. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 982-984, 1999.

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

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, 1967b.

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, 1967c.

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, 1967d.

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, 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. VIII – Sobre a evolução da “*Haemogregarina miliaris*” na sanguessuga ”*Haementeria lutzii*”. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 29, n. 4, p. 451-458, 1969a.

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, 1969b.

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

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.; 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. 69-118, 1974.

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.

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.

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

PHISALIX, M. *Haemogregarina cenchridis*, nov. sp. parasite d'un serpent Boïdé, *Epicrates cenchris* Lin., **Bull. Soc. Path. Exot.**, v. 24, p. 187-190, 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.; CAVALCANTE, G.G.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 91-93, 2005a .

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; PEREZ, R.R.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 168-171, 2006.

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, 2005b.

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.

SCHOUTEN, G.B. *Haemogregarina migonei* n. sp. Hematozoario de un ofidio, *Cyclagras gigas*. D. B. **Rev. Soc. Cient. Paraguay**. p. 145-147, 1934.

SILVA, R.J.; TAKAHIRA, R.K.; CHERUBINI, A.L.; BIANCHI, E.H.; BARRELLA, T.H.; MARTINS, G.T.B.; FERREIRA JÚNIOR, R.S.; CORDEIRO, A.V.; LOPES, C.A.M. Análise morfométrica de uma hemogregarina encontrada em *Boa constrictor amarali* (Stull, 1932) (Serpentes, Boidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CONSERVAÇÃO E MANEJO DA BIODIVERSIDADE, 1., 1999, Ribeirão Preto. **Anais...**Ribeirão Preto: São Paulo, 1999a, p. 29-30.

SILVA, R.J.; TAKAHIRA, R.K.; CORDEIRO, A.V.; CHERUBINI, A.L.; BIANCHI, E.H.; LOPES, C.A.M. Análise comparativa de duas hemogregarinas de serpentes. In: MOSTRA CIENTÍFICA DA FMVZ, UNESP, 3., 1999, Botucatu. **Anais...**Botucatu: São Paulo, 1999b. p. 82-83.

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 JR, 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 JR, 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 JR, 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 JR, 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.

TELFORD JR, 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.

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.

WOSNIAK, E.J.; TELFORD JR, S.R. The fate of possible two *Hepatozoon* species naturally infecting Florida black racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors: histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. **J. Parasitol.**, v. 21, p. 511-516, 1991.

WOSNIAK, E.J.; TELFORD JR, 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.Wildl. Med.**, v. 23, n. 4, p. 538-547, 1994.

WOZNIAK, E.J.; KAZACOS, K.R.; TELFORD JR, S.R.; MCLAUGHLIN, 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.



Artigo 1: Prevalência da infecção por Hepatozoon spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes brasileiras recém capturadas

Prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes brasileiras recém capturadas

Tatiana Cristina Moço^{1,3}, Reinaldo José da Silva², Thomaz Henrique Barrella^{1,3}, André Mesquita Trombeta¹, Michelle Vanessa Campagner³, Bruno Garzzesi³, Braz Tilton Júnior³, Denise Dutra Menezes Leal¹, Lucia Helena O’Dwyer de Oliveira².

¹Mestrandos do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr.,18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. Email: tati13moco@hotmail.com

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr.,18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Centro de Estudos e Venenos de Animais Peçonhentos – CEVAP, Universidade Estadual Paulista, Campus da Fazenda Lageado, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Hepatozoon spp. são os mais comuns protozoários intracelulares encontrados em serpentes. Tendo em vista a falta considerável de estudos sobre esses parasitas e a importância dessa infecção na ecologia e na manutenção de serpentes em cativeiro, o objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência da infecção por *Hepatozoon* spp. em serpentes da região de Botucatu, São Paulo. Foram investigadas 906 serpentes recém capturadas e doadas ao CEVAP – UNESP, Botucatu, São Paulo. Destas, 722 (79,7%) eram peçonhentas e 184 (20,3%) não peçonhentas. As espécies peçonhentas mais representativas foram *Crotalus durissus* (n=556), *Bothrops jararaca* (n=87) e *Bothrops pauloensis* (= *Bothrops neuwiedii pauloensis*) (n=47) e as não peçonhentas foram *Oxyrhopus guibei* (n=49), *Boa constrictor amarali* (n=42) e *Waglerophis merremi* (n=16). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados com sangue obtido da veia caudal. A infecção por *Hepatozoon* spp. foi detectada em 125 (13,8%) serpentes. As prevalências da infecção em serpentes peçonhentas e não peçonhentas foram 15,1% e 8,7%, respectivamente. As espécies com taxas de infecção mais significativas foram 21,8% em *B. jararaca*, 19,1% em *B. constrictor amarali* e 15,8% em *C. durissus*. Os municípios onde ocorreram maiores taxas de infecção foram Conchas, Itatinga e Pardinho com, respectivamente, 47,6%, 26,7% e 17,1% de positividade para *Hepatozoon* spp.

Palavras- chave: *Hepatozoon*, serpentes, prevalência.

Abstract

Hepatozoon spp. are the most common intracellular protozoa found in snakes. As studies on these parasites are very scarce and the importance of this infection in the ecology and maintenance of snakes in captivity, the aim of this study was to determine the prevalence of *Hepatozoon* spp. infection in snakes from the Botucatu region of São Paulo State, Brazil. We investigated 906 recently captured snakes donated to CEVAP – UNESP, Botucatu, São Paulo. Of these, 722 (79.7%) were venomous and 184 (20.3%) non-venomous. The more common venomous species were *Crotalus durissus* (n=556), *Bothrops jararaca* (n=87), and *Bothrops pauloensis* (= *Bothrops neuwiedii pauloensis*) (n=47), and non-venomous were *Oxyrhopus guibei* (n=49), *Boa constrictor amarali* (n=42), and *Waglerophis merremi* (n=16). Blood smears were made using caudal vein blood samples. *Hepatozoon* spp. infection was detected in 125 (13.8%) snakes. Infection prevalencies were 15.1% and 8.7% in venomous and non-venomous snakes, respectively. The highest infection rates were 21.8% in *B. jararaca*, 19.1% in *B. constrictor amarali*, and 15.8% in *C. durissus*. The places where the highest infection rates for *Hepatozoon* spp. were 47.6%, 26.7%, and 17.1% in Conchas, Itatinga, and Pardinho, respectively.

Keywords: *Hepatozoon*, snakes, frequency.

Introdução

Hepatozoon spp. (Hepatozoidae) são os mais comuns protozoários intracelulares encontrados em serpentes (Telford Jr, 1984). Esses hemoparasitas são, aparentemente, bem adaptados, causando pouca ou nenhuma patologia a seus hospedeiros naturais (Telford Jr, 1984). Entretanto, a manutenção desses répteis em cativeiro pode proporcionar ótimas condições para a transmissão desses parasitas (Hull & Camin, 1960). Nos sistemas de cativeiro semi-extensivo, um grande número de serpentes mantido junto pode proporcionar uma proliferação de artrópodes vetores em potencial. Em hospedeiros não naturais, essa infecção tem potencial de causar doenças inflamatórias significantes (Wozniak & Telford Jr, 1991). Mader (1996) relatou que a infecção pode causar anemia hemolítica quando a parasitemia estiver em níveis elevados e que não há informações de quimioterápicos para *Hepatozoon* spp. Entretanto, em muitas serpentes mantidas em cativeiro, a parasitemia tende a se estabilizar e até mesmo diminuir sensivelmente (Santos et al., 2005).

Até pouco tempo, eram raros os estudos sobre prevalência de *Hepatozoon* spp. de serpentes. Os estudos disponíveis eram das décadas de sessenta e setenta. Hull & Camin (1960) examinaram 600 serpentes mantidas cativas em Zoológicos dos Estados Unidos e encontraram 30,8% de infecção por *Hepatozoon* spp. No Brasil, Pessoa et al. (1974), entretanto, encontraram 17,1% de infecção num total de 2128 serpentes, mas os autores não mencionaram se as serpentes eram recém capturadas ou se já estavam sendo mantidas em cativeiro por algum tempo.

O'Dwyer et al. (2003), pesquisando somente animais recém capturados na região de Botucatu, São Paulo, Brasil, relataram a prevalência de 16,4% de infecção para *Hepatozoon* spp., com positividade de 38,9% para *Boa constrictor amarali*, 35,3% para *Bothrops jararaca* e 19,4% para *Crotalus durissus terrificus*.

O objetivo do presente estudo foi investigar os dados de prevalência de *Hepatozoon* spp. em serpentes brasileiras recém capturadas na região de Botucatu, comparando-os aos do estudo conduzido por O'Dwyer et al. (2003).

Material e Métodos

Animais

O estudo foi realizado com 906 serpentes recém capturadas, entre os períodos de 2002 e 2005, doadas ao CEVAP – Centro de Estudos e Venenos de Animais Peçonhentos – UNESP, Botucatu, São Paulo; Brasil, pertencentes a 33 espécies procedentes de 46 municípios do Estado de São Paulo, um município do Estado do Mato Grosso e outro do Estado do Paraná. A sexagem foi realizada em todos os espécimes, assim como foram anotados os dados de coleta e a procedência das serpentes.

Coleta de sangue

O sangue foi coletado por punção da veia caudal, após contenção mecânica do animal.

Foram coletados, aproximadamente, 0,4ml de sangue, com seringa de insulina. Imediatamente após a coleta, foram 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 Giemsa (10%) por 30 minutos (Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2003). O diagnóstico foi feito através do exame das lâminas em microscópio óptico com aumento de 400x.

O material testemunho encontra-se depositado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo.

Análise Estatística

As comparações entre os dados foram realizadas através do método qui-quadrado (χ^2), utilizando o *software* Epi-Info-6.

Resultados

Num total de 906 serpentes examinadas, 722 (79,7%) eram peçonhentas e 184 (20,3%) não-peçonhentas ($p < 0,05$). Destas, 447 (49,34%) eram fêmeas e 457 (50,44%), machos ($p > 0,05$). Em apenas duas serpentes (0,22%) o sexo não pôde ser determinado.

Dentre os viperídeos, as espécies mais representativas foram *C. durissus* (n = 556), *B. jararaca* (n = 87) e *Bothrops pauloensis* (= *Bothrops neuwiedii pauloensis*) (n = 47), dentre os colubrídeos, *Oxyrhopus guibei* (n = 49) e *Waglerophis merremi* (n = 16).) e dentre os Boídeos, *B. constrictor amarali* (n = 42)

As espécies de serpentes examinadas e seus respectivos diagnósticos foram listados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Diagnóstico da infecção por *Hepatozoon* spp. por esfregaço de sangue periférico em serpentes recém capturadas no Estado de São Paulo/Mato grosso e Paraná.

Família/Espécie	Infectadas	Não Infectadas	Total
Colubrídeos			
<i>Chironius flavolineatus</i>	0	3	3
<i>Chironius quadricarinatus</i>	0	1	1
<i>Chironius</i> sp.	0	2	2
<i>Clelia</i> sp.	0	1	1
<i>Dipsas indica</i>	0	1	1
<i>Helicops</i> sp.	0	1	1
<i>Hydrodynastes gigas</i>	1	0	1
<i>Leptodeira annulata</i>	0	2	2
<i>Liophis almadensis</i>	0	4	4
<i>Liophis</i> sp.	0	2	2
<i>Mastigodryas bifossatus</i>	0	3	3
<i>Oxyrhopus guibeii</i>	1	48	49
<i>Oxyrhopus rhombifer</i>	0	1	1
<i>Phalotris lativittatus</i>	0	1	1
<i>Phalotris mertensi</i>	0	10	10
<i>Philodryas olfersii</i>	0	3	3
<i>Philodryas patagoniensis</i>	0	9	9
<i>Pseudoboa neuwiedii</i>	0	1	1
<i>Rachidelus brazili</i>	0	1	1
<i>Sibynomorphus mikani</i>	0	12	12
<i>Simophis rhinostoma</i>	1	7	8
<i>Spilotes pullatus</i>	1	4	5
<i>Thamnodynastes</i> sp.	1	1	2
<i>Waglerophis merremi</i>	2	14	16
<i>Xenopholis undulatus</i>	0	1	1
Boídeos			
<i>Boa constrictor amarali</i>	8	34	42
<i>Eunectes murinus</i>	1	1	2
Viperídeos			
<i>Bothrops alternatus</i>	1	17	18
<i>Bothrops jararaca</i>	19	67	87
<i>Bothrops moojeni</i>	1	12	13
<i>Bothrops pauloensis</i>	0	47	47
<i>Crotalus durissus</i>	88	468	556
Elapídeos			
<i>Micrurus</i> sp.	0	1	1
Total	125	781	906

A infecção por *Hepatozoon* spp. foi detectada em 125 (13,8%) serpentes. As prevalências da infecção em serpentes machos e fêmeas foram, respectivamente, 14,4% e 13,0% ($\rho > 0,05$). Entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas as prevalências de infecção foram 15,1% e 8,7%, respectivamente ($\rho > 0,05$). As prevalências mais significativas foram 21,8% em *B. jararaca*, 19,1% em *B. c. amarali* e 15,8% em *C. durissus* ($\rho > 0,05$).

As taxas de infecção em Viperidae, Boidae e Colubridae foram, respectivamente, 15,1%, 20,9% e 4,9% ($\rho < 0,05$). A procedência das serpentes foi listada abaixo (Tabela 2) e os municípios em que as serpentes apresentaram maior prevalência de infecção foram Conchas, Itatinga e Pardinho com, respectivamente, 47,6%, 26,7% e 17,1% de positividade para *Hepatozoon* spp. ($\rho < 0,05$).

A análise da taxa de infecção, nas espécies *C. durissus terrificus* e de *B. jararaca*, indicou que a prevalência entre machos e fêmeas foi similar ($\rho > 0,05$). Apesar da prevalência ter, aparentemente, sido maior em fêmeas de *B. constrictor amarali*, não houve diferença estatística entre os sexos ($\rho > 0,05$) (Figura 1).

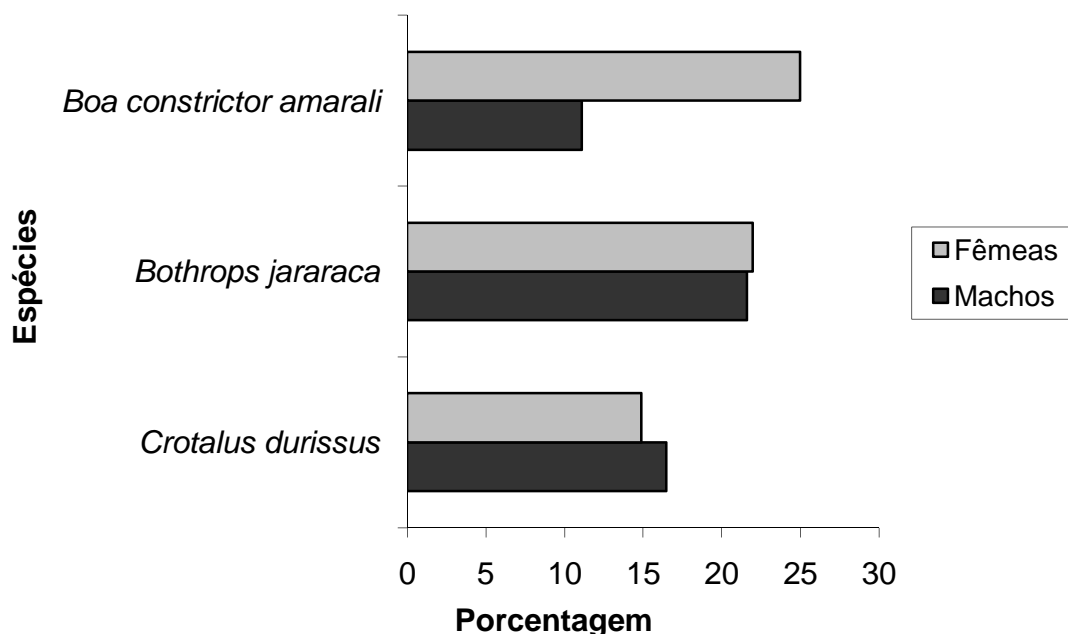


Figura 1. Prevalência da infecção por *Hepatozoon* spp. entre machos e fêmeas de espécies de serpentes naturalmente infectadas no Estado de São Paulo ($\rho > 0,05$).

Tabela 2. Procedência, número de serpentes coletadas e diagnóstico da infecção por *Hepatozoon* spp. em municípios do Estado de São Paulo, Mato Grosso e Paraná..

Município/Estado	Infectadas	Não Infectadas	Número de serpentes coletadas
Águas de Santa Bárbara/SP	0	3	3
Angatuba/SP	0	1	1
Anhembi/SP	4	20	24
Anhumas/SP	1	0	1
Araraquara/SP	0	10	10
Avaré/SP	1	24	25
Bofete/SP	6	49	55
Boituva/SP	0	1	1
Botucatu/SP	29	309	338
Canarana/MT	0	1	1
Cerqueira César/SP	2	41	43
César Neto/SP	1	0	1
Charqueada/SP	0	2	2
Conchas/SP	10	11	21
Dois Córregos/SP	0	3	3
Emilianópolis/SP	1	5	6
Fartura/SP	0	10	10
Iaras/SP	1	5	6
Ibitinga/SP	2	7	9
Itaí/SP	0	1	1
Itapeva/SP	0	4	4
Itaporanga/SP	1	8	9
Itararé/SP	2	3	5
Itatinga/SP	31	85	116
Jaú/SP	0	1	1
Juquiati/SP	0	1	1
Laranjal Paulista/SP	5	30	35
Lençóis Paulista/SP	1	13	14
Lins/SP	1	4	5
Macatuba/SP	0	1	1
Pardinho/SP	12	58	70
Pereiras/SP	1	0	1
Piapara/SP	0	2	2
Piracicaba/SP	2	0	2
Piraju/SP	0	2	2
Pirambóia/SP	1	2	3
Porangaba/SP	1	0	1
Pratânia/SP	0	1	1
Ribeirão Claro/SP	0	1	1
Santa Maria da Serra/SP	5	31	36
São José dos Campos/SP	1	1	2
São Manuel/SP	0	17	17
São Pedro/SP	1	2	3
Sorocaba/SP	0	2	2
Taguaí/SP	0	2	2
Taquarituba/SP	1	2	3
Tejupá/SP	1	4	5
?:PR	0	1	1
Total	125	781	906

SP = Estado de São Paulo, MT = Estado do Mato Grosso, PR = Estado do Paraná

? = Município não identificado pelo coletor

Discussão

Nesse estudo, a prevalência encontrada para infecção por *Hepatozoon* spp. foi de 13,8%. Diferindo das prevalências descritas por Hull & Camim (1960), que detectaram, em zoológicos dos Estados Unidos, uma taxa de infecção de 30,8% em um total de 600 serpentes. Mas são similares às de Pessoa et al. (1974), que encontraram 17,1% de infecção por *Hepatozoon* spp. em um total de 2128 serpentes brasileiras e às de O'Dwyer et al. (2003) que, estudando 238 serpentes, da mesma região do presente estudo, detectaram uma taxa de infecção de 16,4%. A diferença entre as prevalências observadas no Brasil e nos Estados Unidos pode estar relacionada às características climáticas e às condições ecológicas de cada país, bem como à ocorrência e à abundância de diferentes vetores e serpentes hospedeiras. Além disso, os animais de estudo de Hull & Camim (1960) eram mantidos em cativeiro e isto pode ter favorecido o aumento da taxa de infecção.

No estudo de O'Dwyer et al. (2003) foi encontrada uma taxa de infecção por *Hepatozoon* spp. de 20,0% em serpentes peçonhentas e 11,7% em serpentes não peçonhentas. No presente estudo, as taxas de infecção foram de 15,1% e 8,7%, não havendo, entretanto, diferença estatística em relação ao trabalho de O'Dwyer et al. (2003).

Comparando os dados atuais com os de Pessoa et al. (1974), que encontraram infecção de 62,0% para *B. c. amarali*, 24,0% para *B. jararaca*, 11,0% para *C. durissus*, foi observada diferença significativa na infecção para *C. durissus* e para *B. constrictor amarali*, enquanto que a taxa de infecção em *B. jararaca* se manteve estável. Como no estudo de Pessoa et al. (1974) o tempo de captura não foi relatado, a alta taxa de infecção em *B. constrictor amarali* pode estar relacionada ao sistema de manutenção em cativeiro, como um modo de favorecer a transmissão do parasita nessas condições. Considerando-se a possibilidade da existência de transmissão vertical nesses parasitas (De Biasi et al., 1971, 1972) e o fato das espécies em questão serem todas ovovivíparas (Silva, 2000), uma alta taxa de infecção em animais nascidos em cativeiro pode estar relacionada a tais fatores.

Por outro lado, quando se comparam os resultados atuais com os de O'Dwyer et al. (2003), que realizaram o estudo na mesma região e que observaram infecção de 38,9% para *B. constrictor amarali*, 35,3% para *B. jararaca*, 19,4% para *C. durissus terrificus*, não houve diferença estatística. Assim, pudemos observar que, apesar da diferença no número de serpentes examinadas nas duas pesquisas, a prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp. tem se mantido estável. Também foi possível constatar que a infecção por *Hepatozoon* não apresentou padrões distintos na infecção entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

Outro dado interessante foi que, no presente estudo, a taxa de infecção em Colubrídeos foi significativamente menor do que em Boídeos e Viperídeos.

Com relação ao sexo das serpentes, era esperado que não houvesse diferença estatística, já que não há considerável diferença no comportamento alimentar entre machos e fêmeas.

De acordo com a procedência das serpentes infectadas, os municípios em que as serpentes apresentaram as maiores taxas de infecção por *Hepatozoon* spp. foram Conchas (47,6%), Itatinga (26,7%) e Pardinho (17,1%). Dados estes que diferem dos encontrados por O'Dwyer et al. (2003), que apontaram Salto, Anhembi e Botucatu como os municípios com as maiores prevalências de infecção; 75%, 44% e 21%, respectivamente. Neste estudo, o município de Anhembi, também apresentou uma taxa significativa de infecção de 16,6%, apesar da redução se comparada à do estudo anterior, assim como houve uma redução na prevalência da infecção por *Hepatozoon* spp. no município de Botucatu (8,6%). Os dados do município de Salto não puderam ser atualizados, pois, no presente estudo, nenhum exemplar foi procedente dessa localidade.

Estudos sobre a prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp. em serpentes ainda são considerados raros. Apesar de, no Brasil, a infecção não ser estudada em condições naturais, toda informação acerca desse tema é de suma importância para a manutenção e reprodução de serpentes em condição de cativeiro. Futuros estudos, aliados a dados biológicos, morfométricos e moleculares dos parasitas podem contribuir para a quantificação e qualificação deste subestimado grupo de organismos.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- processo nº 2006/55830-4), Fundação do Desenvolvimento Administrativo (FUNDAP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências Bibliográficas¹

- DE BIASI, P.; PESSOA, S.B.; BELLUOMINI, H.E. Nota sobre 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.
- 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.
- MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1996. 512p.
- 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.
- 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.
- PESSOA, S.B.; De BIASI, P.; PUORTO, G. Nota sobre a prevalência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 38, p.69-118, 1974.
- 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.
- SILVA, R.J. **As serpentes**. Jaboticabal: Fundep, 2000. 141p.
- TELFORD JR., 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.
- WOZNIAK, E.J.; TELFORD JR., S.R. The fate of *Hepatozoon* species naturally infecting Florida Back Racers and watersnakes in potencial mosquito and soft tick vectors, and histologic evidence of pathogenicity in unnatural hostspecies. **Int. J. Parasitol.**, v. 21, p. 511-516, 1991.

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.



Artigo 2: Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de Hepatozoon spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) de Crotalus durissus terrificus (Serpentes, Viperidae) naturalmente infectadas

Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) naturalmente infectadas

Tatiana Cristina Moço¹, Reinaldo José da Silva², Newton Goulart Madeira², Karina dos Santos Paduan³, Adriano Stefani Rubini⁴, Betina Metzger⁵, Lucia Helena O’Dwyer de Oliveira².

¹Mestranda do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr.,18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. Email: tati13moco@hotmail.com

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr.,18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Genética, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁴Doutorando do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr.,18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁵Mestranda do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr.,18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Resumo

Os protozoários intracelulares mais frequentemente encontrados em serpentes são membros do gênero *Hepatozoon*. Tendo em vista a variedade de formas parasitando exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e as divergências de dados da literatura, onde são descritas apenas duas espécies, *Hepatozoon romani* e *Hepatozoon capsulata*, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfológica, morfométrica e molecularmente *Hepatozoon* spp. de quatro exemplares de *C. durissus terrificus* naturalmente infectados, assim como observar alterações induzidas por estes protozoários nas hemácias parasitadas. Os gamontes, estágios esporogônicos e as alterações nas hemácias foram analisados morfológica e morfometricamente usando o software Qwin Lite 2,5. A caracterização molecular foi feita através da PCR e seqüenciamento genético. Foram observados aparentemente seis gamontes distintos que foram provisoriamente nomeados de gamontes A, B, C, D, E e F. A análise estatística, porém, apontou a existência de somente quatro populações de parasitas, sendo que alguns foram capazes de induzir alterações significativas em determinadas variáveis das hemácias. A caracterização molecular não conseguiu diferenciar em espécies as amostras estudadas, pelo menos no que diz respeito ao fragmento analisado.

Palavras- chave: *Hepatozoon*, serpentes, morfometria, morfologia, caracterização molecular.

Abstract

The most frequent intracellular protozoa in snakes are members of the *Hepatozoon* genera. Considering the variety of parasites infecting specimens of *Crotalus durissus terrificus* and the divergent data in literature where only two species, *Hepatozoon romani* and *Hepatozoon capsulate*, are described, the aim of this study was to morphologically, morphometrically, and molecularly characterize *Hepatozoon* spp. from four naturally infected specimens of *C. durissus terrificus*, and observe changes caused by these protozoa in parasitized erythrocytes. The gamonts, sporogonic stages, and red blood cell changes were morphologically and morphometrically analyzed using Qwin Lite 2.5 software. Molecular characterization was performed using PCR and genetic sequencing. Six distinct gamonts were apparently observed and provisionally named gamonts A, B, C, D, E, and F. Statistical analysis however, confirmed the existence of only four parasite populations, those which were capable of inducing significant alterations in determined erythrocytic variables. Molecular characterization was unable to differentiate between species from the sample fragments studied.

Keywords: *Hepatozoon*, snakes, morphology, morphometry, molecular characterization.

Introdução

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa; subordem Adeleina e família Hepatozoidae (Levine et al., 1980). *Hepatozoon* spp. têm sido observados frequentemente parasitando serpentes (Smith, 1996). Seu ciclo é heteroxênico, envolvendo um estágio merogônico (fase assexuada) no hospedeiro vertebrado e outro, gametogônico (fase sexuada) e esporogônico, no vetor invertebrado (Wozniak et al., 1994).

O critério taxonômico empregado para a identificação de *Hepatozoon* tem sido baseado principalmente na caracterização morfológica dos gamontes no sangue periférico do hospedeiro vertebrado e também dos cistos encontrados nos órgãos internos dos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Até 1996, 121 espécies de *Hepatozoon* de serpentes eram reconhecidas (Smith, 1996). Entretanto, muitas dessas espécies foram descritas utilizando somente a morfologia dos gamontes e a presença em determinada espécie de serpente. Após 1996, pelo menos mais 12 novas espécies de *Hepatozoon* foram descritas infectando serpentes (Telford et al., 2001; 2002; 2005 a;b; Sloboda et al., 2007). Por outro lado, gamontes de *Hepatozoon* spp. com morfologia diferente dos já relatados têm sido observados, mas não nomeados, por falta de dados morfológicos e biológicos mais completos e também, por falta de caracterização molecular (Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2003). Em *Crotalus durissus terrificus* são descritas na literatura apenas duas espécies; *Hepatozoon romani* e *Hepatozoon capsulata* (Phisalix, 1931), mas várias outras formas, distintas destas já descritas, têm sido observadas (O'Dwyer et al., 2003).

Apesar de muitos artigos relatarem que as análises morfológicas e morfométricas são de pouca valia para identificação de espécies de *Hepatozoon*, 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. Métodos diagnósticos mais modernos incluem a avaliação do sangue pela técnica de reação de polimerização em cadeia - PCR (Wozniak et al., 1994).

Vários estudos sobre a evolução esporogônica em *Hepatozoon* spp. vêm sendo conduzidos ao longo dos anos. Ball et al. (1967) estudaram a evolução esporogônica do *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 atricaudatus*, em *Aedes aegypti*.

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.

No Brasil, a esporogonia de *Hepatozoon* spp. de serpentes vem sendo pesquisada 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 *Culex fatigans* e *Culex dolosus*, e as de serpentes semi-aquáticas, nas sanguessugas *Haementeria lutzi* e *Haementeria gracilis* (Pessoa & Cavalheiro, 1969a,b; Pessoa et al., 1970a,b,c, 1971a,b, 1972, 1974a,b,c; Pessoa & De Biasi, 1973a,b, 1974).

O'Dwyer et al. (2002a,b) conduziram estudos sobre estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. de *C. durissus terrificus*, em *Culex quinquefasciatus* e no carrapato *Amblyomma rotundatum*, assim como de *Hepatozoon terzii*, de *Boa constrictor amarali*, em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

Paperna & 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*.

Contudo, o fato da indiscutível semelhança entre os oocistos e entre os gamontes de diversas espécies de *Hepatozoon* torna falha a identificação baseada somente nessas características (Pessoa & De Biasi, 1973a,b; Moço et al., 2002). Por outro lado, existe a possibilidade de uma mesma espécie apresentar características morfológicas diferentes em hospedeiros diversos (Ball, 1970).

Vários estudos foram realizados com o intuito de caracterizar geneticamente espécies de *Hepatozoon* de anfíbios e répteis. O primeiro deles foi conduzido por Wozniak et al. (1994), onde os autores conseguiram amplificar o rDNA de cinco diferentes isolados de *Hepatozoon* spp. de serpentes.

Smith et al. (1999) também conduziram estudos para caracterizar espécies de *Hepatozoon* de serpentes, utilizando sangue total, a partir do qual foram extraídas as amostras de DNA. Foi realizada amplificação da região ITS-1 utilizando oligonucleotídeo com o sítio de ligação do final 3' do gene 18S rDNA (5'-CGTAGGTGAACCTGCAGAAGG-3') e um oligonucleotídeo reverso com sítio de ligação do final 5' do gene 5.8S rDNA (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3').

Perkins & Martin (1999) avaliaram que os oligonucleotídeos desenvolvidos por Wozniak et al. (1994) não são específicos para hemogregarinas e amplificam também os genes SSU rRNA dos hospedeiros vertebrados, quando o DNA é extraído do sangue. Assim, Perkins & 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. De acordo com os autores, *Hepatozoon americanum*, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon catesbiana* formam um grupo monofilético, sendo que as duas espécies que infectam cães foram consideradas espécies irmãs, com similaridade de 96,4%.

A primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. de serpentes na América Latina foi conduzida por Rubini et al. (2005b), através da técnica da PCR padronizada pelos autores (Rubini et al., 2005a, 2006). A PCR foi eficiente em detectar *Hepatozoon* spp. de sangue de *Hydrodynastes gigas* com amplificação de produto de 625 pb.

Tendo em vista toda a problemática com relação à taxonomia desses parasitas, o objetivo do presente estudo foi caracterizar morfológica, morfométrica e molecularmente *Hepatozoon* spp. de alguns espécimes de *C. durissus terrificus*.

Material e Métodos

Animais e manejo

O estudo foi realizado com hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* de quatro espécimes de *C. durissus terricus*, provenientes da região de Botucatu, São Paulo, que foram doados ao CEVAP/UNESP e que, em exames de rotina, mostraram-se portadores destes parasitas.

Esses animais foram alojados em caixas individuais de polipropileno de dimensões 0,60m X 0,40m X 0,35m, devidamente ventiladas, com água a disposição em potes de alumínio e alimentação quinzenal.

Os mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes* foram doados pelo Prof. Dr. Newton Goulart Madeira, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Coleta de sangue

O sangue foi obtido por punção da veia caudal, após contenção mecânica do animal.

Foram coletados, aproximadamente, 0,4ml de sangue com seringa de insulina. Imediatamente após a coleta, foram 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 Giemsa (10%) por 30 minutos.

Amostras de sangue foram congeladas a -20°C para realização dos estudos de caracterização molecular pela técnica de PCR.

Análise dos gamontes

Os gamontes encontrados foram analisados quanto ao formato do corpo, presença de cápsula e de pigmentos citoplasmáticos, formato e posição de seu núcleo.

A análise morfométrica foi realizada através de um sistema computadorizado de análise de imagens, capturadas através de um sistema de vídeo acoplado ao computador e medidas através do software Qwin Lite 2.5 (Leica).

As variáveis estudadas foram área, comprimento e largura, tanto dos gamontes como de seus núcleos. Para cada serpente parasitada foram pesquisadas 100 imagens de cada forma parasitária ou, alternativamente, o número máximo de parasitas encontrados nas lâminas.

Alterações nas hemácias

Para avaliar possíveis alterações morfológicas nas hemácias, induzidas pela presença do parasita, foram analisadas, de modo semelhante ao estudo dos parasitas, 100 hemácias normais e 100 hemácias parasitadas de cada serpente, cujas variáveis foram área, comprimento e largura da hemácia, bem como área, comprimento e largura do núcleo da hemácia.

Estudo dos estágios esporogônicos

Mosquitos das espécies *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* foram criados e mantidos em laboratório, à temperatura de 25°C, sendo alimentados com solução de sucrose a 10% até o momento em que foram colocados para se alimentar diretamente na serpente parasitada. Para tanto, as serpentes foram introduzidas em caixas teladas contendo os mosquitos e ali mantidas até fêmeas ingurgitadas de mosquitos serem observadas. A dissecação foi realizada com base no protocolo descrito por Consoli & Oliveira (1994). As fêmeas de mosquitos alimentadas foram, no dia definido para a dissecação, congeladas por 10 min. e então dissecadas sobre lâminas contendo solução fisiológica para avaliação da presença de oocistos. Os oocistos encontrados foram observados a fresco. As dissecações foram realizadas em diferentes dias para avaliação da presença e evolução de oocistos. Os oocistos, esporocistos e esporozoítas encontrados foram fotografados e analisados quanto às medidas de área, comprimento e largura, pelo software Qwin Lite 2,5.

Caracterização Molecular

Extração do DNA

O DNA total foi extraído empregando-se o “Kit QIAamp DNA blood” (QiAGEN), seguindo-se a metodologia proposta pelo fabricante. Foram utilizados dois pares distintos de oligonucleotídeos que detectam regiões do gene 18S rRNA (HepF/ HepR e Piro A1 *forward* / Piro B *reverse*).

Condições de Amplicação

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: um ciclo inicial *hot start* de 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Para verificação de

contaminação durante o processo foram utilizados em todas as reações um controle negativo através da substituição do ácido nucléico por H₂O Milli-Q, e um controle positivo de DNA genômico obtido de uma serpente naturalmente infectada por *Hepatozoon* sp.

O produto amplificado com volume de 8 µl foi submetido à eletroforese em gel de agarose (GIBCO BRL[®]) 1%. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal Hoefer HE 33 (GE Healthcare) a 100 volts por 1 hora e a banda visualizada em um transluminador UV e fotografada com câmara digital *Nikon coolpix 750*. Para determinação dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (100bp DNA Ladder, Invitrogen[®]). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação com 500 pares de bases.

Purificação dos Produtos de PCR

Os fragmentos de PCR das amostras foram purificados por reação enzimática adicionando-se 2µl da enzima ExoSAP IT (GE Healthcare) a 8µl do produto de PCR de acordo com as recomendações do fabricante, sendo, a seguir, submetidos ao seqüenciamento.

Clonagem

Nos exemplares Cdt282 e Cdt286, cujas amostras de sangue foram incluídas no estudo e que, aparentemente, apresentavam mais de uma espécie de *Hepatozoon*, os fragmentos obtidos do produto de PCR foram purificados e ligados em vetores comerciais destinados para este fim (pGEM-T e/ou pTTZ57R/T). A seguir, as células de *Escherichia coli* DH5a foram transformadas com os vetores contendo o produto de interesse e as colônias obtidas foram analisadas através da rápida preparação de DNA plasmidial para seleção de clones recombinantes (Beuken et al., 1998) em gel de agarose. Este método permitiu identificarmos os plasmídeos recombinantes por tamanho e utilizar apenas um passo para a extração do DNA. A seguir, foi realizada a mini preparação dos plasmídeos que contém o fragmento de interesse para o seqüenciamento.

Sequenciamento

As seqüências de DNA foram determinadas em seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems[®]) utilizando-se 6 µl de 2,5x Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9,0, 10 mM MgCl₂), 2 µl BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2 µmol dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, e 4

μl do DNA genômico a 5 ng/μl. As reações de seqüenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, com rampa de 1°C/segundo, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foram utilizadas duas reações, sendo uma para o oligonucleotídeo *forward* e outra para o *reverse*.

Precipitação das reações de Sequenciamento

Para cada reação de seqüenciamento 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 5 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 seqüenciador automático ABI PRISM® 377 (Applied Biosystems, USA) as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e rapidamente transferidas para o gelo.

Análise dos Dados - Alinhamento das Seqüências

As seqüências *forward* e *reverse*, geradas automaticamente, foram alinhadas com auxílio dos programas MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) e CLUSTAL W versão 1.8 (Thompson et al., 1994), comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando-se o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Posteriormente as seqüências 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 (Felseinstein, 1985). Os espécimes utilizados para análise filogenética e seus respectivos números de acesso do GenBank estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de *Hepatozoon* utilizadas para análise filogenética e seus respectivos números de acesso do GenBank.

Espécies	Número de acesso do GenBank
<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Varanus scalaris</i>	AY252108
<i>Hepatozoon</i> sp.- <i>Boiga</i>	AY252103
<i>Hepatozoon</i> . <i>Ayorgborg</i>	EF157822
<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Stegonotus cucullatus</i>	AY252110
<i>Hepatozoon</i> sp. BV1	AY600626
<i>Hepatozoon</i> sp. BV2	AY600625
<i>Hepatozoon felis</i> – Spain 2	AY628681
<i>Hepatozoon catesbiana</i>	AF130361
<i>Hepatozoon canis</i> – Venezuela 2	DQ439540
<i>Hepatozoon americanum</i>	AF176836
<i>Babesia rodhaini</i>	M87565

Análise Estatística

Todas as variáveis registradas para o parasita foram analisadas e comparadas utilizando-se o programa SigmaStat.3.1(Jandel Scientific Corporation). Foram empregados testes de Análise de Variância. Quando o resultado foi paramétrico utilizou-se o método Student-Newman-Keuls para comparação entre os parasitas, e quando foi não paramétrico utilizou-se o Método de Dunn's para a comparação entre os dados. O nível de significância adotado foi de 5%.

As variáveis registradas para o parasita e para as hemácias, também foram analisadas conjuntamente empregando-se um teste de análise multivariada. O teste estatístico foi realizado pelo programa MVSP 3.1.

Resultados

Análises morfológicas e morfométricas

Dois exemplares de *C. durissus terrificus* apresentaram dois gamontes distintos, Cdt05 (gamontes A e B) e Cdt07 (gamontes C e D). Os outros dois exemplares apresentaram apenas um tipo de gamonte, Cdt01 (gamonte E) e Cdt09 (gamonte F). Seguem abaixo as características de cada um deles.

Gamonte A:

Encontrado parasitando o exemplar Cdt05. Situado junto ao núcleo da hemácia. Possuía tamanho pequeno, com citoplasma uniforme e núcleo compacto deslocado para uma das extremidades (Figura 7A). Esse parasita alterou apenas dois parâmetros das hemácias infectadas (Tabela 2). Tais alterações não foram suficientes pra separar grupo normal de parasitado na análise multivariada (Figura 1). Tal gamonte era morfológicamente semelhante ao gamonte F, parasita do exemplar Cdt09.

Gamonte B:

Encontrado parasitando o exemplar Cdt05. Apresentou formato comprido e largo, com uma das extremidades mais afilada, citoplasma eosinofílico, vacuolizado e núcleo centralizado ou ligeiramente deslocado para uma das extremidades (Figura 7B). Tal parasita alterou os parâmetros das hemácias de forma mais efetiva do que o parasita A (Tabela 2), mas essas alterações também não foram suficientes para separar o grupo normal do parasitado, de acordo com a análise multivariada dos componentes de comparação entre tais hemácias (Figura 1).

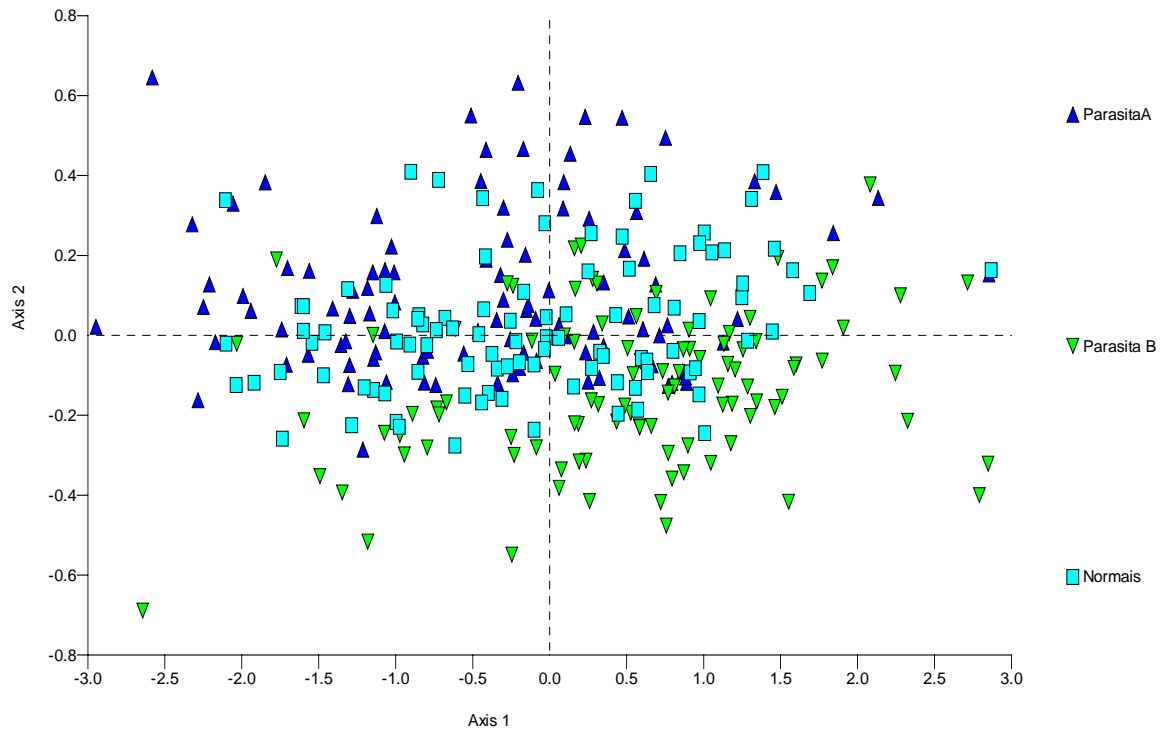


Figura 1- Análise Multivariada dos componentes de comparação entre as hemácias normais e parasitadas pelos gamontes A e B, de *Crotalus durissus terrificus* 05.

Gamonte C:

Encontrado parasitando o exemplar Cdt07. Possui formato longo e largo, com uma das extremidades ligeiramente encurvada, citoplasma basofílico e uniforme, com o núcleo grande e deslocado para uma das extremidades (Figura 7C). Esse gamonte alterou vários parâmetros das hemácias parasitadas (Tabela 2), mas tais alterações também foram insuficientes para separar o grupo normal do parasitado na análise multivariada (Figura 2). Tal gamonte era, morfologicamente semelhante ao gamonte E, encontrado no exemplar Cdt01.

Gamonte D:

Encontrado parasitando o exemplar Cdt07. Possui formato longo e fino, com uma das extremidades afilada, também com citoplasma basofílico e núcleo compacto e central (Figura 7D). Tal parasita também alterou alguns parâmetros das hemácias parasitadas (Tabela 2), mas tais alterações, tal como ocorreu com o gamonte C, não foram suficientes para a diferenciação entre os grupos normal e parasitado, como mostra a análise multivariada dos componentes de comparação entre estas hemácias (Figura 2).

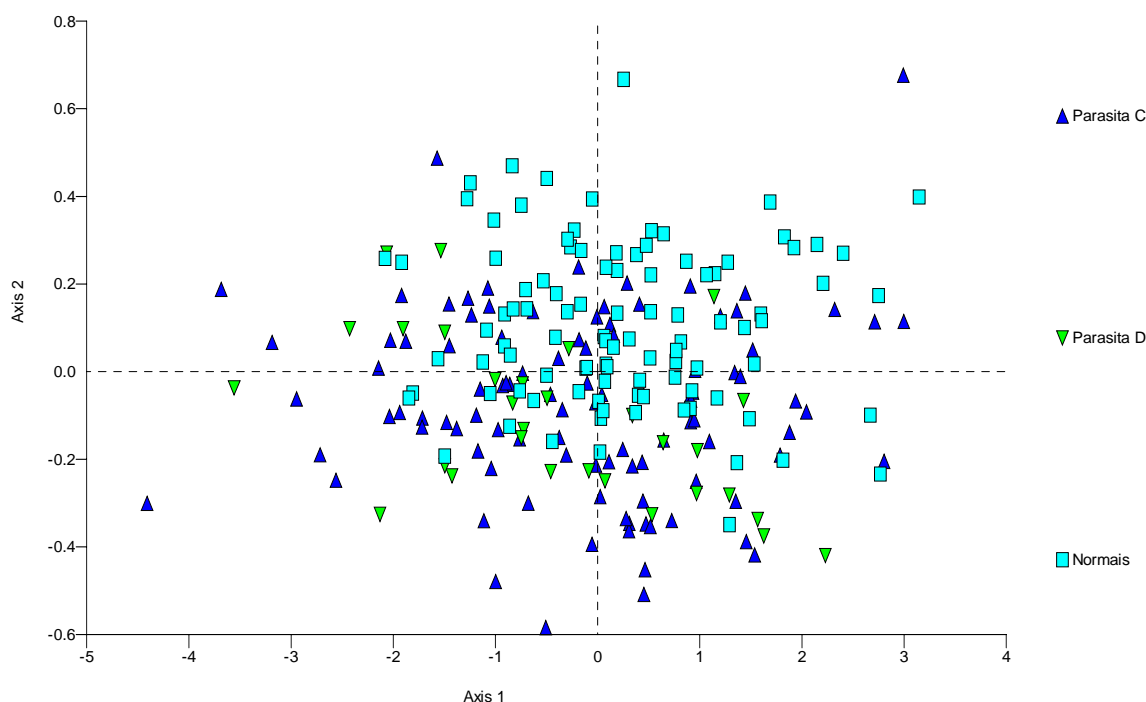


Figura 2 - Análise Multivariada dos componentes de comparação entre as hemácias normais e parasitadas pelos gamontes C e D, de *Crotalus durissus terrificus* 07.

Gamonte E:

Encontrado parasitando o exemplar Cdt01. Situava-se junto ao núcleo da hemácia. Seu formato era alongado, com citoplasma uniforme e núcleo compacto e alongado, localizado na parte central do parasita ou ligeiramente deslocado para uma das extremidades (Figura 7E). Esse gamonte alterou alguns parâmetros das hemácias parasitadas em relação às não parasitadas (Tabela 2) e, quando suas variáveis foram submetidas à análise multivariada, foram observados dois grupos distintos, o que aponta uma alteração significativa nas hemácias que albergam esse gamonte (Figura 3). Morfologicamente, assemelhava-se ao gamonte C, parasita do exemplar Cdt05.

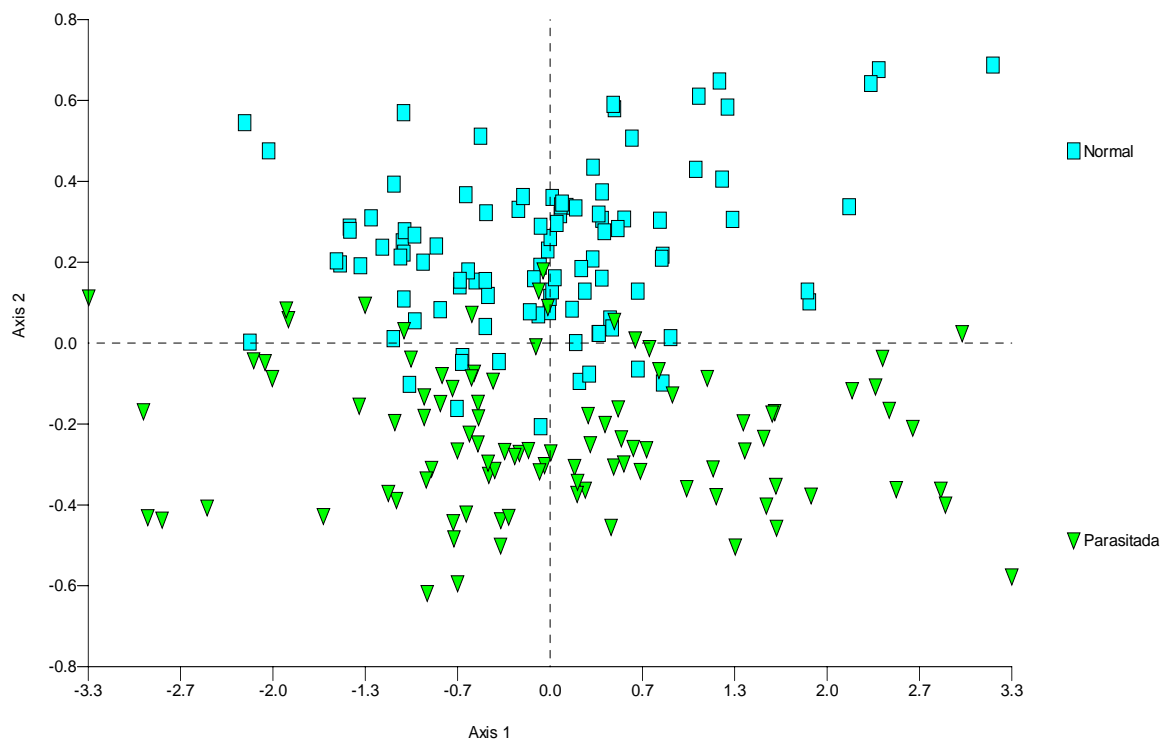


Figura 3- Análise Multivariada dos componentes de comparação entre as hemácias normais e parasitadas pelo gamonte E, de *Crotalus durissus terrificus* 01.

Gamonte F:

Encontrado parasitando o exemplar Cdt09. Situava-se junto ao núcleo da hemácia, possuía tamanho pequeno, com citoplasma uniforme e núcleo compacto deslocado para uma das extremidades (Figura 7F). Apesar do seu tamanho, relativamente pequeno, este parasita alterou as hemácias em alguns parâmetros quando parasitadas por um único gamonte e em todos seus parâmetros quando parasitadas por dois gamontes (Tabela 2). Fato este também observado pela análise multivariada dos componentes de comparação entre hemácias normais e parasitadas, apesar das muitas sobreposições entre seus elementos (Figura 4). Tais alterações, entretanto, foram bem mais discretas do que as apresentadas na análise do gamonte E. Esse gamonte era, morfologicamente, semelhante ao gamonte A, parasita do exemplar Cdt05.

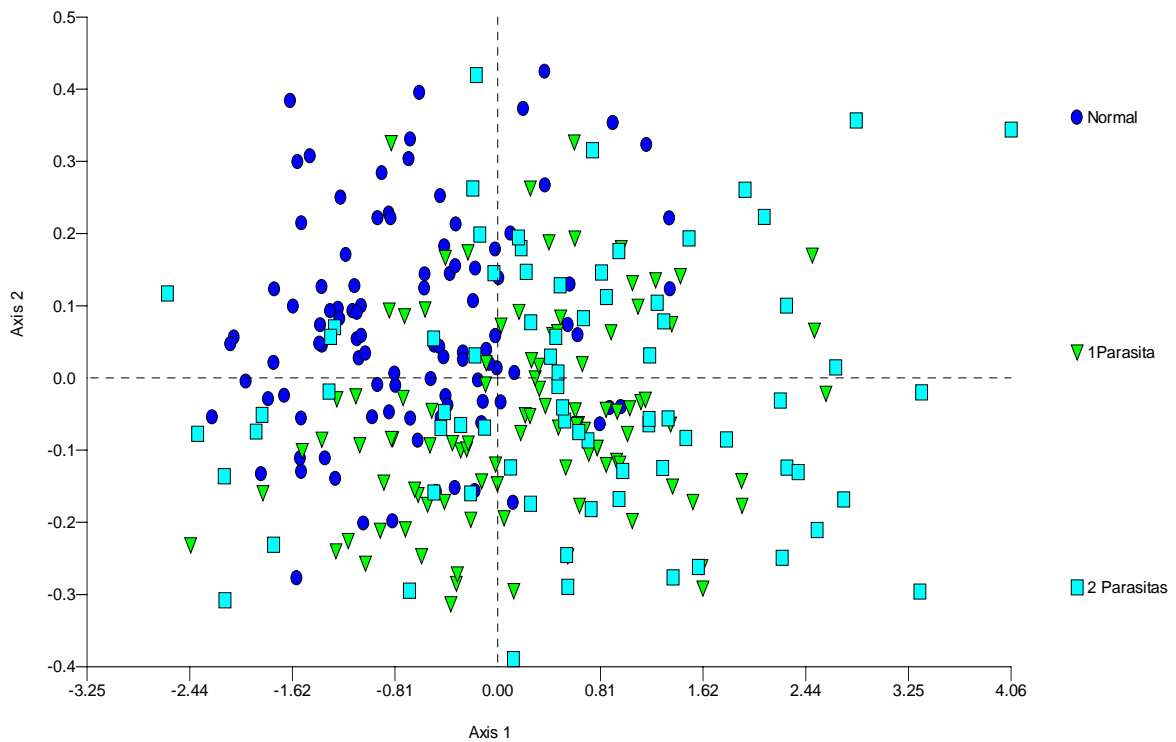


Figura 4- Análise Multivariada dos componentes de comparação entre as hemácias normais e parasitadas pelo gamonte F, de *Crotalus durissus terrificus* 09.

Todos os gamontes encontrados alteraram as hemácias parasitadas em pelo menos duas variáveis. Sendo que cinco das seis formas alteram quase todas as variáveis, mas em proporções distintas (Tabela 2). Ainda assim, a análise multivariada dos componentes de comparação entre hemácias parasitadas e não parasitadas, só conseguiu separar tais grupos no caso do gamonte E (parasita do exemplar Cdt01).

Tabela 2. Análise comparativa entre eritrócitos de *Crotalus durissus terrificus* normais e parasitados por *Hepatozoon* spp.

Hemácias	AH (μm^2)	CH (μm)	LH (μm)	ANH (μm^2)	CNH (μm)	LNH (μm)	
Cdt 05	N	177,3±17,3 † ^a	19,8±1,4 † ^a	11,6±1,0 † ^a	24,3 (2,0) † ^a	7,1±0,7 † ^a	4,2±0,6 † ^a
	PA	172,3±18,8 † ^a	19,9±1,4 † ^a	11,1±0,9 † ^b	25,2 (2,5) † ^a	7,6±0,7 † ^b	4,1±0,7 † ^a
	PB	188,3±18,2 † ^b	21,9±1,7 † ^b	11,2±1,1 † ^b	22,4 (2,3) † ^b	7,3±0,7 † ^c	3,8±0,5 † ^b
Cdt 07	N	180,8 (11,0) † ^a	21,4 (0,9) † ^a	10,8 (0,4) † ^a	23,7±3,0 † ^a	8,3±0,7 † ^a	3,4 (0,4) † ^a
	PC	178,6 (15,3) † ^a	22,8 (1,0) † ^b	9,6 (0,7) † ^b	20,9±3,5 † ^b	8,0±0,7 † ^b	3,0 (0,3) † ^b
	PD	171,7 (18,6) † ^a	25,1 (1,2) † ^c	8,9 (0,7) † ^c	20,7±2,5 † ^b	7,5±0,8 † ^c	3,3 (0,5) † ^a
Cdt 01	N	167,2 (7,7) † ^a	20,7±1,4 † ^a	10,9 (0,5) † ^a	23,7 (1,8) † ^a	7,7 (0,6) † ^a	3,7 (0,4) † ^a
	PE	165,5 (11,0) † ^a	21,1±1,7 † ^a	10,6 (0,7) † ^b	17,5 (1,6) † ^b	7,1 (0,4) † ^b	3,1 (0,3) † ^b
Cdt 09	N	181,4 (9,3) † ^a	21,4±1,5 † ^a	11,5±0,8 † ^a	21,3 (1,6) † ^a	6,7 (0,4) † ^a	3,9 (0,2) † ^a
	PF	197 (11,6) † ^b	23,0±1,6 † ^b	11,4±0,9 † ^a	19,7 (1,4) † ^b	7,5 (0,3) † ^b	3,3 (0,6) † ^b
	2PF	202,0 (12,9) † ^b	22,2±1,4 † ^c	10,9±1,0 † ^b	20,2 (2,0) † ^b	7,5 (0,6) † ^b	3,5 (0,7) † ^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 por A, PB = hemácias parasitadas por B, PC = hemácias parasitadas por C, PD = hemácias parasitadas por D, PE = hemácias parasitadas por E, PF = hemácias parasitadas por 1 gamonte F, 2PF = hemácias parasitadas por dois gamontes F, Cdt = *Crotalus durissus terrificus*, † = Teste paramétrico (dados correspondes às média e respectivos desvios padrão); †† = Teste não paramétrico (dados correspondem às medianas e suas respectivas amplitudes semi -interquartílicas).

Analisando-se separadamente cada uma das variáveis estudadas para os parasitas, notamos que os gamontes A e F, embora sejam morfologicamente semelhantes, possuem quatro, das seis variáveis estudadas, distintas. O mesmo ocorre entre os gamontes C e E, onde a análise comparativa entre as variáveis apontou apenas uma semelhança.

As medidas das variáveis dos gamontes encontrados nos quatro exemplares de *C. durissus terrificus* estudados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Análise comparativa entre os gamontes de *Hepatozoon* spp. observados em quatro espécimes de *Crotalus durissus terrificus* naturalmente infectados.

Parasitas	AP (μm^2)	CP (μm)	LP (μm)	ANP (μm^2)	CNP (μm)	LNP (μm)
A	21,8 (2,5) ^b	8,6 (0,5) ^b	3,3 (0,3) ^b	7,1 (0,7) ^b	3,2 (0,3) ^b	2,6 (0,2) ^b
B	47,1 (4,3) ^c	16,3 (0,7) ^a	3,6 (0,3) ^c	10,4 (1,1) ^c	4,0 (0,3) ^c	2,8 (0,3) ^b
C	42,7 (3,5) ^c	15,6 (0,4) ^c	3,2 (0,3) ^d	10,3 (0,9) ^a	4,8 (0,4) ^d	2,5 (0,3) ^c
D	24,8 (3,5) ^d	14,1 (1,3) ^c	2,4 (0,3) ^e	5,2 (0,5) ^{b,d}	3,0 (0,5) ^{b,e}	1,9 (0,2) ^d
E	44,2 (4,1) ^a	16,7 (0,8) ^a	3,2 (0,2) ^a	10,4 (0,8) ^a	6,0 (0,4) ^a	2,0 (0,3) ^a
F	21,1 (1,2) ^d	9,3 (0,4) ^b	3,0 (0,1) ^b	4,6 (0,4) ^d	2,6 (0,2) ^c	2,1 (0,2) ^a

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

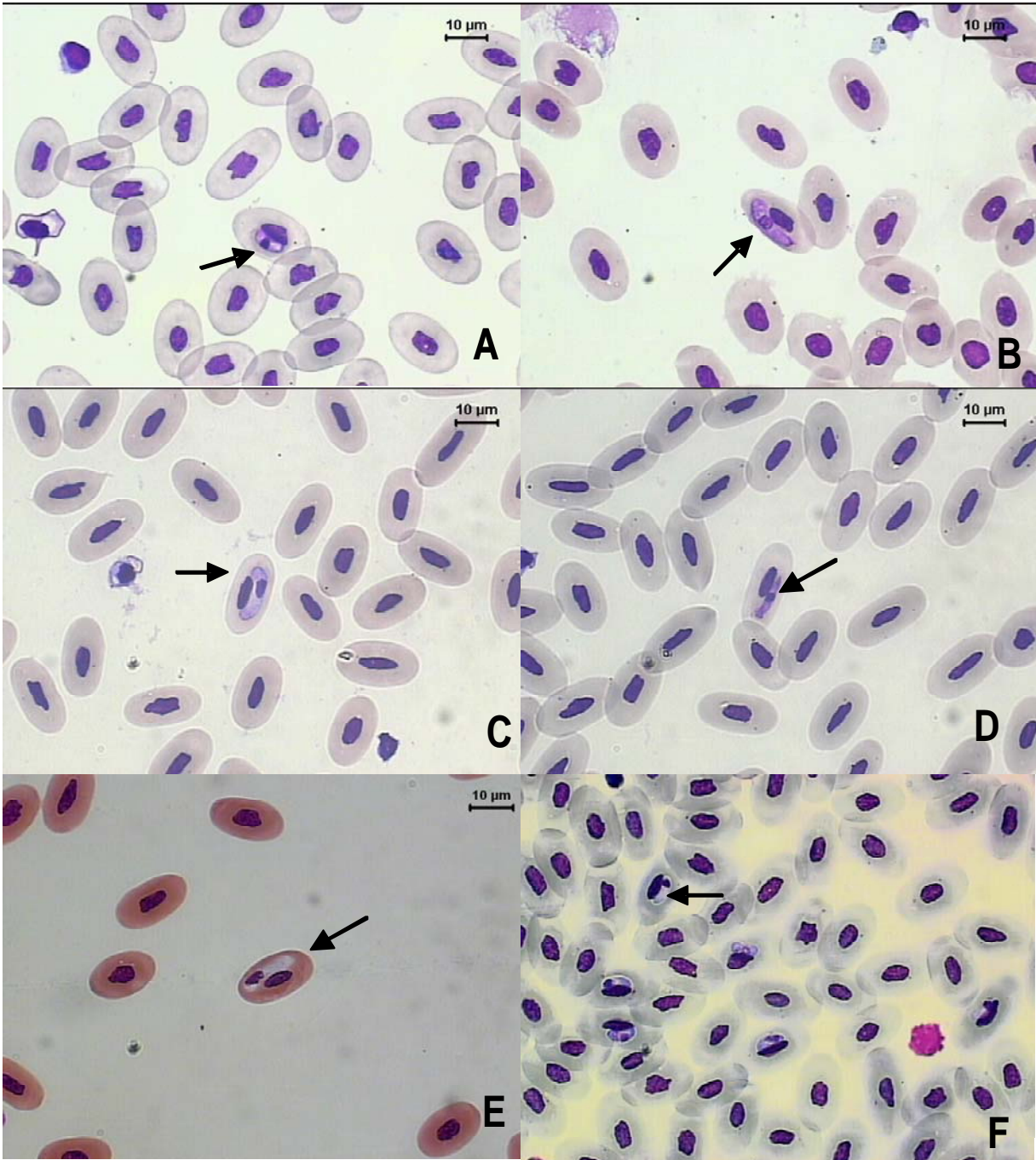


Figura 7- Gamontes de *Hepatozoon* spp. de *Crotalus durissus terrificus* naturalmente infectadas. Esfregaço sangüíneo corado com Giemsa (1000x). A- Cdt05; B- Cdt05; C- Cdt07; D- Cdt07; E- Cdt01; F- Cdt09.

O resultado da análise multivariada dos componentes de comparação entre os gamontes A, B, C, D, E e F, apontou quatro populações de parasitas bem definidas. Uma correspondente aos gamontes A, parasitas do exemplar Cdt05, outra, bem próxima desta, correspondente aos gamontes F, parasitas do exemplar Cdt09. A terceira, onde estão representados os gamontes D, parasitas do exemplar Cdt07 e uma quarta, onde se mesclam elementos correspondentes aos gamontes C (parasitas do exemplar Cdt07), E (parasitas do exemplar Cdt01) e B (parasitas do exemplar Cdt05). Tais resultados encontram-se ilustrados na Figura 8.

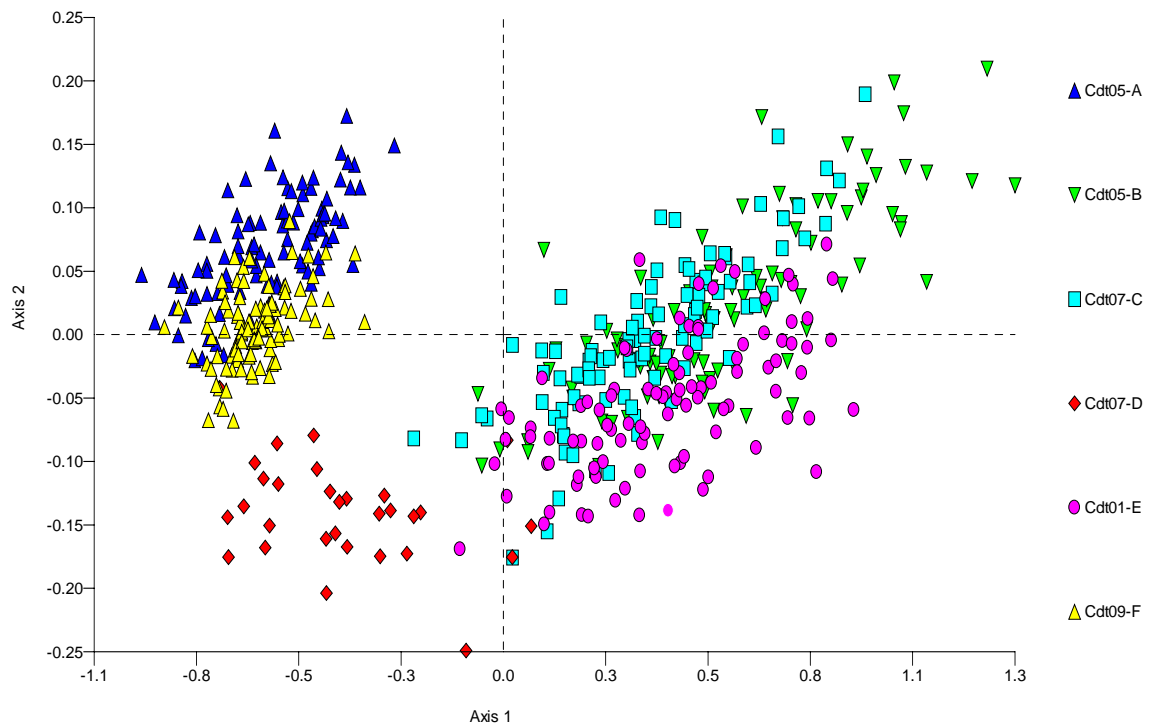


Figura 8- Análise Multivariada dos componentes de comparação entre os gamontes A, B, C, D, E e F de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) naturalmente infectadas.

Obtenção dos Estágios Esporogônicos

Infecção experimental do exemplar Cdt05

- Em mosquitos *A. aegypti*

Foram realizadas duas tentativas de infecção experimental para se obter estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. deste exemplar utilizando *A. aegypti*. Destas, conseguimos recuperar oocistos da hemocele de apenas uma única fêmea, aos treze dias após a alimentação da colônia. (Figura 9).

As dimensões desses oocistos foram $7524,4 \pm 2378,4 \mu\text{m}^2$ de área, $104,7 \pm 13,2 \mu\text{m}$ de comprimento e $89,3 \pm 16,6 \mu\text{m}$ de largura.

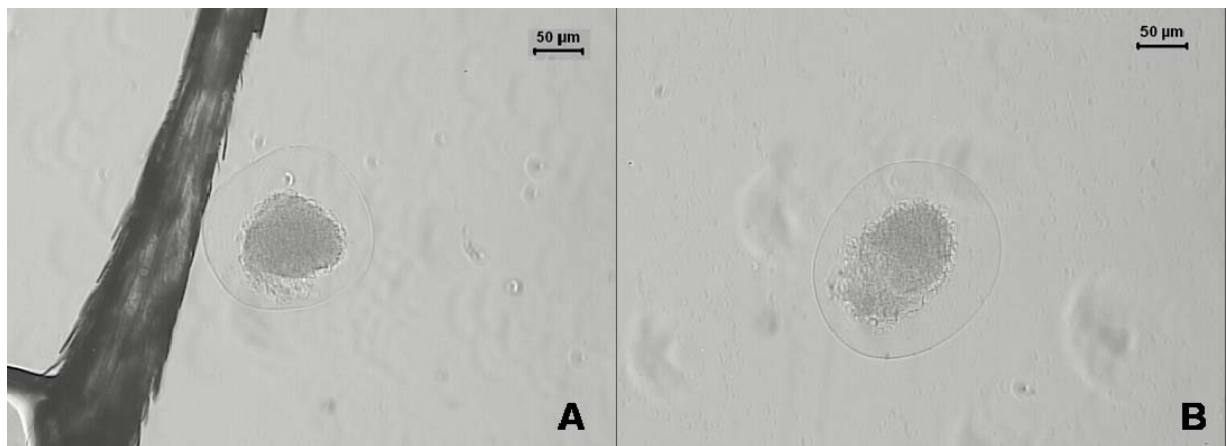


Figura 9. Oocistos de *Hepatozoon* sp. (Cdt05) recuperados da hemocele de mosquito *Aedes aegypti*, 13 dias após alimentação. A, B - Oocistos imaturos, exame a fresco (200x).

Em mosquitos *C. quinquefasciatus*

Foi realizada uma única tentativa de infecção experimental para se obter estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. em *C. quinquefasciatus* e essa tentativa foi falha.

Infecção experimental do exemplar Cdt07

Com relação ao exemplar Cdt07 foram realizadas duas tentativas de infecção experimental para obtenção de estágios esporogônicos de *Hepatozoon* spp. Uma delas utilizando mosquitos *A. aegypti* e outra *C. quinquefasciatus*. Ambas tentativas foram falhas.

Infecção experimental do exemplar Cdt01

- Em mosquitos *C. quinquefasciatus*

O exemplar Cdt01 foi utilizado em três tentativas de infecção experimental para obtenção de estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. em *C. quinquefasciatus*, pois havíamos observado, em infestações anteriores, que a espécie *A. aegypti* é pouco susceptível à infecção por *Hepatozoon* spp. Em duas destas tentativas foram recuperados oocistos e/ou esporocistos desse parasita (Figura 10).

As dimensões dos oocistos imaturos, recuperados 15 dias após a alimentação dos mosquitos, foram $22078,7 \pm 5077,8\mu\text{m}^2$ de área, $212,3 \pm 30,6\mu\text{m}$ de comprimento e $130,6 \pm 28,8\mu\text{m}$ de largura.

Seus esporocistos, recuperados 20 dias após a alimentação, mediram $948,73 \pm 167,4\mu\text{m}^2$ de área, $40,29 \pm 5,7\mu\text{m}$ de comprimento e $28,6 \pm 3,3\mu\text{m}$ de largura.

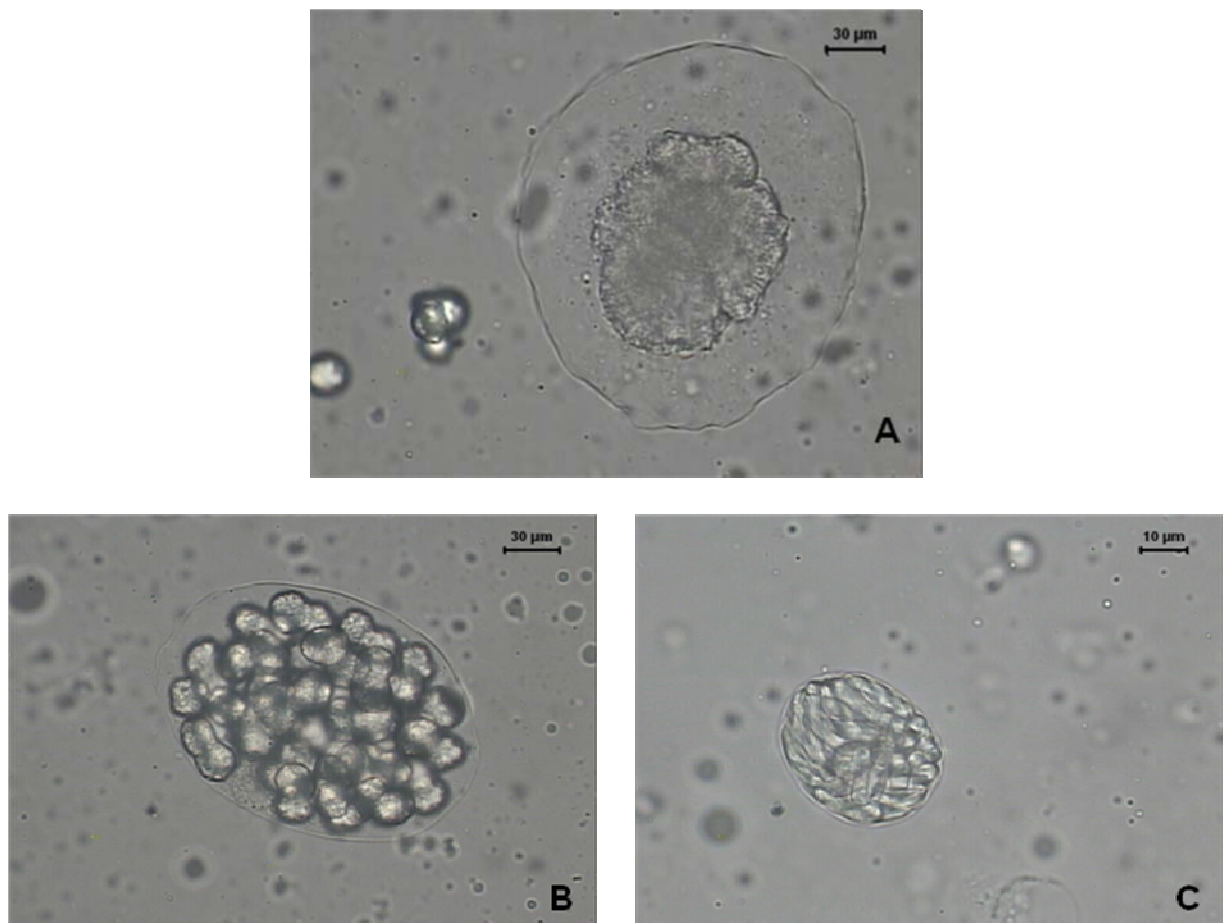


Figura 10. Estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp (Cdt01) recuperados da hemocele de mosquito *Culex quinquefasciatus* por exame a fresco. A – oocisto imaturo, 15 dias após alimentação (400x). B - Oocisto imaturo, 15 dias após alimentação (400x). C – esporocisto livre, 20 dias após a alimentação (1000x).

Infecção experimental do exemplar Cdt09

- Em mosquitos *A. aegypti*

O exemplar Cdt09 foi submetido a duas tentativas de infecção experimental para obtenção dos estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. utilizando mosquitos *A. aegypti*. Destas, foram recuperados um único oocisto, 17 dias após sua alimentação (Figura 11).

As dimensões desse oocisto foram $9720,9\mu\text{m}^2$ de área, $113,4\mu\text{m}$ de comprimento e $112,1\mu\text{m}$ de largura.



Figura 11. Oocisto imaturo de *Hepatozoon* sp. (Cdt09) recuperado da hemocele de mosquito *Aedes aegypti*, 17 dias após alimentação. Exame a fresco (400x).

- Em mosquitos *C. quinquefasciatus*

Foram realizadas duas tentativas de infecção experimental para obtenção dos estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. do exemplar Cdt09 utilizando mosquitos *C. quinquefasciatus*. Destas foram recuperados dezenas de oocistos e esporocistos, em vários momentos (Figura 12).

Os oocistos imaturos, recuperados de *C. quinquefasciatus*, 11 dias após a alimentação mediram $3652,6 \pm 519,5\mu\text{m}^2$ de área, $71,3 \pm 5,9\mu\text{m}$ de comprimento e $66,5 \pm 5,4\mu\text{m}$ de largura.

Outros oocistos também imaturos, recuperados 14 dias após a alimentação, mediram $8515,86 \pm 2425,9\mu\text{m}^2$ de área, $110,2 \pm 15,1\mu\text{m}$ de comprimento e $96,96 \pm 15,2\mu\text{m}$ de largura.

Os oocistos recuperados 20 dias após a alimentação mediram $16961,8 \pm 2682,9\mu\text{m}^2$ de área, $151,8 \pm 13,8\mu\text{m}$ de comprimento e $143,0 \pm 13,4\mu\text{m}$ de largura e seus esporocistos tinham dimensões de $701,6 \pm 175,6\mu\text{m}^2$ de área, $33,5 \pm 6,8\mu\text{m}$ de comprimento e $26,4 \pm 2,7\mu\text{m}$ de largura.

Aos 26 dias após a alimentação dos mosquitos, os oocistos recuperados mediram $12229,1 \pm 4229,1\mu\text{m}^2$ de área, $128,5 \pm 22,5\mu\text{m}$ de comprimento e $118,0 \pm 19,7\mu\text{m}$ de largura; seus esporocistos tinham dimensões de $360,5 \pm 81,7\mu\text{m}^2$ de área, $22,7 \pm 3,6\mu\text{m}$ de comprimento e $20,3 \pm 1,9\mu\text{m}$ de largura e os esporozoítas, $76,7 \pm 6,1\mu\text{m}^2$ de área, $21,1 \pm 0,3\mu\text{m}$ de comprimento e $5,1 \pm 0,4\mu\text{m}$ de largura.

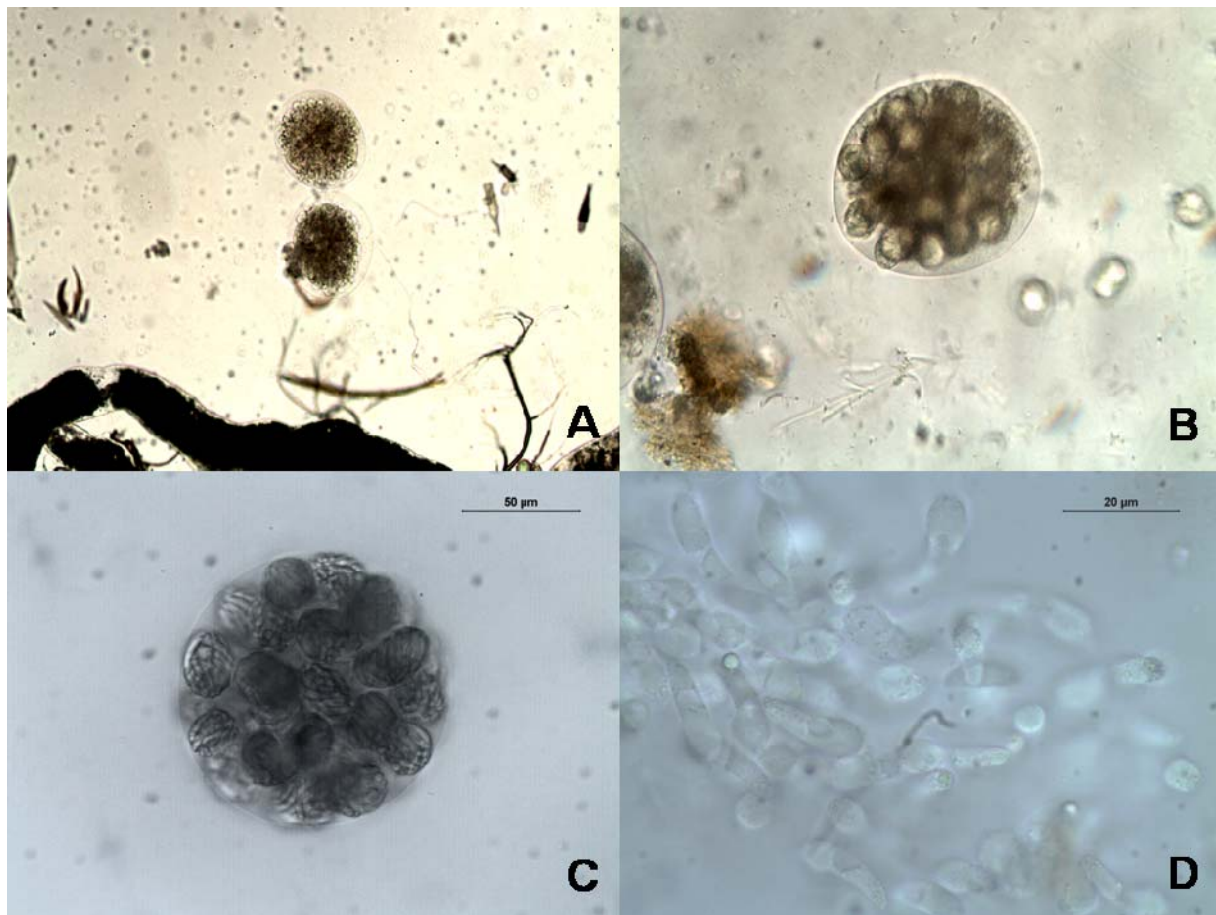


Figura 12. Estágios esporogônicos de *Hepatozoon* sp. (Cdt09) recuperados da hemocele de mosquito *Culex quinquefasciatus* por exame a fresco. A – oocisto imaturo, 11 dias após alimentação (200x). B - Oocisto imaturo, 14 dias após alimentação (400x). C – oocisto maduro, 20 dias após alimentação (400x). D – esporozoítas livres, 26 dias após a alimentação (1000x).

Caracterização molecular pela técnica de PCR

Como a tentativa de utilização dos oligonucleotídeos internos HepF e HepR para amplificação do DNA das amostras Cdt05, Cdt07, Cdt01 e Cdt09, não foi bem sucedida, um segundo par de oligonucleotídeos, Piro A1 *forward*, com 23 bases e Piro B *reverse*, com 21 bases, foi, então, utilizado. Resultados positivos foram alcançados com a utilização desse último par de oligonucleotídeos (Figura 13).

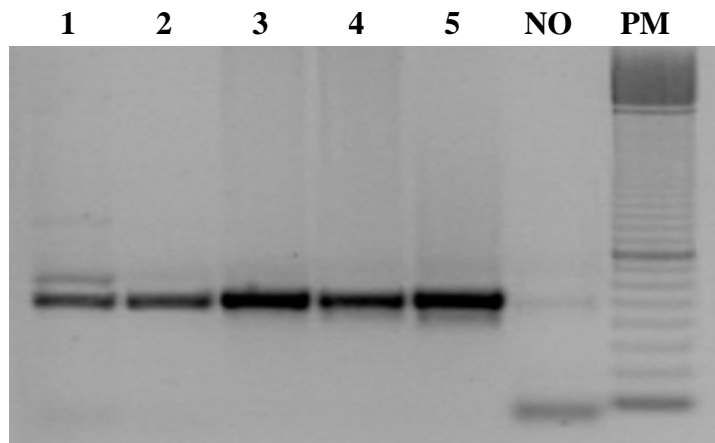


Figura 13. Visualização em gel de agarose 1% dos produtos de PCR do gene 18s rRNA de *Hepatozoon* spp. Poços de 1 a 4 - espécimes de *Crotalus durissus terrificus*; Poço 5 - Controle positivo, NO - controle negativo, PM - Marcador de Peso Molecular 100 pb.

Após a realização da técnica de PCR, as amostras de DNA obtidas das serpentes Cdt 01, 05, 07 e 09 foram utilizadas para o seqüenciamento. As amostras de DNA de Cdt05 e Cdt07 não puderam ser seqüenciadas por, aparentemente, apresentarem mais de uma forma de gamonte. Essas deverão ser, futuramente, clonadas para tentativa de obter-se seu seqüenciamento.

Amostras anteriormente clonadas (Cdt282, Cdt286 e *H. gigas*) foram também seqüenciadas e incluídas no estudo. O alinhamento de tais seqüências e das seqüências das amostras de Cdt01 e Cdt09, encontram-se na Figura 14.

A análise do alinhamento das cinco seqüências apontou apenas mutações pontuais. Em toda a extensão do fragmento analisado, a diferença entre o parasita E (Cdt01) e o parasita F (Cdt09) é de apenas um nucleotídeo. Entre E e as amostras Cdt282 e Cdt286, existem apenas 10 pontos de mutação dos sítios polimórficos e entre as mesmas amostras e o parasita F, a

diferença é de 9 pontos de mutação. A diferença entre E e a amostra de *H. gigas*, é de 8 pontos de mutação e entre a mesma e o parasita F, 9 pontos.

Comparando-se as amostras Cdt282 e Cdt286 entre si, a diferença é de apenas 1 ponto de mutação dos sítios polimórficos. Tais amostras, se comparadas à de *H. gigas*, diferem em 7 pontos de mutação.

```

Hepatozoon_sp_Crot 282      CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTA
Hepatozoon_sp_Crot 286      CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTA
Hepatozoon_sp_Hydrody      CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTA
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAATAGCA
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAATAGCA
***** *

Hepatozoon_sp_Crot 282      TAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTT
Hepatozoon_sp_Crot 286      TAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTT
Hepatozoon_sp_Hydrody      TAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     AAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     AAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTT
*****

Hepatozoon_sp_Crot 282      GTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGG
Hepatozoon_sp_Crot 286      GTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGG
Hepatozoon_sp_Hydrody      GTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGG
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     GTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGG
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     GTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGG
*****

Hepatozoon_sp_Crot 282      GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT
Hepatozoon_sp_Crot 286      GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT
Hepatozoon_sp_Hydrody      GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATAT
*****

Hepatozoon_sp_Crot 282      TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAA
Hepatozoon_sp_Crot 286      TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAA
Hepatozoon_sp_Hydrody      TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAA
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAA
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     TAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAA
*****

Hepatozoon_sp_Crot 282      CCGGTGTGCTTTTATTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTAGCAAT
Hepatozoon_sp_Crot 286      CCGGTGTGCTTTTATTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTAGCAAT
Hepatozoon_sp_Hydrody      CCGGTGTGCTTTTATTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTAGCAAT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     CCGGTGTGCTTTTATTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTAGCAAT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     CCGGTGTGCTTTTATTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTAGCAAT
*****

Hepatozoon_sp_Crot 282      AATGTCCTTAGAAATGTTTTACTTT
Hepatozoon_sp_Crot 286      AATGTCCTTAGAAATGTTTTACTTT
Hepatozoon_sp_Hydrody      AATGTCCTTAGAAATGTTTTACTTT
Hepatozoon_sp_Crot Cdt1     AATGTTCTTTGAAATGTTTTACTTTA
Hepatozoon_sp_Crot Cdt9     AATGTTCTTTGAAATGTTTTACTTTA
*****

```

Figura 14. Alinhamento múltiplo das seqüências realizado pelo programa CLUSTAL W (1.81). Os nucleotídeos marcados representam pontos de mutação dos sítios polimórficos.

A análise da árvore filogenética e dos índices de identidade genômica entre as amostras comparadas mostra que, com relação ao fragmento analisado, os isolados de *Hepatozoon* spp são muito semelhantes entre si, especificamente entre as amostras Cdt01 e Cdt09, que possuem fragmentos praticamente idênticos. O mesmo ocorre entre as amostras de Cdt282 e Cdt286. Um pouco mais distante se encontra a amostra de *H. gigas*, apesar de manter, com as anteriores, um maior grau de semelhança, quando se comparados os três grupos demonstrados pela árvore (Cdt01/Cdt09, Cdt282/Cdt286 e amostra de *H. gigas*).

As relações filogenéticas entre os isolados estudados e os obtidos do GenBank (Tabela 1) estão demonstradas na Figura 15. Os índices de identidade genômica obtidos após comparação com sequências descritas na Tabela 1 estão registrados na Tabela 4.

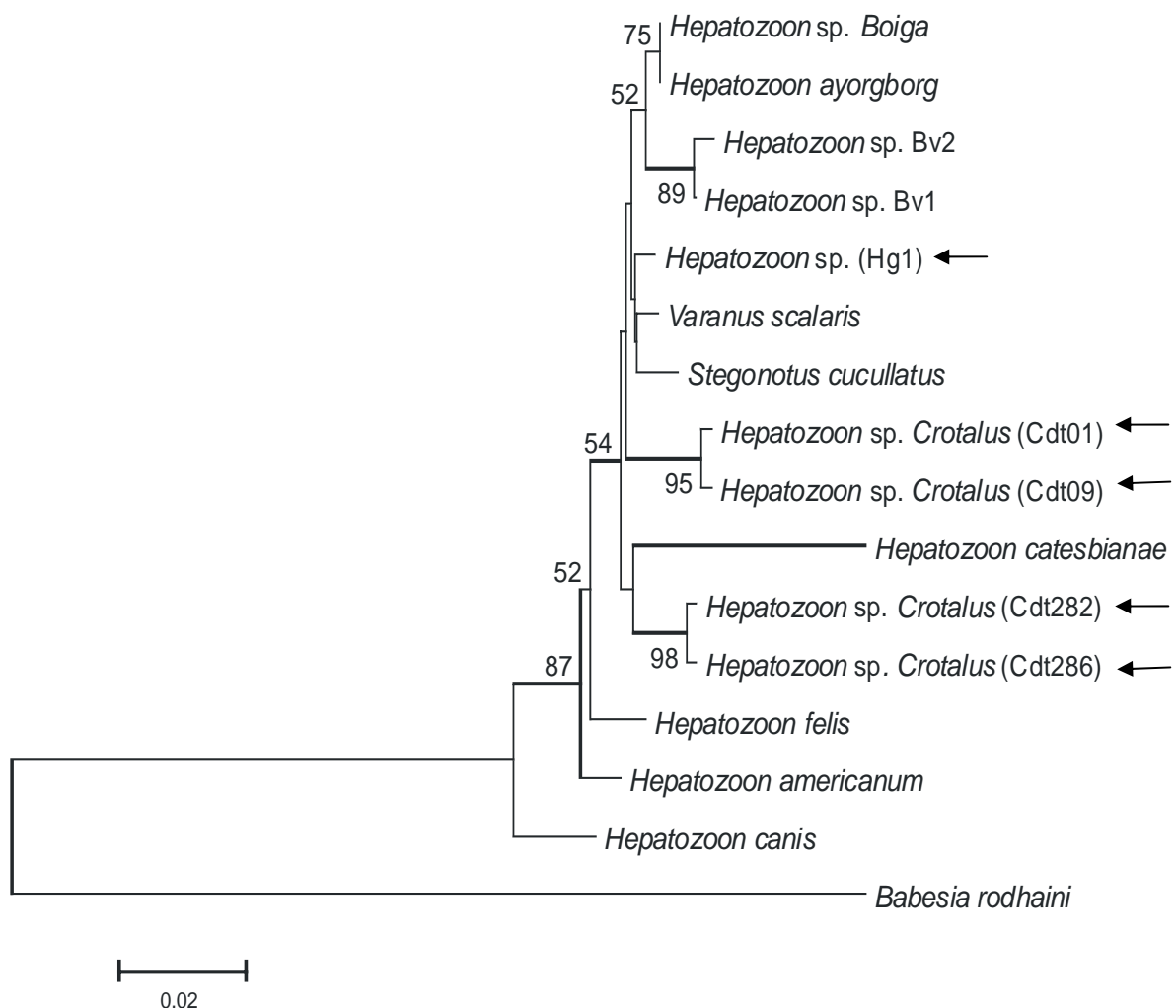


Figura 13. Árvore de Neighbor-Joining baseada no gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp. Números nos nós indicam valores de bootstrap sobre 1000 réplicas. Escala indica a distância evolucionária de 0.02 nucleotídeos por posição na sequência.

Tabela 4. Índices de identidade genômica de *Hepatozoon spp.* dos exemplares de *Crotalus durissus terrificus* Cdt01, Cdt09, Cdt282 e Cdt286 comparadas às diferentes espécies de *Hepatozoon* do GenBank.

Espécies	Cdt 01		Cdt 09		Cdt 282		Cdt 286	
	Identidade (%)	Gaps (%)	Identidade (%)	Gaps(%)	Identidade (%)	Gaps (%)	Identidade (%)	Gaps (%)
<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Varanus scalaris</i>	98 (320/326)	0 (0/326)	97 (319/326)	0 (0/326)	97 (318/327)	0 (0/327)	97 (318/327)	0 (0/327)
<i>Hepatozoon</i> sp.- <i>Boiga</i>	98 (320/326)	0 (0/326)	98 (321/326)	0 (0/326)	97 (320/327)	0 (0/327)	97 (320/327)	0 (0/327)
<i>Hepatozoon ayorgborg</i>	97 (319/326)	0 (0/326)	98 (320/326)	0 (0/326)	98 (321/327)	0 (0/327)	98 (321/327)	0 (0/327)
<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Stegonotus cucullatus</i>	97 (319/326)	0 (0/326)	97 (318/326)	0 (0/326)	97 (319/327)	0 (0/327)	97 (319/327)	0 (0/327)
<i>Hepatozoon</i> sp. BV1	97 (317/326)	0 (0/326)	96 (316/326)	0 (0/326)	96 (317/327)	0 (0/327)	96 (317/327)	0 (0/327)
<i>Hepatozoon</i> sp. BV2	96 (316/327)	0 (2/327)	96 (315/327)	0 (2/327)	96 (315/327)	0 (0/327)	96 (315/327)	0 (0/327)
<i>Hepatozoon felis</i> – Spain2	96 (314/326)	0 (3/326)	96 (315/326)	0 (3/326)	96 (316/326)	0 (3/326)	96 (316/326)	0 (3/326)
<i>Hepatozoon americanum</i>	96 (312/330)	1 (4/330)	94 (313/330)	1 (4/330)	95 (315/331)	1 (4/331)	95 (315/331)	1 (4/331)
<i>Hepatozoon catesbiana</i>	94 (311/330)	1 (6/330)	94 (311/330)	1 (6/330)	94 (311/329)	0 (2/329)	94 (311/329)	0 (2/329)
<i>Hepatozoon canis</i> – Venezuela2	93 (306/328)	2 (7/328)	93 (306/327)	1 (5/327)	94 (310/327)	0 (3/327)	94 (310/327)	0 (3/327)

Cdt = *Crotalus durissus terrificus*

Discussão

As serpentes da espécie *C. durissus terrificus* são parasitadas por, aparentemente, uma grande variedade de gamontes de *Hepatozoon* spp. Algumas serpentes apresentam até cinco gamontes morfológica e morfometricamente diferentes entre si (O'Dwyer et al., 2004). Em estudo anterior (Moço et al., 2002), foi levantada a hipótese de que, através de estudos morfológicos e morfométricos mais detalhados, pudéssemos separar espécies de *Hepatozoon* de serpentes. Contudo, os dados obtidos até aqui não nos permitiram chegar a uma conclusão.

Morfologicamente, os gamontes Cdt05A e Cdt09 são muito semelhantes entre si, porém, pela análise multivariada pudemos observar que os mesmos, apesar de agrupados próximos, aparentemente representam parasitas diferentes. Em relação à alteração induzida nas hemácias, Cdt09 alterou as hemácias em vários parâmetros, enquanto Cdt05A não. O'Dwyer et al. (2004) descreveram a ocorrência de uma pequena espécie de *Hepatozoon* em *C. durissus terrificus* cujo tamanho do parasita se assemelhou aos parasitas das duas serpentes estudadas ($8,1 \pm 0,5 \times 3,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ e área de $24,6 \pm 3,0 \mu\text{m}^2$). Porém, o núcleo do parasita descrito era mais largo e não condensado, diferente dos núcleos dos parasitas dos dois exemplares discutidos. Podemos conjecturar se uma mesma espécie de *Hepatozoon* poderia apresentar estas ligeiras diferenças de tamanho de acordo com o hospedeiro parasitado, e assim, os três parasitas — Cdt05A, Cdt09 e o encontrado por O'Dwyer et al. (2004) — seriam a mesma espécie, com pequenas diferenças morfológicas e morfométricas. Ball (1970) já sugeria que as formas sangüíneas de *Hepatozoon* poderiam variar de acordo com o hospedeiro.

Os gamontes Cdt07C e Cdt01E também são morfologicamente semelhantes entre si e ambos os parasitas alteraram vários parâmetros das hemácias parasitadas. Na análise multivariada, estes gamontes apresentaram-se bem separados, entretanto, alguns indivíduos se mesclaram entre as duas populações.

Outro parasita morfologicamente distinto é o Cdt5B, apesar de, morfometricamente, se colocar próximo aos Cdt01E e Cdt07C.

O parasita Cdt07D tem morfologia e morfometria diferentes dos demais e posicionou-se separado na análise multivariada.

Pelos resultados obtidos nesse trabalho, com relação à análise morfológica e morfométrica, podemos somente especular sobre a existência de mais de uma espécie de *Hepatozoon* em serpentes *C. durissus terrificus*. Parasitas semelhantes com morfometria diferente podem, ou não, representar espécies diferentes.

O estudo dos estágios esporogônicos de *Hepatozoon* spp. foi dificultado pelas sucessivas mortes dos mosquitos, por problemas na manutenção das colônias e pelas falhas nas infecções experimentais. Apesar de diversos autores terem tido sucesso na infecção experimental de mosquitos (Pessoa et al., 1974c; Wozniak & Telford, 1991; Smith, 1996), os resultados obtidos no presente estudo sugerem que culicídeos possam não ser os hospedeiros naturais desse protozoário. Ball et al. (1967) encontraram relação entre alta parasitemia e mortalidade dos mosquitos infectados. Wozniak & Telford (1991) também observaram alta mortalidade de mosquitos infectados e consideraram as hemogregarinas como patogênicas a estes dípteros.

Observamos que os estágios esporogônicos foram mais homogêneos em relação à sua morfologia, apesar das diferenças na morfometria. Este fato nos fez levantar alguns questionamentos. O primeiro deles é se realmente os tipos diferentes de gamontes representam espécies diferentes, já que os estágios esporogônicos e esquizogônicos são muito semelhantes (Pessoa et al., 1970a,b,c, 1971a,b, 1972, 1974a,b,c; Pessoa & De Biasi, 1973a,b, 1974), ou seriam estágios evolutivos diferentes de uma mesma espécie. Por outro lado, pode ser que os estágios esporogônicos de diferentes espécies de *Hepatozoon* não variem ou, algumas espécies teriam mosquitos como vetores e outras, não. Desser et al. (1995) afirmaram que os oocistos maduros de uma mesma espécie variam muito de tamanho e, portanto, suas medidas teriam pouco valor taxonômico.

Os oocistos observados estavam sempre livres na hemocele dos mosquitos, o que está de acordo com os achados de outros pesquisadores (Ball et al., 1967; De Biasi et al., 1972; Pessoa & De Biasi, 1973b). Contudo, esta localização pode variar. Desser et al. (1995) observaram o desenvolvimento dos oocistos no interior dos tubos de Malpighi, enquanto, Lainson et al. (2003) encontraram os oocistos na hemocele, mas, aderidos à parede do intestino. Entretanto, em ambos os estudos, foi observada uma não sincronia no desenvolvimento dos oocistos, fato também observado no presente estudo.

Com relação à caracterização molecular, a tentativa de utilização dos oligonucleotídeos internos HepF e HepR para amplificação do DNA das amostras Cdt05, Cdt07, Cdt01 e Cdt09, não foi bem sucedida, apesar de já terem sido utilizados, com sucesso, na amplificação de outras amostras de DNA de três serpentes naturalmente infectadas, dois exemplares de *C. durissus terrificus* (Cdt 282 e Cdt 286) e um de *H. gigas* (Rubini et al., 2005a), que foram incluídas neste estudo.

Um segundo par de oligonucleotídeos foi, então, utilizado na tentativa de amplificar as amostras de DNA extraídas: Piro A1 *forward* e Piro B *reverse*. Estes oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar DNA de *Babesia* spp. (Jefferies et al., 2003), mas, em estudos anteriores, verificamos que os mesmos também amplificavam DNA de *Hepatozoon* spp, sendo que para o primeiro parasita as bandas apresentaram 450 pb e para o segundo, aproximadamente 500 pb (Lopes, 2008). O motivo da falha na utilização dos primeiros oligonucleotídeos é, por hora, desconhecido, mas pode estar relacionado às diferenças genômicas entre as amostras.

Apesar do sucesso destes dois pares de oligonucleotídeos (HepF/HepR e PiroA1/PiroB) em detectar *Hepatozoon* spp. de serpentes, a caracterização molecular utilizando o fragmento amplificado pelos mesmos mostrou-se ineficiente em diferenciar as espécies destes parasitas.

A árvore filogenética obtida a partir da análise das seqüências do gene 18S de *Hepatozoon* spp. mostrou que espécies diferentes podem albergar parasitas geneticamente muito relacionados, mesmo que, morfologicamente, estes sejam distintos.

Ujvari et al. (2004) sugeriram que *Hepatozoon* spp. de serpentes são capazes de infectar hospedeiros de diferentes níveis taxonômicos. Smith (1996) já afirmava que 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*.

Pela árvore observa-se que os parasitas isolados das serpentes Cdt01 e Cdt09, apesar de serem distintas morfologicamente, são muito semelhantes entre si, pelo menos no que diz respeito ao fragmento analisado.

No caso das serpentes Cdt282, que apresentou um único tipo de gamonte, e Cdt286, que apresentava cinco tipos diferentes de gamontes, a situação é ainda mais complicada, pois suas seqüências são, praticamente, idênticas, mesmo com a variedade de formas encontradas em Cdt286.

Com relação a *H. gigas*, que também apresentava dois gamontes muito distintos, pelas análises do fragmento amplificado, possuiria apenas uma espécie de *Hepatozoon* (Rubini et al., 2005b).

Infelizmente, não foi possível realizar o sequenciamento dos parasitas das serpentes Cdt05 e Cdt07 para que pudessem ser comparados os dados de parasitas morfológicamente semelhantes. O fato de haver mais de um tipo de parasita em ambas as serpentes pode ter impossibilitado seus sequenciamentos. Posteriormente, a clonagem dessas amostras poderá, ou não, elucidar essa questão.

A caracterização molecular realizada poderia ter ajudado a elucidar nossas dúvidas. Entretanto, os resultados obtidos com esta técnica, assim como os obtidos com as caracterizações morfológica e morfométrica dos parasitas, não foram suficientes para a diferenciação das espécies.

Analisando todos os resultados, incluindo os exemplos acima citados, acreditamos que os mesmos venham reiterar a hipótese de que tal fragmento não é eficiente em apontar diferenças neste grupo de parasitas.

A pequena subunidade nuclear do gene RNA ribossômico foi extensamente utilizada para inferir as relações filogenéticas de uma diversidade de protozoários (Schlegel, 1991). Vários autores utilizaram o fragmento 18S rDNA para caracterizar espécies do gênero *Hepatozoon* e fazer inferências filogenéticas (Baneth et al., 2000; Inokuma et al., 2002; Rubini et al., 2005b).

Entretanto, Navajas et al. (1999) consideram as regiões codificantes do rDNA (18S, 5.8S e 28S), como muito conservadas, evoluindo muito lentamente na seqüência 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 14).



Figura 14. Subunidades do DNA ribossomal: 18S – 18S rDNA; 5.8S – 5.8S rDNA; 28S – 28S rDNA; ETS – Espaçador Interno Transcrito; ITS – Espaçador Interno Transcrito

Smith et al. (1999) estudaram as relações filogenéticas de espécies de *Hepatozoon* spp. de serpentes e sapos considerando sequências da região do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1), associados a estudos morfológicos e morfométricos. Os autores utilizaram os *primers* chamados ITS7 e ITS8 (já descritos anteriormente) que, para amostras de *Hepatozoon* spp. de serpentes, amplificaram um fragmento de 309 bp, consistindo de 34 nucleotídeos pertencentes à região 18S rRNA, 229 nucleotídeos pertencentes à região ITS1 e 46 nucleotídeos pertencentes à 5.8S rRNA.

Provavelmente, lançando mão de oligonucleotídeos que amplifiquem regiões menos conservadas do que as do 18S rRNA, como os utilizados por Smith et al. (1999), possamos distinguir melhor diferentes espécies de *Hepatozoon* de serpentes, tentando elucidar as questões filogenéticas e suprir a falta de estudos nessa área.

Agradecimentos

Este estudo recebeu suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo n° 2006/55830-4) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- BALL, G.H. Hemogregarine life cycles. Second Int. Cong. of Parasit. **J. Parasitol.**, v. 56, Sec. II (4) part 1, 17, 1970.
- BALL, H.G.; CHAO, J.; TELFORD JR, 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.
- 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.
- 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.
- BEUKEN, E.; VINK, C.; BRUGGEMAN, C. A. One-step procedure for screening recombinant plasmid by size. **Biotechniques**, v. 24, p. 748-750, 1998.
- CONSOLI, R.A.; OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1a. ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. p 225.
- DE BIASI, P., PESSOA, S.B., VIEIRA, F.C.G. Nota sobre longa latência de infecção por Hemogregarina em uma serpente peçonhenta: *Boothrops moojeni* Hoge, 1965. **Atas Soc. Biol.** Rio de Janeiro, v. 15, p.71-73, 1972.
- 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.
- 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.

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.

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

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 JR, 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.

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, p. 366-372, 2000.

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, p. 1169-1176, 2002.

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. 110-12, 2003.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; MADEIRA, N.G.; SILVA, R.J. *Hepatozoon* sp. from *Crotalus durissus terrificus*: Preliminary studies on the morphology of the gamonts and oocysts. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2002a.

O'DWYER, L.H.; MOÇO, T.C.; MADEIRA, N.G.; SILVA, R.J. *Hepatozoon terzii* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Boa constrictor amarali*: Description of the gamonts and preliminary studies on the sporogonic cycle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2002b.

LOPES, V.V. **Estudo parasitológico e molecular da infecção por *Babesia* spp. Em cães da área rural do Estado de São Paulo.** 2008. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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 oligonucleotídeos fail in the diagnosis of parasitic infection. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 982-984, 1999.

PESSOA S.B.; CAVALHEIRO J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. IX – Sobre a hemogregarina de *Helicops carinicauda* (Wied.). **Mem. Inst. Butantan**, v. 15, p. 161-168, 1969a.

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

PESSOA, S.B.; DE BIASI, P. Considerações taxonômicas 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. 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. Nota taxonômica 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* (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.

- RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; CAVALCANTE, G.G.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 97, p. 91-93, 2005 a.
- 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* (Serpente, Colubridae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERPETOLOGIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: Minas Gerais, 2005b.
- RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; PEREZ, R.R.; RIBOLLA, P.E.M.; O'DWYER, L.H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 168-171, 2006.
- SCHLEGEL, M. Protist evolution and phylogeny as discerned from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Eur. J. Parasitol.**, v.27, p.207-219, 1991.
- 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, 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 JR, 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 JR, 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 JR, 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 JR, 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.

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.

WOZNIAK, E.J.; TELFORD JR., 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. 25, p. 538-547, 1994.



Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

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

- 1- *Hepatozoon* spp. ocorre com frequência nas serpentes da região de Botucatu, São Paulo, Brasil.
- 2- Não há diferença na taxa de infecção entre os sexos e entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas.
- 3- Somente estudos morfométricos e morfológicos de gamontes não são suficientes na diferenciação de espécies de *Hepatozoon* de serpentes.
- 4- Os estágios esporogônicos de *Hepatozoon* spp. apresentam grande variação morfométrica, dificultando a separação de espécies.
- 5- A caracterização molecular utilizando-se fragmentos do gene 18S rDNA mostrou-se ineficiente na diferenciação de espécies de *Hepatozoon* de serpentes.