

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

PRISCILA RODRIGUES CALIL

**Protocolo de detecção molecular para identificação de *Hepatozoon* spp.  
em serpentes**

São Carlos  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

PRISCILA RODRIGUES CALIL

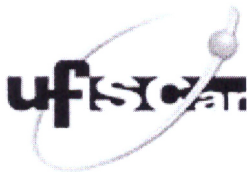
**Protocolo de detecção molecular para identificação de *Hepatozoon* spp.  
em serpentes**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Conservação da Fauna, para  
obtenção do título de mestre em  
Conservação da Fauna.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia  
Locosque Ramos.

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Carolina  
Romeiro Fernandes Chagas.

São Carlos  
2018



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Priscila Rodrigues Calil, realizada em 27/02/2018:



---

Profa. Dra. Patricia Locosque Ramos  
FPZSP



---

Profa. Dra. Kathleen Fernandes Grego  
Instituto Butantan



---

Prof. Dr. Vinícius de Avelar São Pedro  
UFSCar

Dedico esse trabalho aos meus pais Mari e Nege, que me apoiaram durante todos esses anos, e ao meu parceiro e namorado Hiago Araújo por todo apoio e companheirismo em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTO**

Sou grata a Dra. Patrícia Locosque Ramos por ter me proporcionado grande aprendizado, sempre se mostrando disposta a ajudar, com muita paciência, disposição, compreensão de minhas dificuldades e falta de prática e, sempre que possível, me acompanhar em todos os meus passos de perto e que também fez possível à experiência em San Diego.

A Dra. Carolina Chagas que com tempo e paciência passou parte de seu conhecimento para que esse trabalho fosse possível e por ter me acompanhado em toda essa caminhada, mesmo de longe. Com certeza levarei o exemplo de vocês para minha vida profissional e pessoal.

Agradeço também aos meus avós e tios que me acolherem e sempre estiveram comigo, me acompanhando e me dando apoio em todos os momentos.

A todos os meus amigos de Uberlândia que, mesmo distantes sempre estiveram comigo, me fazendo rir e me incentivando a fazer o meu melhor.

Aos amigos do mestrado por todos os momentos que passamos juntos e pelo apoio que demos uns aos outros durante essa jornada.

Aos meus amigos do tango, em especial ao Daniel Marquez e a Romina Toloza por permitirem que eu continuasse dançando, sendo uma válvula de escape por muitos momentos, me dando apoio e sempre preocupados comigo.

As amigadas que fiz no laboratório nesses dois últimos anos, em especial a Bárbara Rodrigues por todos os momentos de diversões, apoio e aprendizado e por ter sido como uma irmã nesse tempo.

A UFSCar e a Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela oportunidade de me especializar nessa área tão linda que é a conservação e de realizar esse projeto.

Também gostaria de agradecer a todos os envolvidos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Instituto Butantan que me ajudaram durante as colheitas e desenvolvimento do projeto.

Ao Giuseppe Puerto, diretor do museu do Instituto Butantan, pela disposição e oportunidade dessa parceria.

Agradeço a bióloga Mara Marques que foi de extrema importância para que eu pudesse ter a experiência no Institute for Conservation Research no San Diego Zoo.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a toda equipe do Institute for Conservation Research – San Diego Zoo por abrirem as portas e darem essa oportunidade de intercâmbio, por todas as trocas de conhecimento e disposição para me ensinar um pouco o lindo trabalho que fazem para conservação.

**“A ciência nunca resolve  
um problema sem criar  
pelo menos outros dez”.  
(George Bernard Shaw)**

## RESUMO

O gênero *Hepatozoon* representa um dos seis gêneros do grupo das hemogregarinas, porém todos são semelhantes morfológicamente e possuem ciclo heteroxênico (Smith,1996). Alguns estudos em serpentes indicaram efeitos diversos no hospedeiro, desde leve influência no fitness até efeitos severos na taxa de crescimento, reprodução e sobrevivência dos filhotes (Madsen et al., 2005; Brown et al., 2006). O diagnóstico e identificação são realizados através da visualização do parasita em esfregaços sanguíneos, porém os resultados podem não ser confiáveis em casos negativos. Com base nisso, o presente trabalho estabeleceu um protocolo adaptado de diagnóstico molecular de *Hepatozoon* spp. para ser aplicado como método complementar em rotinas diagnósticas do Laboratório de Análises Clínicas na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. O estudo foi realizado com 117 indivíduos de 32 espécies. Técnicas de microscopia e biologia molecular foram utilizadas para identificação desse parasita. As análises microscópicas apresentaram positividade de 13,6%. O primeiro par de primer utilizado, que amplifica o gene 18S, obteve uma positividade de 6,3% e o segundo par de primer que amplifica o “target” Apicoplasto, foi utilizado nas amostras positivas na microscopia, obteve 93,33% de positivos. Após sequenciamento, as análises filogenéticas apresentam cinco agrupamentos para a árvore filogenética do gene 18S e cinco agrupamentos para o “target” Apicoplasto. Estudos com *Hepatozoon* spp. ainda são escassos e limitados, principalmente com serpentes e de seus reais impactos no hospedeiro, assim estudos de diagnóstico se mostram essenciais para a conservação das espécies, principalmente *ex situ*.

Palavras-chave: *Hepatozoon*, PCR, Cativeiro, Répteis, Hemoparasitas.



## ABSTRACT

The genus *Hepatozoon* represents one of six genera in hemogregarine group, sharing a similar morphology and heteroxenus life cycle (Smith,1996). Some studies in snakes indicated effects in the host, since light influence on fitness to severe effects on the growth, reproduction and offspring survival rates (Madsen et al., 2005; Brown et al., 2006). The diagnosis and identification are usually through blood smears analysis and parasite visualization; however, these results cannot be reliable in negative cases. Based on this, this study established an adapted molecular protocol to identify *Hepatozoon* spp., to be used as complementary test at diagnosis routine of Clinical Analyses Laboratory at São Paulo Zoological Park Foundation. The study was conducted with 117 individuals of 32 species. Microscopy and molecular techniques were used to identify the parasite. Microscopical analyses showed 13.6% of positivity. The first pair of primers, used to amplify 18S gene, show a positivity of 6.3% and the second pair of primer that amplifies the Apicoplast target, was used in the positive samples under microscopy and shows 93.33% of positivity. After sequencing, philogenetics analyses show five clusters for 18S gene and five clusters for Apicoplast target. Studies involving *Hepatozoon* spp. are still scarce and limited, mainly with snakes and their actual impacts on the host, so diagnostic studies are essential for the wildlife conservation, especially *Ex Situ*.

Keywords: *Hepatozoon*, PCR, Captive, Reptiles, Hemoparasites.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esquema da morfologia geral do filo Apicomplexa .....
- Figura 2- Gamonte extracelular em *Corallus hortulanus* .....
- Figura 3- Alterações que podem ser encontradas nos eritrócitos infectados .....
- Figura 4- Ciclo do *Hepatozoon* spp. em serpentes .....
- Figura 5- Localização da Fundação Parque Zoológico de São Paulo .....
- Figura 6- Colheita de sangue por punção da veia caudal .....
- Figura 7- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Spilotes pullatus* .....
- Figura 8- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Spilotes pullatus* .....
- Figura 9- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Epicrates cenchria* .....
- Figura 10- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Boa constrictor* .....
- Figura 11- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Tupinambis merianae* .....
- Figura 12- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Bothrops jararaca* .....
- Figura 13- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo obtido de *Bothrops jararaca* .....
- Figura 14- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo obtido de *Crotalus durissus terrificus* .....
- Figura 15- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Corallus hortulanus* .....
- Figura 16- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Boa constrictor constrictor* .....
- Figura 17- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Chironius flavolineatus* .....
- Figura 18- Eletroforese em gel utilizando os primers HepF300/HepR900 .....
- Figura 19- Eletroforese em gel utilizando os primers APC1/APC2 .....
- Figura 20- Topologia filogenética obtida para gene 18S .....
- Figura 21- Topologia filogenética obtida para “target” Apicoplasto .....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Indivíduos amostrados nesse estudo .....	
Tabela 2- Espécies amostradas nesse estudo .....	
Tabela 3- Primers utilizados nesse estudo .....	
Tabela 4- Comparação de protocolos da literatura para os primers escolhidos .....	
Tabela 5- Indivíduos positivos para <i>Hepatozoon</i> spp. na microscopia .....	
Tabela 6- Descrição morfológica .....	
Tabela 7- Protocolo molecular final utilizado nesse estudo .....	
Tabela 8- Programa de ciclagem utilizado para o novo protocolo .....	
Tabela 9- Amostras positivas na PCR .....	

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CIENTEC – Parque de Ciência e Tecnologia

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DPA – Departamento de Pesquisas Aplicadas

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

FPZSP – Fundação Parque Zoológico de São Paulo

IB – Instituto Butantan

IUCN – International Union for Conservation of Nature

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

Pb – Pares de base

PCR – Polymerase Chain Reaction

P.E.F.I – Parque Estadual das Fontes do Ipiranga

rRNA – Ácido ribonucléico ribossomal

s – segundos

UV – Ultravioleta

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 As serpentes</b> .....	14
<b>1.2 Parasitas</b> .....	15
1.2.1 Doenças parasitárias e cativoiro .....	16
<b>1.3 Filo Apicomplexa</b> .....	17
<b>1.4 Haemogregarinidae</b> .....	18
<b>1.5 <i>Hepatozoon</i> spp.</b> .....	19
1.5.1 Ciclo.....	21
<b>1.6 Diagnóstico</b> .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 Local de estudo .....	26
3.1.1 Fundação Parque Zoológico de São Paulo .....	26
3.1.2 Instituto Butantan .....	27
3.2 Colheita de sangue e microscopia.....	27
3.3 Testes moleculares.....	31
3.3.1 Extração do DNA genômico .....	31
3.3.2 Seleção dos primers (iniciadores) .....	32
3.3.3 Amplificação do gene 18S rRNA .....	33
3.4 Reação de Sequenciamento do gene 18S rRNA.....	35
3.5 Análises Filogenéticas .....	36
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	37
4.1 Microscopia.....	37
4.1.1 Perfil dos indivíduos amostrados .....	37
4.2 Testes moleculares.....	35
4.2.1 Padronização da reação de PCR .....	35
4.4 Parasitas e conservação das espécies.....	46
4.4.1 Importância do estudo de <i>Hepatozoon</i> spp. para conservação .....	47
<b>5. Conclusões</b> .....	48
<b>6. Considerações finais</b> .....	48
<b>7.Referências</b> .....	48

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 As serpentes

A classe Reptilia (do latim *repto*: rastejar) é formada por 10.450 espécies conhecidas no mundo (Reptile database, 2016) sendo que 773 são encontradas no Brasil (Costa e Bérnils, 2015). A classe é dividida em quatro ordens: Testudines, Squamata, Rhynchocephalia e Crocodylia (Bérnils e Costa, 2011). Composto por 6.263 espécies de lagartos, 3.619 espécies de serpentes e 196 espécies de anfisbênios (Reptile database, 2016), os Squamatas representam um clado diverso morfológica e ecologicamente, com um rico registro fóssil, tornando-o muito atrativo para estudos evolutivos (Conrad, 2008). Com apenas 45% das espécies descritas desse grupo avaliadas pela Lista Vermelha de espécies ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2017), os répteis possuem um papel fundamental no ecossistema, atuando como presas, predadores, dispersores de sementes e ainda como espécies comensais; podem ser considerados ótimos bioindicadores de saúde ambiental, e, como muitas vezes possuem micro habitats específicos, suas associações podem ser ideais para estudos de especiação (Raxworthy et al., 2008).

As serpentes são animais peclotérmicos e ápodes encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo que a maioria das espécies é encontrada nas regiões tropicais. Possuem uma grande diversidade adaptativa envolvendo diferentes hábitos locomotores e de forrageamento, sendo que sua atividade é influenciada pela época do ano e temperatura (Chaves et al., 2015). A variação de tamanho, desde espécies escavadoras diminutas, que se alimentam de cupins e crescem até 10 centímetros, até grandes constritoras, com quase 10 metros de comprimento (Pough et al., 2008), permite que esse táxon ocupe uma grande variedade de habitats entre ambientes aquáticos até o dossel da vegetação, conferindo às serpentes um importante papel ecológico, principalmente na teia alimentar onde ocupa vários nichos diferentes, chegando ao topo de cadeia em alguns locais (Campbell e Campbell, 2001; Brischoux et al., 2007; Nowak et al., 2008).

Como atua em diferentes nichos ecológicos, o grupo é bem suscetível a alterações ambientais e bioacumulação de contaminantes (Campbell e Campbell, 2001). Também é importante destacar que além de seu papel ecológico, o veneno produzido pelas serpentes tem sido alvo de pesquisas pelas suas propriedades medicinais e aplicações biotecnológicas, como o medicamento Captopril que é utilizado para controle de hipertensão e é produzido a partir de peptídeos isolados de *Bothrops jararaca* (Cushman e Ondetti, 1991)

O veneno das serpentes pode conter centenas de proteínas, peptídeos, enzimas e neurotoxinas que podem atuar como anticoagulantes, bloqueadores pré e pós-sinápticos, entre outros efeitos, sendo a base de novas drogas e tratamentos, como por exemplo, tratamento contra câncer e dor baseado em um componente do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Calvete et al., 2007; Escoubas e King, 2009; Vetter et al., 2011; Warrell, 2012; Utkin, 2015).

## **1.2 Parasitas**

O termo parasita é usado tanto para macro quanto para microparasitas (Gómez e Nichols, 2013). São organismos que vivem em associação permanente com outro indivíduo e que se alimentam de recursos ou se beneficiam da proteção disponibilizada por seu hospedeiro (Lane e Mader, 1996). A perda parcial de um ou mais sistemas metabólicos e da capacidade de utilizar outra fonte nutricional no meio ambiente externo, em todo seu ciclo de vida ou em parte dele, faz com que o parasita se instale em seu hospedeiro e dependa da sobrevivência deste (Gazzinelli, 2016), permitindo que tenham uma relação bioquímica íntima (Schmidt e Roberts, 2009). Podem ser bem adaptados ao seu hospedeiro e causarem pouco ou nenhum dano, porém, em outros casos podem ser ter alta patogenicidade quando o hospedeiro apresenta comprometimento do sistema imune, ou em animais jovens, em que esse sistema imune ainda não está formado (Begon et al., 2007).

Os estudos com parasitas permitem descobertas sobre a evolução do hospedeiro, biogeografia e ainda a identificação da origem desse hospedeiro (Harris et al., 2013). Estudos de relações parasita-hospedeiro buscam compreender como esses dois seres interagem ao longo do tempo (Morand e

Krasnov, 2010). Além disso, os parasitas desempenham um papel fundamental na promoção da biodiversidade como indicadores de produtividade e resiliência dos ecossistemas (Hudson et al., 2006; Hatcher et al., 2012), sendo reconhecidos como fatores fundamentais que impulsionam a dinâmica das populações, através do seu impacto na fecundidade e sobrevivência do hospedeiro, alguns parasitas são capazes de regular populações de hospedeiros causando flutuações cíclicas (Albon et al., 2002). Eles promovem fortes pressões seletivas para a diversidade genética do hospedeiro, influenciando diretamente na estrutura e a diversidade das comunidades e ecossistemas (Altizer et al., 2003).

### 1.2.1 Doenças parasitárias e cativeiro

Sabe-se que, em animais de vida livre, a relação parasita-hospedeiro, na maioria das vezes, está equilibrada, porém quando se trata de cativeiro, a restrição de espaço e a alta densidade populacional podem promover um aumento na concentração de parasitas (Lane e Mader, 1996; Primarck, 2001) e, com esse aumento, um parasita que antes não causaria nenhuma doença, pode ser capaz de desencadear uma enfermidade.

Outro fator extremamente importante, mas pouco lembrado quando se trata de animais cativos, é que as espécies estão em contato próximo com outras que em seu habitat natural não ocorreria, gerando a alta probabilidade de transmissão de doenças e parasitas exóticos entre elas (Primarck, 2001; Panayotova-Pencheva, 2013). O surgimento ou aumento da incidência de doenças parasitárias em cativeiro também pode estar diretamente relacionado ao bem-estar animal, uma vez que podem estar ligadas ao estresse e má nutrição, que causam baixa imunidade deixando os animais suscetíveis a doenças. A higienização dos recintos também está relacionada diretamente com a concentração de parasitas no ambiente (Lane e Mader, 1996; Pasmans et al., 2008; Panayotova-Pencheva, 2013).



### 1.3 Filo Apicomplexa

Os parasitas desse grupo são responsáveis por uma variedade de doenças que pode atingir humanos, animais domésticos e silvestres (Roberts et al., 2009; Lim e McFadden, 2010). O filo Apicomplexa (Figura 1) possui cerca de cinco mil espécies de endoparasitas que possuem como característica principal a presença de três fases de replicação no ciclo e uma organela, observável apenas através de microscopia eletrônica, chamada complexo apical ou apicoplasto (Levine, 1985; Siddal, 1995).

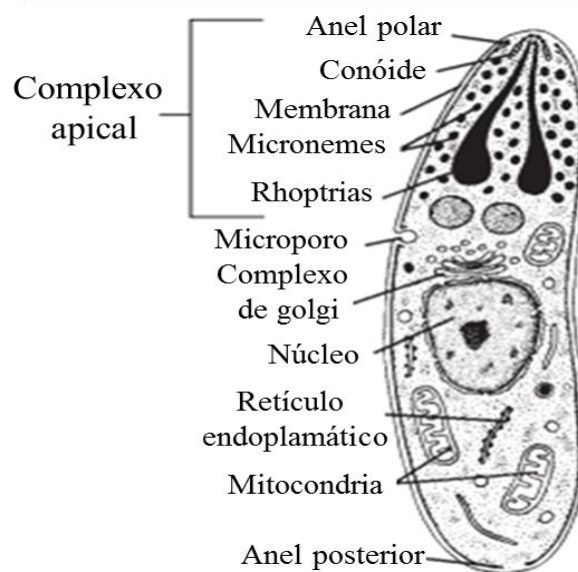


Figura 1 - Esquema da morfologia geral do filo Apicomplexa (Roberts et al., 2009).

O apicoplasto é um plastídio vestigial, com origem na endossimbiose de cianobactérias (Lim e McFadden, 2010). Essa organela possui um complexo de estruturas que permite ao parasita penetrar e se estabelecer na célula hospedeira, tendo um papel crucial na interação parasita-hospedeiro, além de desempenhar funções metabólicas diferentes em cada táxon dentro do grupo (Lim e McFadden, 2010; Ralph et al., 2004). Apesar de ser uma característica do filo, estudos apontam que essa organela foi perdida ao longo dos anos nas gregarinas e *Cryptosporidium* (Toso e Omoto, 2007; Zhu et al., 2000).

As principais subclasses de endoparasitas do filo Apicomplexa (Gregarinidina, Coccidia, Cryptosporidiidae, Haemosporida e Piroplasmida)

(Barta et al., 2012), se diferenciam pelo tipo de hospedeiro, ciclo e vetor (Morrison, 2008). As gregarinias apresentam um ciclo de vida monoxênico, infectando o trato digestivo, espaços celomáticos e as vesículas reprodutivas de invertebrados terrestres, aquáticos e marinhos (Levine et al., 1980, Rueckert et al., 2013). Cryptosporidiidae também possuem ciclo monoxênico, porém são capazes de infectar o epitélio intestinal de todos os grupos de vertebrados (Roberts et al., 2009; Rueckert et al., 2013).

Os Haemosporida e Piroplasmida são parasitas que possuem ciclo heteroxênico infectando invertebrados hematófagos que atuam como vetores, os vertebrados atuam como hospedeiros intermediários, sendo que os hemosporídeos são caracterizados pela produção de um pigmento chamado hemozoína, em alguns gêneros (Roberts et al., 2009). Parasitas da subclasse Coccidia podem apresentar tanto ciclo monoxênico como heteroxênico, infectando hospedeiros invertebrados hematófagos e vertebrados, podem ser encontrados nos tecidos, sangue e trato gastrointestinal (Queirós, 2012).

A ordem Eucoccidia será descrita a seguir, por ser alvo deste estudo.

#### **1.4 Haemogregarinidae**

As chamadas hemogregarinas são um grupo de parasitas encontrados nos leucócitos e eritrócitos dos hospedeiros vertebrados, pertencentes à ordem Eucoccidia (Davies e Johnston, 2000, Barta et al., 2012), sendo divididos em duas subordens: Eimeriina e Adeleina (Levine et al., 1980). Os membros de Eimeriina possuem em seu ciclo de vida no hospedeiro vertebrado três fases: merogonia, gametogonia e esporogonia; enquanto que o hospedeiro invertebrado atua somente como vetor (Telford, 1984). Adeleina apresenta apenas a merogonia no hospedeiro vertebrado, enquanto a gametogonia e a esporogonia ocorrem no hospedeiro invertebrado (Lane e Mader, 1996).

Organismos pertencentes à subordem Adeleina são caracterizados por realizarem parte do ciclo em diversos órgãos, como fígado, baço e pulmão, e, pelo desenvolvimento dos macro e microgametas simultaneamente dentro das células do hospedeiro vertebrado (Davies, 1995). Essa subordem é dividida em três famílias e seis gêneros, das quais são muito semelhantes

morfologicamente na fase sanguínea e difere apenas nas fases do ciclo no vetor, tipo de hospedeiro e localidade, o que faz com que a taxonomia desse grupo seja um desafio (Siddall, 1995; Smith, 1996; Telford, 2009).

A família Haemogregarinidae engloba os gêneros *Haemogregarina*, *Desseria* e *Cyrlia*. A família Karyolysidae é composta pelos gêneros *Karyolysus* e *Hemolivia*. E o único representante da família Hepatozoidae é o gênero *Hepatozoon* (Barta, 1989; Siddall, 1995).

Os gêneros *Cyrlia* e *Desseria* são conhecidos como parasitas exclusivos de peixes e são transmitidos por sanguessugas (Siddall, 1995; Magro et al., 2015). *Haemogregarina* é encontrada no ambiente aquático, onde é transmitida por sanguessuga e infecta peixes e tartarugas; e no ambiente terrestre, onde os vetores são mosquitos e carrapatos, e infectando cágados e anfíbios (Siddall, 1995; Karadjian et al., 2015). O gênero *Hemolivia* possui três espécies descritas infectando anfíbios e cágados sendo transmitido por carrapatos, é o único gênero deste grupo capaz de realizar merogonia intraeritrocitária (Kvičerová et al., 2014). *Karyolysus* tem como único vetor o ácaro *Ophionyssus* sp. e foi descrito em lagartos na Europa e na Ásia (Hassi, 2012).

### **1.5 *Hepatozoon* spp.**

O gênero *Hepatozoon* pertence ao grupo das Haemogregarinidae. Após ser descrito pela primeira vez por Miller (1908) em leucócitos de ratos, esse parasita também já foi identificado em aves (Hoare, 1924; Kruszewicz e Dyrz, 2000; Peirce, 2005; Barraclough et al., 2008; Valkiūnas et al., 2016), anfíbios (Desser et al., 1995; Smith et al., 2000; Boulianne et al., 2007; Shutler et al., 2009; Dickson et al., 2013; Leveille et al., 2014) e répteis (Hoare, 1932; Robin, 1936; Ball et al., 1967; Michel, 1973; Boulianne et al., 2007; Leal et al., 2014; Netherlands et al., 2014a,b).

Por apresentar semelhança morfológica com outros gêneros de hemogregarinas, alguns autores sugerem que quando encontrados em répteis e aves, esses parasitas sejam tratados como sendo do gênero *Hepatozoon* (Siddall, 1995; Telford, 2009). Apesar disso, de acordo com Campbell (1996), répteis aquáticos são principalmente infectados por parasitas do gênero

*Haemogregarina* e lagartos do velho mundo e serpentes arborícolas, pelo gênero *Karyolysus*, por isso é essencial realizar estudos moleculares para evitar erros de identificação com base na morfologia.

A fase de gamonte é encontrada nos eritrócitos, caracterizada por apresentar uma forma elíptica ou de “banana” (Telford, 2009), estendendo-se pelo comprimento da célula hospedeira e apresentando citoplasma uniforme com núcleo condensado, quando maduro. Algumas vezes, os gamontes podem ser visualizados extracelularmente, nesses casos o parasita apresenta formato mais alongado (Figura 2) (Telford, 2009). O dimorfismo sexual nos gamontes maduros ainda não é bem conhecido, contudo, algumas espécies já foram descritas apresentando diferenças de coloração do citoplasma, na qual alguns parasitas apresentam coloração mais intensa e escura enquanto que outros possuem coloração mais clara, o que poderia ser um indicativo dessa diferenciação (Telford, 2009).

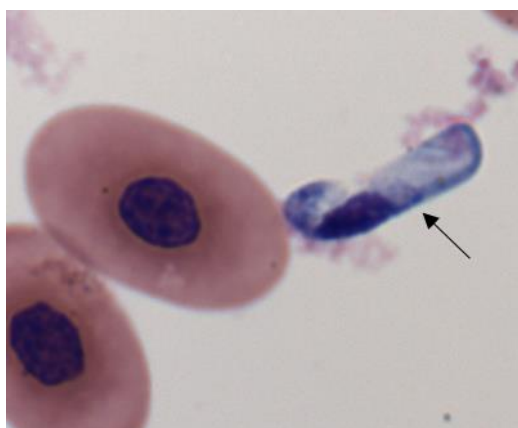


Figura 2 - Gamonte extracelular em *Corallus hortulanus*.

Encontrado nas células do fígado, baço e pulmão, *Hepatozoon* sp. pode causar hipertrofia eritrocitária e deslocamento do núcleo para a borda da célula infectada, afetando a sua capacidade de carrear oxigênio, essas alterações promovem a liberação compensatória de glóbulos vermelhos imaturos na circulação sanguínea, sendo que algumas espécies causam o rompimento do eritrócito infectado e, outras, ainda podem provocar a perda de hemoglobina da célula (Figura 3) (Telford, 2009; Brown et al., 2006). Estudos com serpentes indicam efeitos diversos no hospedeiro, desde leves influências no fitness a

efeitos severos na taxa de crescimento, reprodução e sobrevivência dos filhotes (Madsen et al., 2005; Brown et al., 2006).

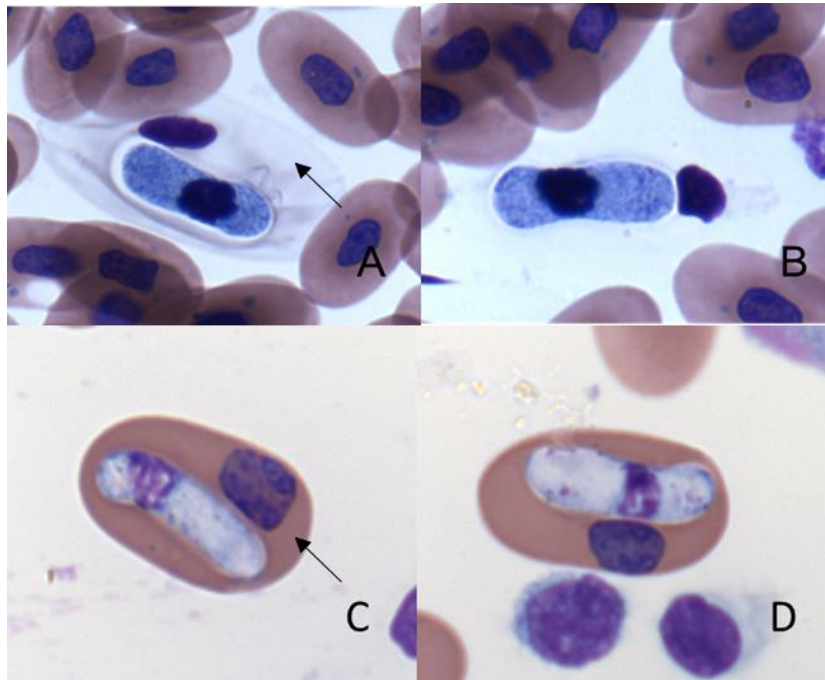


Figura 3 – Algumas alterações que podem ser encontradas nos eritrócitos infectados. A e B: Perda de hemoglobina em *Epicrates cenchria* e *Bothrops jararaca*, respectivamente; C e D: Deslocamento do núcleo para a borda da célula em *Corallus hortulanus*.

### 1.5.1 Ciclo

Devido à grande variedade de vetores e hospedeiros, o ciclo de vida de *Hepatozoon* spp. ainda não é bem conhecido, apresentando algumas divergências dependendo da classe do hospedeiro. Os hospedeiros definitivos são restritos a duas classes de hematófagos (Insecta e Arthropoda), sendo encontrado em cinco ordens de Insecta e uma de Arachnida. Os vetores mais comuns estão dentro das ordens Diptera (Insecta) e Ixodida (Arachnida) (Smith,1996). Com pouco mais de 120 espécies descritas morfológicamente infectando serpentes, esse parasita apresenta como principais vetores, os mosquitos *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*, e uma distribuição cosmopolita (Smith,1996; Telford,1984). Com base na literatura, o ciclo é apresentado abaixo de acordo com o que é considerada uma infecção natural (Figura 4).

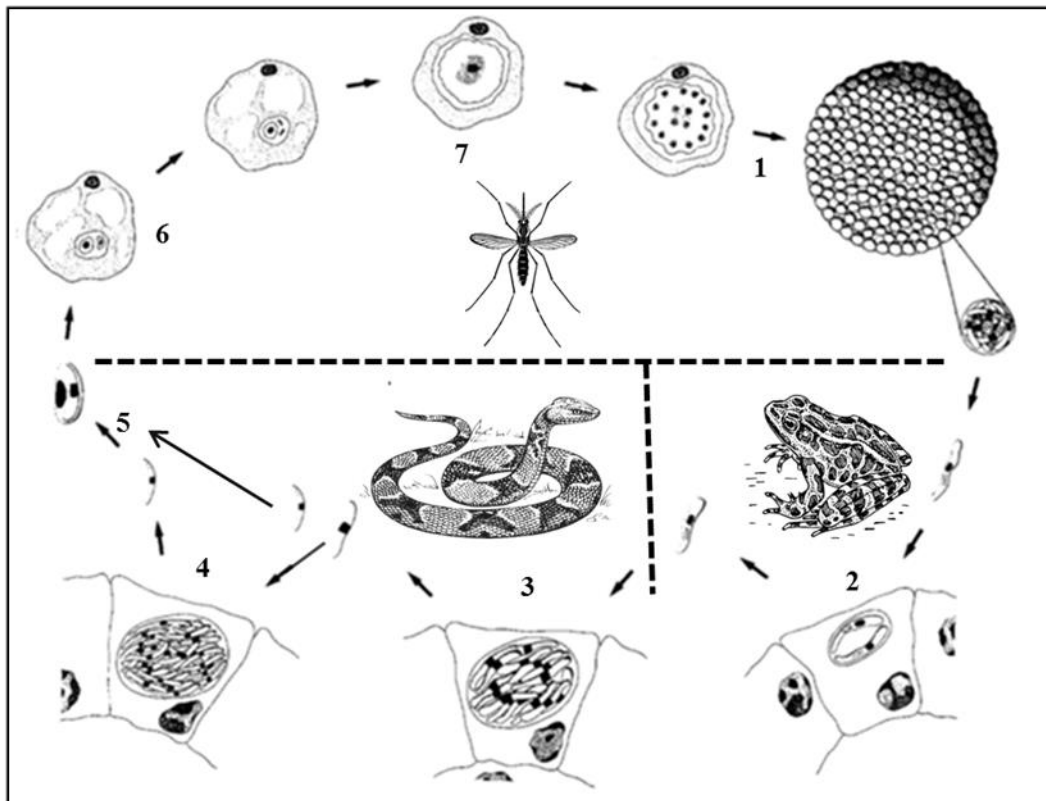


Figura 4- Ciclo do *Hepatozoon* spp. em serpentes adaptado de Smith et al., 1994. 1- Esporogonia; 2- Desenvolvimento dos esporocistos; 3- Primeira merogonia; 4- Segunda merogonia; 5- Invasão do eritrócito; 6- Gametogonia; 7- Fertilização.

O mosquito é o vetor mais comum dentro do ciclo de *Hepatozoon* em répteis (Sloboda et al., 2007). No hospedeiro invertebrado é possível observar a esporogonia na hemocele, formando-se os oocistos que abrigam os esporocistos, a quantidade de esporocistos produzidos varia de acordo com a espécie do parasita (Smith,1996). A transmissão para o primeiro hospedeiro vertebrado ocorre quando o vetor é ingerido (Smith et al.,1999, Dickson, 2013), observa-se desta forma o desenvolvimento dos esporocistos nas células hepáticas e pulmonares, formando os cistos (Smith et al.,1999). O parasita é transmitido ao segundo hospedeiro intermediário por predação.

Nas serpentes o cisto se aloja em vários órgãos e realiza a primeira merogonia pela qual são formados macro e micromerontes. O macromeronte se transforma em macromerozoíto e invade outras células teciduais, realizando uma segunda merogonia. Os micromerontes se transformam em micromerozoítos que, por sua vez, entram na corrente sanguínea e invadem os eritrócitos, onde se tornam gamontes. Esses gamontes retornam ao vetor durante o repasto sanguíneo e realizam a reprodução sexuada formando novos

cistos (Smith et al.,1999; Baneth, 2007; Borges et al, 2015; Kauffman et al., 2017).

No ciclo de vida do parasita nas serpentes, os hospedeiros intermediários são, geralmente, lagartos, sapos e ratos, mas também é possível que seja transmitido por algum hospedeiro paratênico, promovendo uma via de contaminação presa-predador (Smith,1996; Allen et al., 2011). Além dessa via, é possível que ocorra infecção direta da serpente através da realização de repasto sanguíneo por um vetor infectado, uma vez que foram encontrados oocistos de *Hepatozoon* sp. na glândula salivar de mosquitos (Telford et al., 2008). Apesar disso, somente infecções experimentais foram capazes de demonstrar a transmissão por essa via, não havendo comprovação de que ela ocorra naturalmente na natureza (Telford et al.,2008, Tomé et al.,2014).

Uma segunda forma de transmissão do parasita é a congênita (Kauffman et al.,2017). Lowichik e Yaeger, em 1987, apresentaram um caso em que um exemplar de *Nerodia fasciata*, uma serpente ovovivípara, foi infectada experimentalmente, sendo que todos os 12 filhotes da ninhada foram positivos para *Hepatozoon* sp. logo no primeiro dia de vida, este fato foi corroborado com *Hepatozoon canis* (Forlano et al., 2007) e em estudos recentes com *Thamnophis elegans* (Kauffman et al., 2017).

## **1.6 Diagnóstico**

Embora parasitas do gênero *Hepatozoon* sejam comumente encontrados em serpentes (Santos et.al., 2005), existem poucos estudos sobre a infecção em animais silvestres, principalmente em cativeiro (Calil et al., 2017). O diagnóstico e identificação desses hemoparasitas são, geralmente, realizados através da visualização do parasita em esfregaços sanguíneos (Telford, 1984; Elias e Homans, 1988; Chiarelli, 2009), apesar de amplamente utilizado, os resultados obtidos podem gerar resultados falso-negativos em casos de baixas parasitemias (Karagenc et al., 2006), além disso há grande semelhança morfológicas entre os diferentes gêneros de Haemogregarina, podendo ocorrer alguma identificação errônea quando somente essa técnica é

utilizada (Telford, 1984). Apesar da identificação morfológica ser a mais utilizada até hoje, muitos autores não recomendam essa prática, pois o parasita pode sofrer deformações junto com a célula infectada no momento da realização do esfregaço e do protocolo de coloração utilizado, interferindo nos parâmetros (Krogstad et al., 1991; Hassi, 2012). Com base nessa informação, o presente estudo estabeleceu protocolo de diagnóstico molecular de *Hepatozoon* spp. para ser aplicado nas serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e do Instituto Butantan (IB) com inclusão de novos exemplares.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Estabelecer protocolo molecular para identificação de *Hepatozoon* spp. nas serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Instituto Butantan.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar as serpentes infectadas com *Hepatozoon* spp. pertencentes a Fundação Parque Zoológico de São Paulo e ao Instituto Butantan, por meio de microscopia óptica;
- Selecionar primers específicos para a técnica de PCR no diagnóstico de *Hepatozoon* spp.;
- Identificar os exemplares de serpentes infectadas com *Hepatozoon* spp. da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Instituto Butantan, através da técnica de PCR;
- Realizar análise filogenética das sequências obtidas das amostras positivas na PCR.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de estudo

##### 3.1.1 Fundação Parque Zoológico de São Paulo

A Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), criada em 1957, está inserida no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (P.E.F.I.), também conhecido como Parque do Estado (Figura 5), onde estão também localizados o Jardim Botânico e o Parque de Ciência e Tecnologia (CIENTEC) da Universidade de São Paulo (FPZSP, 2017).

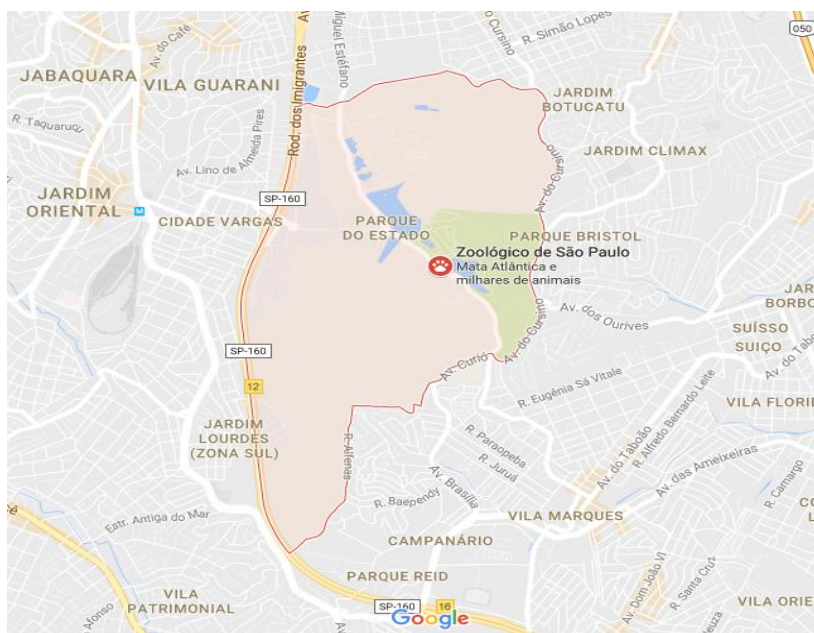


Figura 5 – Localização da Fundação Parque Zoológico de São Paulo no Parque Estadual Fontes do Ipiranga

O PEFI é um dos mais importantes remanescentes de Mata Atlântica na cidade de São Paulo, abrigando as nascentes do Riacho do Ipiranga e centenas de espécies da fauna nativa. Com uma área de aproximadamente 900.000 m<sup>2</sup>, a FPZSP além de abrigar as espécies nativas pertencentes à mata, mantém um plantel com cerca de 3.000 animais, entre mamíferos, aves, répteis, anfíbios e invertebrados (FPZSP, 2017).

### 3.1.2 Instituto Butantan

Em 1899, o Instituto Butantan foi criado com o objetivo de produzir o soro antipestoso, após um surto de peste bubônica, porém só foi reconhecido como instituição em 1901 (IB, 2017). O IB é o principal produtor de imunobiológicos do Brasil, sendo responsável por grande porcentagem da produção nacional de soros hiperimunes e antiofídicos, e de antígenos vacinais (IB, 2017). Desenvolve projetos de pesquisas básica e aplicada com animais peçonhentos, patógenos, inovação e modernização dos processos de produção e controle de imunobiológicos, além de estudos clínicos, terapêuticos e epidemiológicos relacionados a acidentes causados por animais peçonhentos (IB, 2017).

### 3.2 Colheita de sangue e microscopia

Entre Outubro de 2016 e Abril de 2017 foram colhidas amostras sanguíneas de 117 indivíduos (Tabela 1) de 32 espécies (Tabela 2), sendo que quatro não pertencem ao grupo das serpentes (três lagartos e um cágado), essas amostras foram incorporadas aos testes na fase de padronização da extração de DNA. Do total de amostras, 64 indivíduos são provenientes do plantel da FPZSP, sendo 24 machos, 39 fêmeas e um de sexo não identificado e, os outros 53 exemplares são provenientes do IB, sendo 22 machos e 31 fêmeas. Devido à dificuldade de obtenção do volume mínimo de amostra (0,5 µl), indivíduos considerados muito pequenos para a colheita foram excluídos deste estudo.

Para esse estudo os indivíduos foram divididos em duas categorias: cativo e vida livre. Foram considerados indivíduos de cativo, aqueles nascidos em cativo. Indivíduos proveniente de vida livre e mantidos em cativo, foram considerados como vida livre, uma vez que estudos mostram que a infecção em serpentes leva cerca de oito anos para diminuir (Biasi et al., 1989) e os indivíduos estudados estão em cativo por um tempo inferior a oito anos, sendo assim não é possível assumir se o indivíduo foi infectado em vida livre ou no cativo.

**Tabela 1: Indivíduos amostrados nesse estudo.**

Nº projeto	Nº cadastro da instituição	Espécie	Intituição	Sexo	Procedência
2	30700	<i>Philodryas olfersii</i>	FPZSP	M	Cativeiro
3	30626	<i>Tupinambis sp</i>	FPZSP	F	Vida livre
4	25582	<i>Trachemis dorbignyi</i>	FPZSP	M	Cativeiro
5	31275	<i>Bothrops insularis</i>	FPZSP	M	Vida livre
6	31276	<i>Bothrops insularis</i>	FPZSP	M	Vida livre
7	30696	<i>Philodryas olfersii</i>	FPZSP	M	Cativeiro
8	30703	<i>Philodryas olfersii</i>	FPZSP	M	Cativeiro
9	30756	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	M	Vida livre
11	30693	<i>Philodryas olfersii</i>	FPZSP	M	Cativeiro
12	30550	<i>Boa constrictor</i>	FPZSP	M	Vida livre
13	29340	<i>Eunectes murinus</i>	FPZSP	M	Cativeiro
14	31253	<i>Corallus caninus</i>	FPZSP	M	Vida livre
15	30698	<i>Philodryas olfersii</i>	FPZSP	M	Cativeiro
16	30759	<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	F	Vida livre
18	30792	<i>Epicrates cencheria</i>	FPZSP	M	Vida livre
19	30589	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	F	Vida livre
20	30590	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	M	Vida livre
22	30791	<i>Epicrates cencheria</i>	FPZSP	F	Cativeiro
24	30778	<i>Varanus doreanus</i>	FPZSP	M	Cativeiro
26	20161014445	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	F	Vida livre
27	20161014427	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	M	Vida livre
28	20161014427	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	M	Vida livre
29	20161014444	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	M	Vida livre
30	20161014442	<i>Crotalus durissus</i>	IB	F	Vida livre
32	20161014404	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	F	Vida livre
33	20161014352	<i>Oxyrhopus guibei</i>	IB	F	Vida livre
35	20161014439	<i>Oxyrhopus guibei</i>	IB	M	Vida livre
36	20161014440	<i>Sibynomorphus mikanii</i>	IB	F	Vida livre
37	20161014407	<i>Tomodon dorsatus</i>	IB	M	Vida livre
39	20160914227	<i>Boa constrictor</i>	IB	M	Vida livre
40	20161014429	<i>Pantherophis guttatus</i>	IB	M	Vida livre
41	20161014368	<i>Pantherophis guttatus</i>	IB	M	Vida livre
42	30793	<i>Epicrates maurus</i>	FPZSP	F	Vida livre
43	30757	<i>Phyton bivittatus</i>	FPZSP	M	Vida livre
44	30478	<i>Epicrates crassus</i>	FPZSP	M	Vida livre
45	30547	<i>Boa constrictor</i>	FPZSP	M	Vida livre
47	MB 4781	<i>Tropidodryas striaticeps</i>	IB	F	Vida livre
50	Chip- 301850	<i>Boa constrictor constrictor</i>	IB	F	Vida livre
51	20161114739	<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	IB	M	Vida livre

52	20161114675	<i>Oxyrhopus guibei</i>	IB	F	Vida livre
53	20161114665	<i>Bothrops jararacussu</i>	IB	F	Vida livre
54	20161114715	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	F	Vida livre
55	2016111464	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	F	Vida livre
56	20161114556	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	F	Vida livre
58	20161114717	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	F	Vida livre
59	20161114665	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	M	Vida livre
60	20161114689	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	F	Vida livre
61	20161114711	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	F	Vida livre
75	30758	<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	F	Vida livre
79	30624	<i>Boa constrictor constrictor</i>	FPZSP	F	Vida livre
105	20170315585	<i>Liophis miliaris</i>	IB	M	Vida livre
106	Sem cad	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	M	Vida livre
107	20170315690	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	M	Vida livre
108	20170315689	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	F	Vida livre
109	20170315693	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	F	Vida livre
110	20170315681	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	F	Vida livre
111	201703156	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	M	Vida livre
112	20170315633	<i>Oxyrhopus guibei</i>	IB	F	Vida livre
113	20170315576	<i>Oxyrhopus guibei</i>	IB	F	Vida livre
114	20170315466	<i>Oxyrhopus guibei</i>	IB	F	Vida livre
115	20170315463	<i>Liophis miliaris</i>	IB	F	Vida livre
116	20170315637	<i>Philodryas offersii</i>	IB	M	Vida livre
117	20170315693	<i>Elapomorphus quinquelineatus</i>	IB	F	Vida livre
118	RT 1971	<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	M	Vida livre

Tabela 2- Espécies amostradas nesse estudo.

<b>Espécie</b>	<b>Nt</b>	<b>Nm</b>	<b>Nf</b>	<b>IB</b>	<b>FPZSP</b>
<i>Boa constrictor amarali</i>	2	-	2	1	1
<i>Boa constrictor constrictor</i>	9	3	6	2	7
<i>Bothrops alternatus</i>	2	-	2	-	2
<i>Bothrops insularis</i>	6	2	4	-	6
<i>Bothrops jararaca</i>	16	6	10	13	3
<i>Bothrops jararacussu</i>	2	-	2	1	1
<i>Bothrops moojeni</i>	3	-	3	-	3
<i>Corallus caninus</i>	2	2	-	-	2
<i>Chironius flavolineatus</i>	1	1	-	-	1
<i>Corallus hortulanus</i>	2	-	2	-	2
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	11	1	10	8	3
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	2	1	1	1	1
<i>Elapomorphus quinquelineatus</i>	1	-	1	1	-
<i>Epicrates cenchria</i>	3	2	1	-	3
<i>Epicrates crassus</i>	2	1	1	-	2

<i>Epicrates maurus</i>	1	-	1	-	1
<i>Eunectes murinus</i>	1	1	-	-	1
<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	1	1	-	1	-
<i>Liophis miliaris</i>	2	1	1	2	-
<i>Oxyrhopus guibei</i>	8	3	5	8	-
<i>Pantherophis guttatus</i>	2	2	-	2	-
<i>Philodryas olfersii</i>	13	7	6	1	12
<i>Philodryas patagoniensis</i>	1	-	1	-	1
<i>Phyton regius</i>	1	1	-	-	1
<i>Phyton bivittatus</i>	1	1	-	-	1
<i>Phyton molurus</i>	1	1	-	-	1
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	1	-	1	1	-
<i>Sibynomorphus neuwiedi</i>	1	-	1	1	-
<i>Spilotes pullatus</i>	3	2	1	-	3
<i>Tomodon dorsatus</i>	7	4	3	7	-
<i>Trachemis dorbignyi</i>	1	1	-	-	1
<i>Tropidodryas striaticeps</i>	3	1	2	2	1
<i>Tupinambis merianae</i>	1	Indeterminado	Indeterminado	-	1
<i>Tupinambis sp</i>	1	-	1	-	1
<i>Varanus doreanus</i>	1	1	-	-	1
<i>Xenodon merremi</i>	2	-	2	1	1

Nt: Número total de indivíduos; Nm: Número de machos; Nf: Número de fêmeas; IB: Número de indivíduos amostrados no Instituto Butantan; FPZSP: Número de indivíduos amostrados na Fundação Parque Zoológico de São Paulo.

As colheitas ocorreram no Setor de Répteis da FPZSP ou noambeamento do recinto onde cada indivíduo foi submetido à contenção física. O sangue foi coletado por punção, preferencialmente, da veia caudal (Figura 6) (Telford, 2009), sendo coletado da paravertebral ou punção cardíaca quando necessário. O sangue foi armazenado em tubos com capacidade para 0,5 ml contendo ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) como anticoagulante e mantido no freezer a -20°C até a extração do DNA. No ato da colheita foram realizados dois esfregaços sanguíneos com sangue à fresco de cada indivíduo.

Os esfregaços foram secos à temperatura ambiente, fixadas em metanol 100% por um minuto e corados com Giemsa (Telford, 2009; Valkiūnas, 2005). As lâminas foram coradas por uma hora, em temperatura ambiente com solução de coloração à 10% do corante, preparada com água tamponada com pH 7.2, (Valkiūnas, 2005). Após serem retiradas do corante, as lâminas foram

lavadas cuidadosamente com água corrente para retirar o excesso do corante e secas a temperatura ambiente.



Figura 6- Colheita de sangue por punção da veia caudal em *Chironius flavolineatus* na FPZSP.

A análise microscópica de cada lâmina foi realizada durante 30 minutos no microscópio óptico Olympus CX-31 em objetiva 1000X, em óleo de imersão (Valkiūnas, 2008). Quando positivas para *Hepatozoon* spp. a determinação da parasitemia foi realizada, na qual foi contabilizado o número de eritrócitos infectados em um total de 10.000 eritrócitos e a porcentagem determinada (Godfrey et al. 1987).

Dentre as diferentes morfologias encontradas foi possível observar variações na posição, formato e largura do núcleo do parasita, presença de cromatina condensada, coloração do citoplasma, posição do parasita no eritrócito, deslocamento do núcleo do eritrócito infectado, perda de hemoglobina ou deformidade da célula infectada, e presença vacúolos e cápsulas nos parasitas.

### **3.3 Testes moleculares**

#### **3.3.1 Extração do DNA genômico**

Para a padronização da técnica foram utilizadas quatro amostras identificadas como positivas na microscopia, pertencentes ao banco de amostras do Departamento de Pesquisas Aplicadas (DPA). O DNA foi extraído

a partir da papa de eritrócito utilizando o kit Wizard Genomic da Promega (Promega, Madison, WI, USA: Cat. A 1120), seguindo as instruções do fabricante e quantificado em aparelho no NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare – USA Spectrophotometer, Cat. Number 28-9569-66).

### 3.3.2 Seleção dos primers (iniciadores)

Para seleção dos primers (Tabela 3) foi realizado levantamento da literatura disponível e quais são mais utilizados para amplificação do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. A partir disso, foram testados dois protocolos usando os dois pares de primers mais citados (Ujvari et al., 2004; Harris et.al., 2011).

A primeira reação de PCR foi realizada utilizando os primers HEMO1/HEMO2 descritos por Perkins e Keller (2001), amplificando 100 pares de bases e, para a segunda reação, os primers utilizados foram HepF300/HepR900 descritos por Ujvari et al. (2004), que amplifica 666 pares de bases. Com base nas sequências de *Hepatozoon* disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), um par de primer interno, foi desenhado para ser utilizado na reação de sequenciamento.

Os primers internos foram desenhados utilizando o software Primer3, que é uma ferramenta online e gratuita (<http://primer3.ut.ee/>). Além disso, também foi testado o par de primer APC1/APC2 para amplificação de uma subunidade do apicoplasto (SSU rRNA) (Oboník et al., 2003), organela presente em todos os membros do filo Apicomplexa, sendo possível amplificar amostras positivas que não foram amplificadas utilizando os primers convencionais do gene 18S rRNA.



Tabela 3- Primers utilizados nesse estudo

Primer	Sequência	Referência
<b>HEMO 1</b>	TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG	Perkins e Keller, 2001
<b>HEMO 2</b>	CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC	
<b>HepF300</b>	GTTTCTGACCTATCAGCTTTTCGAC	Ujvari et al., 2004
<b>HepR900</b>	CAAATCTAAGAATTTTACCTCTGAC	
<b>HEP269</b>	CACCAGACTTGCCCTCCAA	Novo primer
<b>HEP499</b>	CGTTAGCCTGCTTGAAACACT	
<b>APC1</b>	CAGCAGCMGCGGTAATAC	Oboník et al., 2003
<b>APC2</b>	ACGGTTACCTTGTTACGACTT	

### 3.3.3 Amplificação do gene 18S rRNA

Todas as amostras foram submetidas à amplificação do fragmento ribossomal 18S rRNA. Para a padronização do PCR, foram utilizadas três amostras positivas e uma amostra negativa na microscopia, além de um controle negativo que continha somente o mix da reação.

Inicialmente foram testados os dois protocolos já descritos na literatura utilizando os pares de primers acima citados. As reações de PCR utilizando os primers HEMO1/HEMO2 e HepF300/HepR900, foram testadas seguindo o protocolo desenvolvido por Harris et al. (2011). Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmação de sua amplificação, corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, California, USA - Thomas et al., 2016) e fotografados em um transluminador de luz UV (Loccus Biotecnologia – Brasil, LTB-21X26 HE).

Durante o procedimento de padronização, ajustes foram realizados para estabelecer o protocolo final, sendo necessária a realização de pesquisa comparativa de artigos da literatura que utilizaram os primers escolhidos (tabela 4). Foi considerado o que cada protocolo apresentava para cada reagente no estabelecimento da reação de PCR, obtendo-se o protocolo final. Amostras identificadas como positivas na microscopia e não amplificadas na reação de PCR do gene 18S rRNA, foram submetidas à novo teste utilizando o

mesmo protocolo final, com os primers APC1/APC2 havendo alteração somente nas temperaturas de ciclagem da reação.

Tabela 4- Comparação de protocolos da literatura para os primers escolhidos.

<b>Taq</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume total</b>	<b>Referência</b>
Dream Taq	12,5µl	-	25µl	Cook et al.,2014
Platinum Taq DNA polymerase	1U	-	25µl	Moço, 2012
DNA polymerase	0,5U	-	20µl	Harris et al.,2011
DNA polymerase	1U	-	20µl	Harris et al.,2011
-	-	-	-	Panelli et al., 2016
-	-	0,5U/µl	25µl	Netherlands et al., 2014
GoTaq	-	5U/µl	20µl	Maia et al., 2014
Ampli Taq polymease	1U	-	50µl	Ujvari et al.,2004
<b>Buffer</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume total</b>	<b>Referência</b>
Dream Taq buffer	-	2x	25µl	Cook et al.,2014
-	-	1x	25µl	Moço, 2012
PCR buffer	-	1x	20µl	Harris et al.,2011
PCR buffer	-	1x	20µl	Harris et al.,2011
GoTaq master mix	7µl	-	-	Panelli et al., 2016
Thermo scientific PCR master mix 2x	12,5µl	-	25µl	Netherlands et al.,2014
GoTaq flexi buffer	-	1x	20µl	Maia et al., 2014
PCR buffer Perkin-Elmer	5µl	10x	50µl	Ujvari et al.,2004
<b>MgCl2</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume total</b>	<b>Referência</b>
	-	4mM	25µl	Cook et al.,2014
	-	1,5mM	25µl	Moço, 2012
	-	3,75mM	20µl	Harris et al.,2011
	-	1,5mM	20µl	Harris et al.,2011
	-	-	-	Panelli et al., 2016
	-	4mM	25µl	Netherlands et al.,2014
	-	1,5mM	20µl	Maia et al., 2014
	-	1,5mM	50µl	Ujvari et al.,2004
<b>Primer</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume total</b>	<b>Referência</b>
HEMO1/2	-	-	25µl	Cook et al.,2014
HepF300/HepR900	-	-	25µl	Cook et al.,2014
HEMO1/2	-	10pmol	25µl	Moço, 2012
HepF300/HepR900	-	10pmol	25µl	Moço, 2012
HEMO1/2	-	0,5µM	20µl	Harris et al.,2011
HepF300/HepR900	-	0,6µM	20µl	Harris et al.,2011
HEMO1/2	-	1µM	-	Panelli et al., 2016
HepF300/HepR900	1,25µl	-	25µl	Netherlands et al.,2014
HepF300/HepR900	-	0,6mM	20µl	Maia et al., 2014
HepF300/HepR900	-	0,6µM	50µl	Ujvari et al.,2004
<b>dNTP</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Volume total</b>	<b>Referência</b>

	-	0,4mM (cada)	25µl	Cook et al.,2014
	-	10mM	25µl	Moço, 2012
	-	0,2mM (cada)	20µl	Harris et al.,2011
	-	0,125mM (cada)	20µl	Harris et al.,2011
Nuclease free water	2,5µl	-	-	Panelli et al., 2016
	-	0,4mM (cada)	25µl	Netherlands et al.,2014
	-	0,125mM (cada)	20µl	Maia et al., 2014
	-	0,6µM (cada)	50µl	Ujvari et al.,2004
DNA	Quantidade	Concentração	Volume total	Referência
	-	1-2ng/µl	25µl	Cook et al.,2014
	1µl	-	25µl	Moço, 2012
	2µl	-	20µl	Harris et al.,2011
	2µl	-	20µl	Harris et al.,2011
	12,5µl	40ng/µl	-	Panelli et al., 2016
	-	25ng/µl	25µl	Netherlands et al.,2014
	2µl	-	20µl	Maia et al., 2014
	-	-	50µl	Ujvari et al.,2004

-: Não apresenta dado para esse reagente.

### 3.4 Reação de Sequenciamento do gene 18S rRNA

As amostras positivas na reação de PCR foram purificadas com *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (cat no. 28-9034-70; GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento. Essas reações foram realizadas em sequenciador automático, modelo 3500 *Genetic Analyzer sequencer* (*Applied Biosystems*), com 5,0 µL de produto de PCR purificados, acrescidos de 4,0µL de *BigDye v.3.1* (*Applied Biosystems*) e 1,0 µL de cada primer para o sequenciamento em concentração de 0,5 µmol. Os primers utilizados foram os mesmos descritos acima para a reação de amplificação do produto. O programa de sequenciamento consistiu em 25 ciclos a 95°C por 20s, 50°C por 15 s e 60°C durante 60s.

### 3.5 Análises Filogenéticas

As sequências do gene 18S rRNA amplificadas pelo primer Hep e as sequências do “target” Apicoplasto amplificadas pelo primer APC, foram comparadas às sequências previamente depositadas no GenBank (Altschul et al., 1997) e o gênero *Cytauxzoon* sp. foi utilizado como *outgroup* para essa análise. Todas as sequências obtidas (dados brutos) foram analisadas e corrigidas utilizando o software Chromas Pro Current Version 1:34, gerando uma sequência consenso em formato FASTA para cada uma delas. Foi realizado levantamento de sequências para todas as espécies de *Hepatozoon* spp. já depositadas no Genbank. As sequências de 18S rRNA e APC depositadas no GenBank foram incorporadas à análise e alinhadas com as sequências obtidas nesse estudo através do programa CLUSTAL W (Altschul et al., 1990) utilizando o software MEGA 7.0.1 (<http://www.megasoftware.net>). A topologia da árvore filogenética foi gerada através do método de neighbour-joining (Saitou et al., 1987) e modelo de distância  $p$ . A confiabilidade para a topologia gerada foi considerada através da análise de bootstrap (Felsenstein, 1985) baseada em 1000 repetições.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Microscopia

Sabe-se que a fase sanguínea do gênero *Hepatozoon* se assemelha com os demais gêneros de hemogregarinas e que muitos autores consideram hemogregarinas presentes em répteis como pertencentes ao gênero *Hepatozoon* (Siddall, 1995; Telford, 2009), sendo esse critério utilizado durante as identificações morfológicas.

#### 4.1.1 Perfil dos indivíduos amostrados

O presente estudo foi conduzido com 117 exemplares dos quais 91 (77,8%) tem procedência de vida livre e 26 (22,2%) de cativeiro. Desse total foram obtidas amostras de 113 serpentes, um cágado e três lagartos, sendo que, 16 indivíduos (13,6%) apresentaram positividade para *Hepatozoon* spp. na microscopia. Estudos anteriores mostram prevalência variando entre 8% e 48% em serpentes quando as amostras são analisadas na microscopia (Tomé et al. 2012; Nasiri et al., 2014; Maia et al., 2014). Apesar da variação na prevalência, é possível notar que a porcentagem encontrada nesse estudo está dentro do esperado para esse grupo.

Dentre as amostras positivas, apenas dois indivíduos (12,5%) são provenientes de cativeiro e 14 (87,5%) são de vida livre, com parasitemia observada variando entre 0,01% e 0,86% e média de 0,19% (Tabela 5). Neste estudo foram encontrados tanto indivíduos com parasitemia menor como com parasitemia maior do que a mencionada na literatura. Não há um valor estabelecido como alta ou baixa parasitemia de *Hepatozoon* spp., outros estudos realizados com animais de vida livre apontam parasitemia variando entre 0,03% e 0,52% (Santos et al., 2005; Motta et al., 2011; Han et al., 2015).

Tabela 5- Indivíduos positivos para *Hepatozoon* spp. na microscopia óptica.

Espécie	Procedência	Parasitemia
<i>Boa constrictor</i>	Vida livre	0,23%
<i>Boa constrictor constrictor</i>	Vida livre	0,06%
<i>Bothrops jararaca</i>	Vida livre	0,50%
<i>Bothrops jararaca</i>	Vida livre	0,04%
<i>Corallus hortulanus</i>	Vida livre	0,03%
<i>Corallus hortulanus</i>	Vida livre	0,86%
<i>Chironius flavolineatus</i>	Vida Livre	0,37%
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Vida livre	0,02%
<i>Epicrates cenchria</i>	Vida livre	0,16%
<i>Epicrates cenchria</i>	Cativeiro	0,02%
<i>Epicrates cenchria</i>	Vida livre	0,05%
<i>Epicrates maurus</i>	Vida livre	0,01%
<i>Spilotes pullatus</i>	Vida livre	0,02%
<i>Spilotes pullatus</i>	Vida livre	0,08%
<i>Tupinambis merianae</i>	Vida livre	0,26%
<i>Varanus doreanus</i>	Cativeiro	0,36%

Com relação aos 101 (86,4%) indivíduos negativos na análise microscópica, 24 deles (23,8%) têm procedência em cativeiro e 77 (76,2%) em vida livre (Gráfico 1).

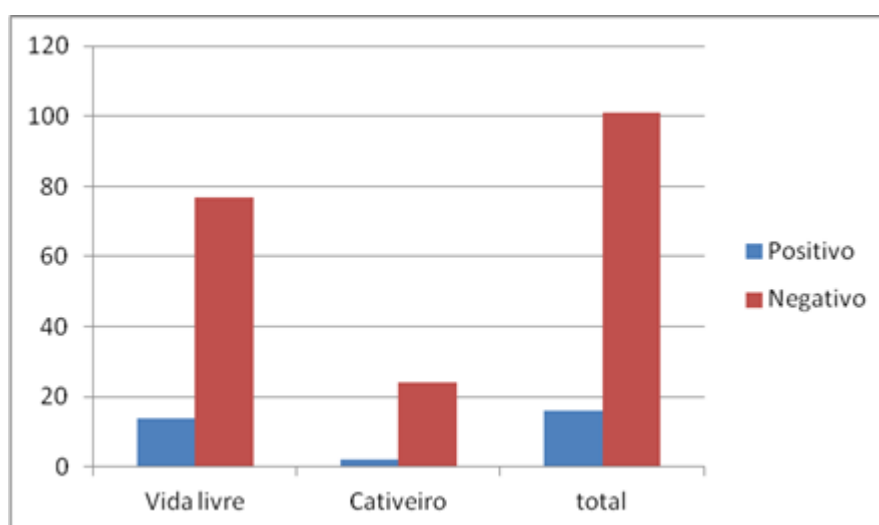


Gráfico 1: Relação de exemplares provenientes de cativeiro e vida livre coletados dos nesse estudo.

Das 32 espécies estudadas, dez apresentaram algum indivíduo positivo, sendo que todas (*Boa constrictor*, *Bothrops jararaca*, *Chironius flavolineatus*, *Corallus hortulanus*, *Crotalus durissus terrificus*, *Epicrates cenchria*, *Epicrates maurus*, *Spilotes pullatus* e *Tupinambis merianae*) ocorrem no Brasil, com exceção do *Varanus doreanus* que é nativo da Austrália e Papua Nova Guiné (Reptile database, 2017). Para todas as espécies positivas nesse estudo apenas *E. maurus*, *V. doreanus* e *T. merianae* não possuem descrição para esse parasita e a espécie hospedeira com maior ocorrência nesse estudo foi *E. cenchria*. Com relação ao status de conservação dessas espécies, apenas duas (*C. hortulanus* e *V. doreanus*) estão presentes na Lista Vermelha da IUCN e são classificadas como “Least concern” (IUCN,2017). *Tupinambis merianae* e *E. cenchria* são classificados como vulneráveis, *B. jaracaca* como deficiente de dados e *C. durissus* como não ameaçada de acordo com a lista vermelha do Brasil (Martins e Molina, 2005). Com relação a *B. constrictor*, *C. flavolineatus*, *E. maurus* e *S. pullatus* não há avaliação sobre o status de conservação.

Dados da literatura apontam que as serpentes com maior ocorrência de infecção por *Hepatozoon* spp. são *B. constrictor* (Thoisy et al., 2000; Santos et al., 2005; Moço et al., 2002), *B. jararaca* e *C. durissus* (Motta et al., 2011; Sumrandee et al., 2015; Moço et al., 2002). A prevalência observada para essas espécies no presente estudo foi de 18,18% em *B. constrictor*, 12,5% em *B. jararaca* e 7,7% em *C. durissus*, contudo dados da literatura relatam prevalências de 38,9% a 62% para *B. constrictor*, 24% a 35,3% para *B. jararaca* e 11% a 19,4% para *C. durissus* (Pessoa et al., 1974; O’Dwyer et al., 2003), logo a prevalência encontrada está abaixo dos dados existentes em outras publicações.

As amostras 19 (Figura 7), 20 (Figura 8), 23 (Figura 10) e 118 (Figura 17) apresentaram apenas uma morfologia em todos os gamontes encontrados nos esfregaços, enquanto as amostras 21 (Figura 9), 25 (Figura 11), 27 (Figura12), 28 (Figura 13), 55 (Figura 14), 75 (Figura 15) e 79 (Figura 16) apresentaram gamotes com diferentes morfologias sugerindo a ocorrência de infecções mistas, diferentes fases do ciclo de vida do parasita ou dimorfismo sexual (Telford, 2009) (Tabela 6). Não foi possível realizar a fotomicrografia das

amostras 16, 18, 22, 24 e 42, pois as referidas lâminas não foram depositadas no banco de amostras.





Tabela 6- Descrição morfológica de *Hepatozoon* spp. encontrados nas amostras utilizando microscopia óptica.

ID	Localização	Nucleofílico	Gamonte	Vacúolo	Citoplasma	Média citoplasma	Núcleo	Formato	Localização	Média núcleo	Alteração eritrócito	Desloca núcleo eritrócito
19	PI	A	I	P	Az	11,68±0,69 x 2,80±0,04	Ir	O	Cr	4,62±0,40 x 2,42±0,59	A	A
20	Pr	A	M (A) I	P	Az	16,12±0,35 x 2,91±0,14	R	Al	Cr	7,20±1,25 x 2,08±0,27	P	P
21(A-C)	PI	P	M (A) I	A	Az	13,90±3,41 x 2,85±0,07	R	C	PI	5,91±0,99 x 2,25±0,73	P	P
21(D-G)	(E) Pr (D/F/G) PI	P	M	A	LAE	13,90±1,57 x 2,85±0,17	R	Rt	PI	5,91±1,35 x 2,25±0,30	P	P
21(H-I)	Pr	P	M	A	B	12,45±0,33 x 3,65±0,01	N/A	N/A	N/A	N/A	P	P
23	Pr	P	M	A	(A/B) LAE (C/D) Az	14,16±0,46 x 2,21±0,82	Ir	O	PI	3,95±0,19 x 1,68±0,48	A	A
25(A-F)	Pr	A	M	A	LAz	14,70±1,52 x 2,82±0,34	R	Es	PI	7,79±0,73 x 2,89±0,11	A	P
25(G-H)	Pr	P	I	A	LAA	16,09±0,13 x 3,14±0,47	Ir	A	PI	9,41±0,21 x 2,39±0,05	P	A
25(I-O)	Pr	A	em	N/A	Az	15,11±0,96 x	(I/J/N/O) Ir	(J/N/O) Al	PI	5,24±3,02	P	P

						3,60±0,34	(K/L/M) N/A	(I)O		x 3,46±1,86		
<b>27(A-F)</b>	PI	P	M	P	AzA	13,20±0,80 x 3,30±0,69	R	O	PI	4,42±0,69 x 2,25±0,37	P	P
<b>27(G-L)</b>	Pr	P	M	A	Az	13,66±0,34 x 3,43±0,67	R	O	PI	5,45±0,45 x 2,42±0,15	A	P
<b>28</b>	PI	P	M	P	AzA	13,45±0,44 x 3,33±0,75	R	O	PI	4,79±0,30 x 2,36±0,13	P	P
<b>55</b>	PI	P	M	A	B	14,14±0 x 2,86±0	R	O	PI	5,41±0 x 2,02±0	A	A
<b>75(A-C)</b>	PI	A	Em	A	Az	12,73±0,36 x 3,43±0,84	N/A	N/A	N/A	4,55±2,67 x 1,84±1,10	P	P
<b>75(D-J)</b>	PI	A	(D) I (E-J) M	P	LAB	13,93±1,60 x 3,67±0,40	R	Q	PI	4,14±0,89 x 3,10±0,71	P	P
<b>79(A-B)</b>	PI	A	Em	A	Az	12,72±0,88 x 4,94±0,42	(A) Ir (B) N/A	(A) Al (B) N/A	(A) PI (B) N/A	8,98±6,35 x 1,76±1,29	P	P
<b>79(C-F)</b>	PI	A	M	A	Az	14,20±0,30 x 4,43±0,45	R	Q	PI	4,45±0,40 x 3,05±0,67	P	P
<b>118</b>	PI	A	M	A	Az	14,63±0,65 x 6,05±0,60	R	C	PI	6,01±0,28 x 4,09±0,26	P	P

Legenda: **A:** Ausente; **Al:** Alongado; **Az:** Azurofílico; **AzA:** Azurofílico com pontos azurofílicos; **B:** Basofílico; **C:** Circular; **Cr:** Centralizado; **En:** Encapsulado; **Es:** Espiral; **I:** Imaturo; **Ir:** Irregular; **LAA:** Levemente azurofílico com pontos azurofílicos; **LAB:** Levemente azurofílico com pontos

basofílicos; **LAE**: Levemente azurofílico com pontos eosinofílicos; **LAz**: Levemente azurofílico; **M**: Maduro; **N/A**: Não se aplica; **O**: Oval; **P**: Presente;  
**PI**: Polar; **Pr**: Periférico; **Q**: Quadrado; **R**: Regular; **Rt**: Retangular.

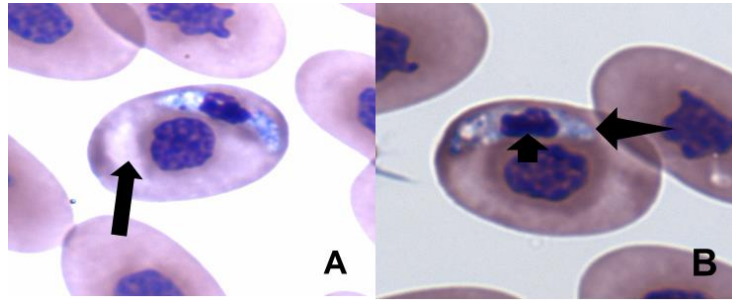


Figura 7- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Spilotes pullatus* (indivíduo 19). Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta grande: perda de hemoglobina.

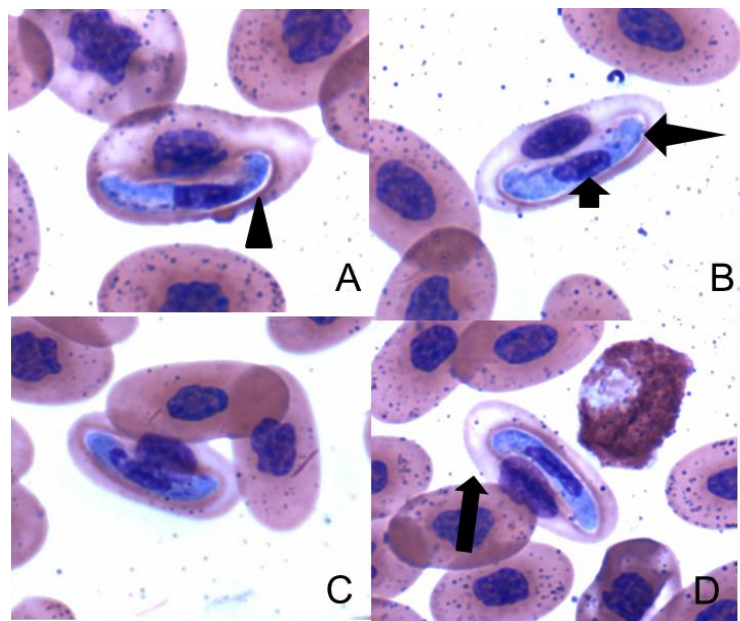


Figura 8- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizado em esfregaço sanguíneo de *Spilotes pullatus* (indivíduo 20). Ponta da seta: vacúolo; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta grande: perda de hemoglobina.

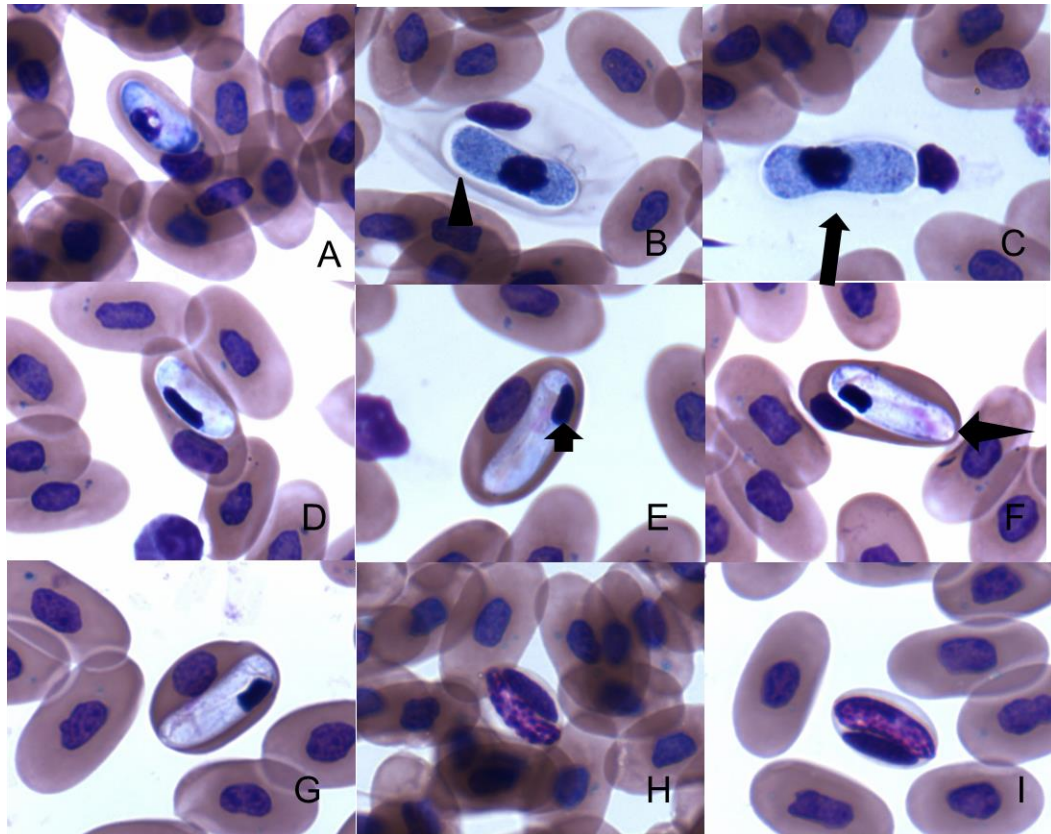


Figura 9- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Epicrates cenchria* (indivíduo 21). Ponta da seta: vacúolo; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta grande: perda de hemoglobina.

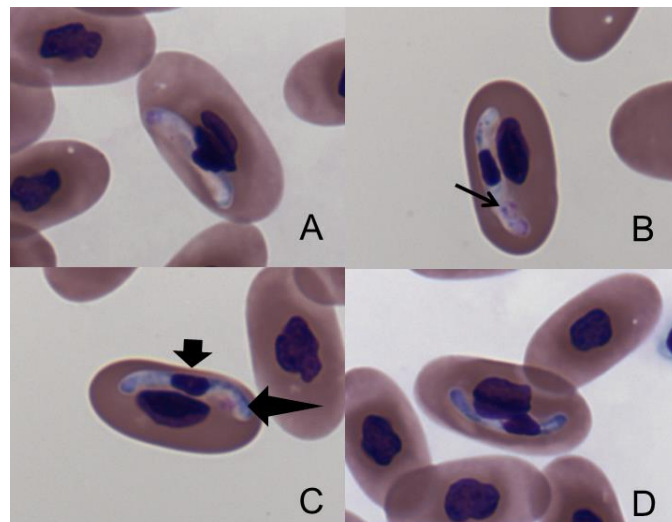


Figura 10- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Boa constrictor* (indivíduo 23). Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta fina: grânulos.

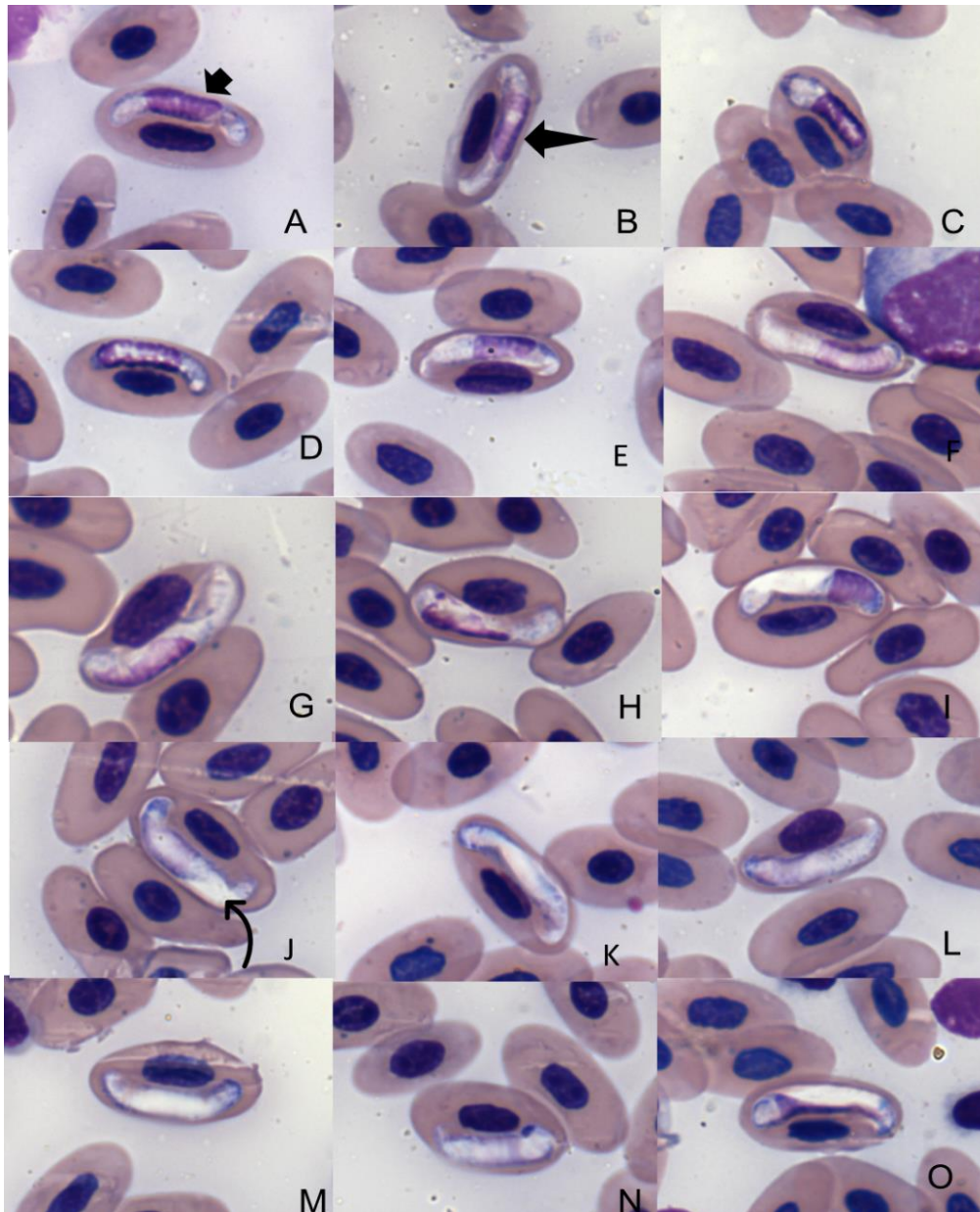


Figura 11- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Tupinambis merianae* (indivíduo 25). Seta curva: Cápsula; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita.

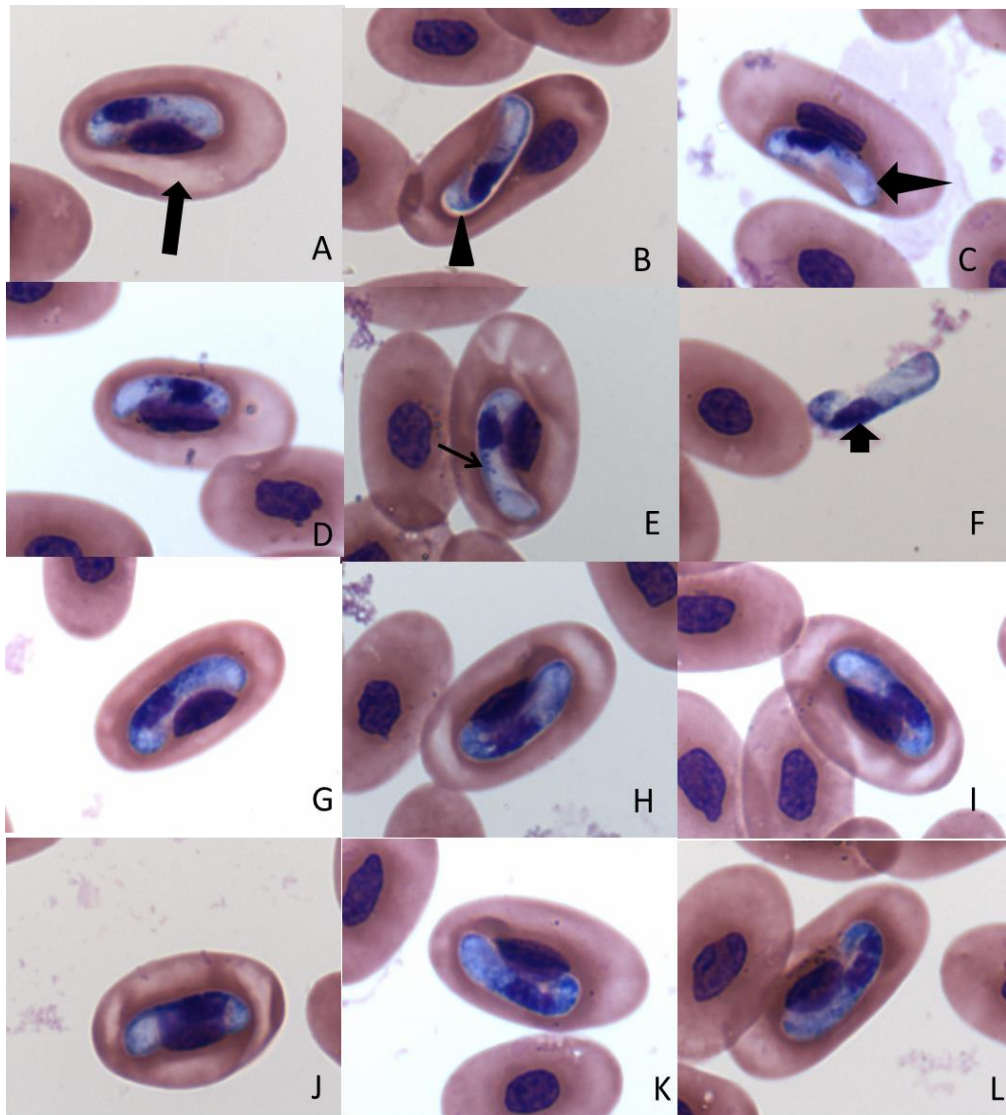


Figura 12- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizadas em esfregaço sanguíneo de *Bothrops jararaca* (indivíduo 27). Seta fina: grânulos; Ponta da seta: vacúolo; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta grande: perda de hemoglobina.



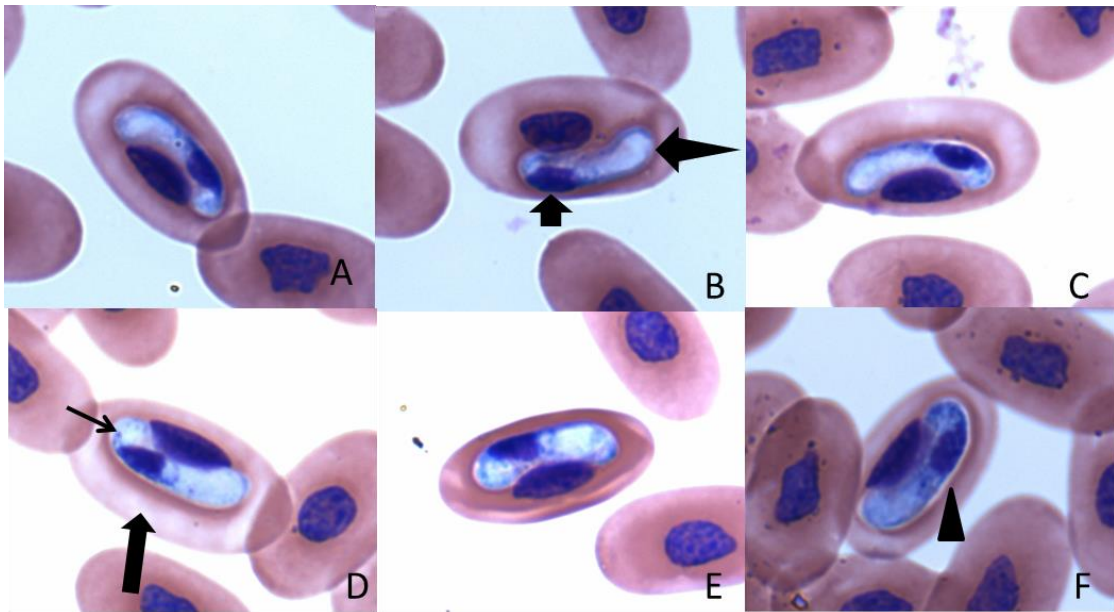


Figura 13- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo obtido de *Bothrops jararaca* (indivíduo 28). Seta fina: grânulos; Ponta da seta: vacúolo; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta grande: perda de hemoglobina.

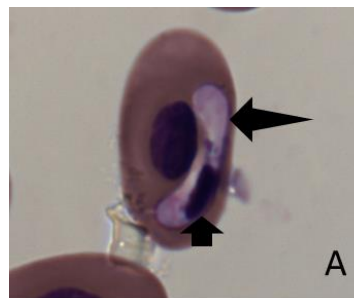


Figura 14- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo obtido de *Crotalus durissus terrificus* (indivíduo 55). Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita.

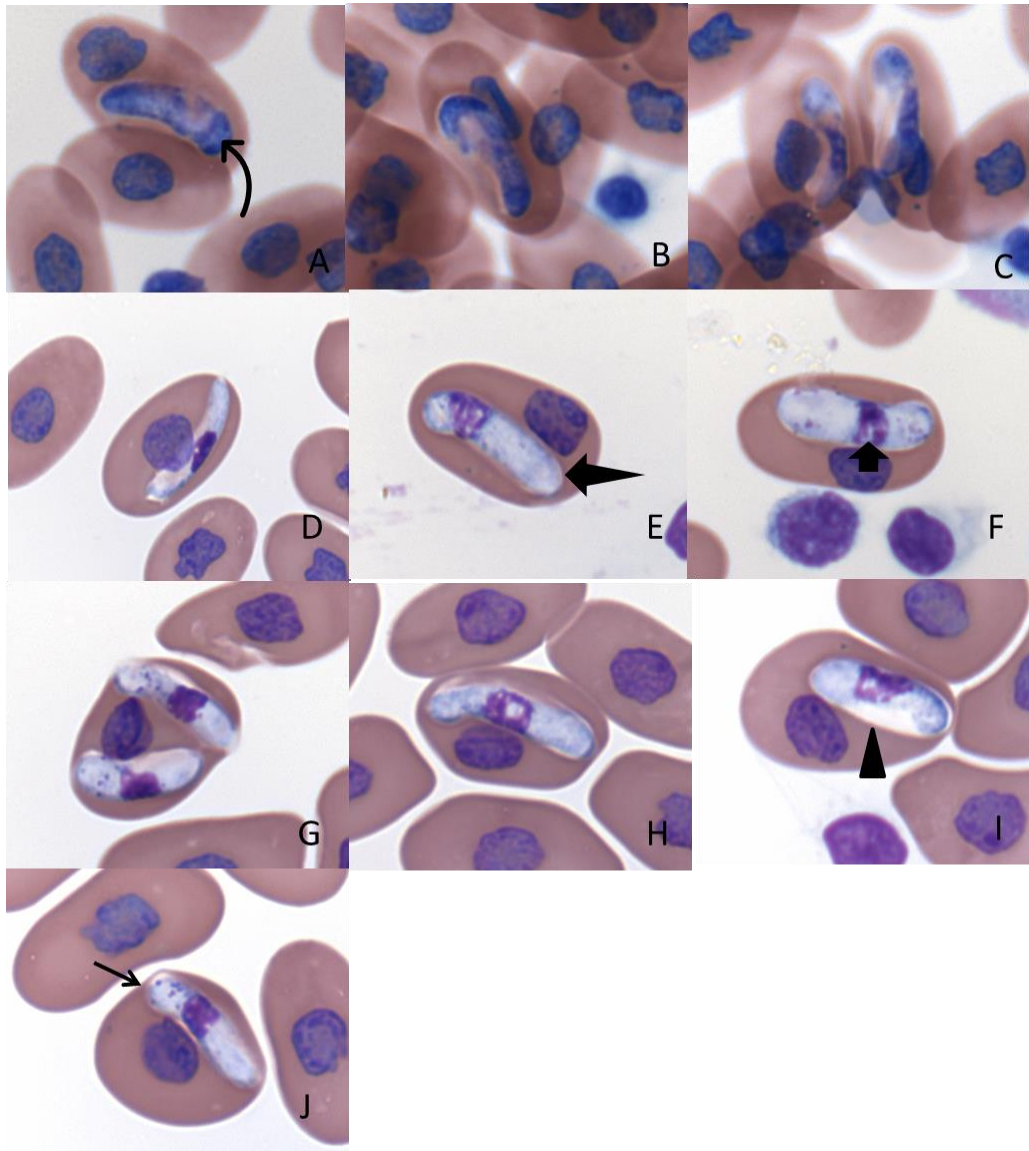


Figura 15- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Corallus hortulanus* (indivíduo 75). Seta curva: Cápsula; Seta fina: grânulos; Ponta da seta: vacúolo; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita.

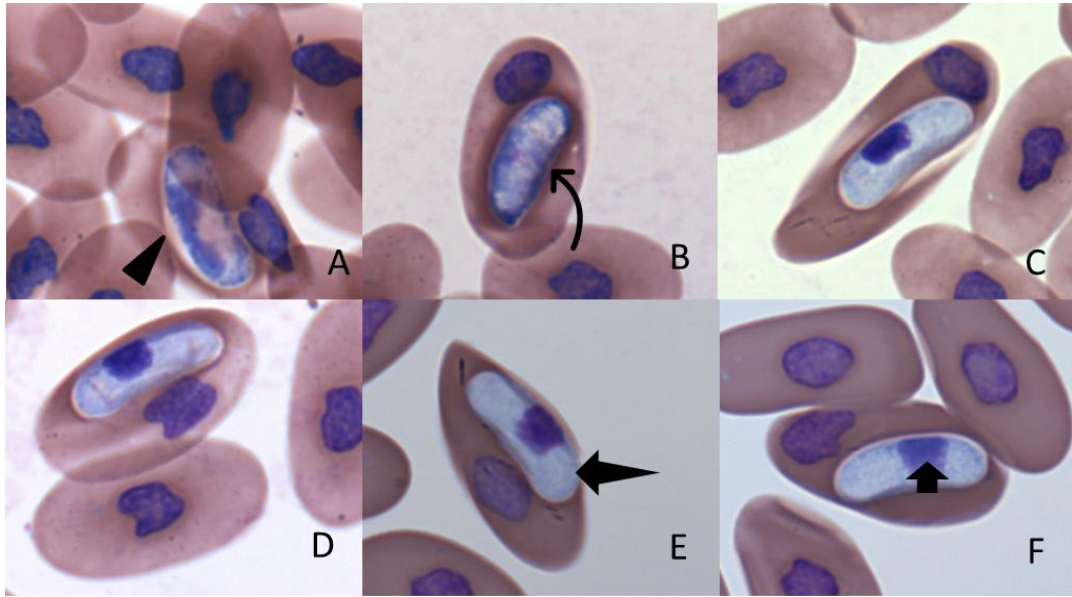


Figura 16- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizados em esfregaço sanguíneo de *Boa constrictor constrictor* (indivíduo 79). Seta curva: Cápsula; Ponta da seta: vacúolo; Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita.

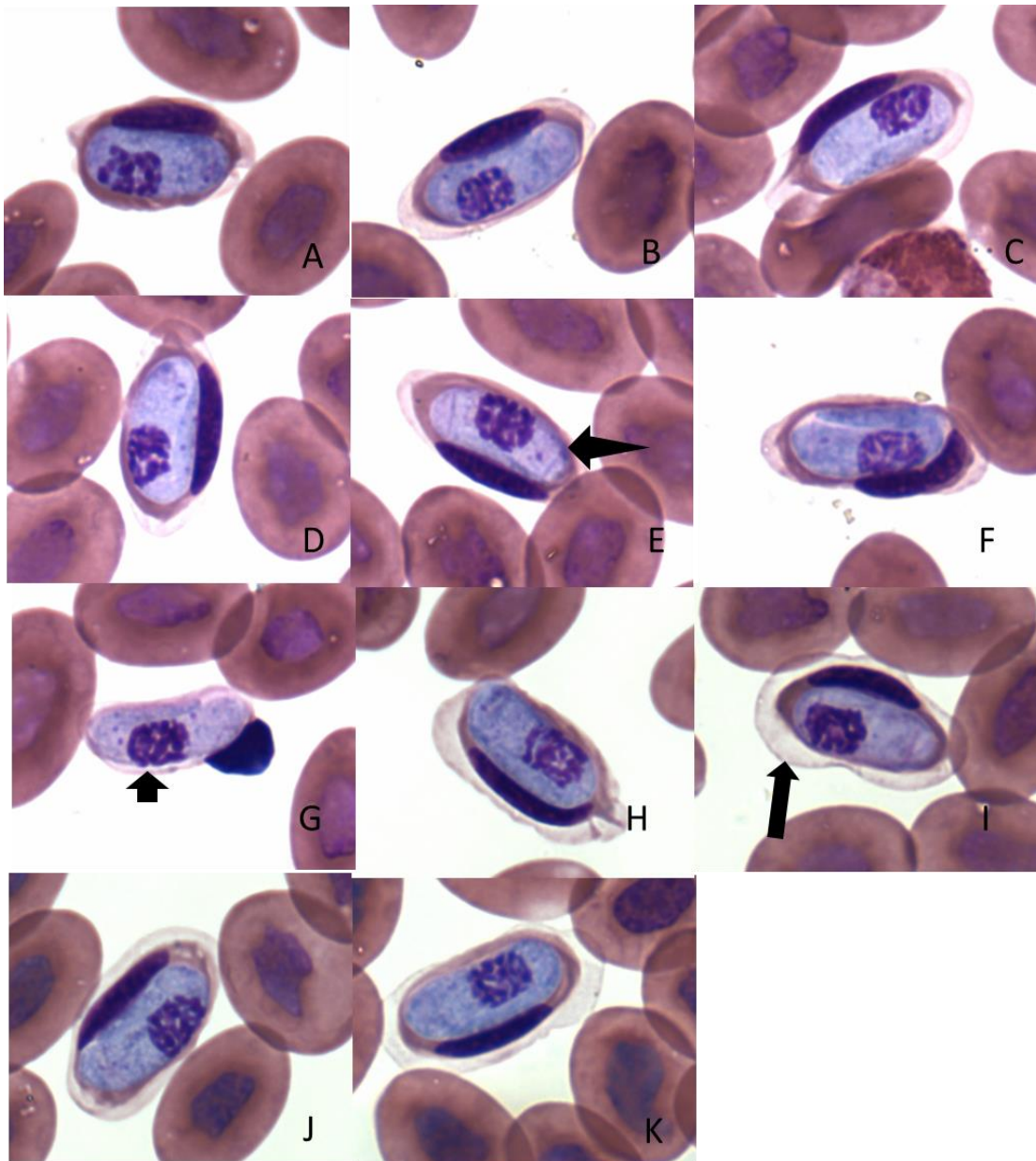


Figura 17- Fotomicrografia de *Hepatozoon* spp. visualizado em esfregaço sanguíneo de *Chironius flavolineatus* (indivíduo 118). Seta pontuda: parasita; Seta pequena: núcleo do parasita; Seta grande: perda de hemoglobina.

O dimorfismo sexual, possível característica observada no indivíduo 27 (Figura 12) ainda não é muito relatado, porém alguns autores descrevem uma possível diferenciação sexual em algumas espécies, com presença de macrogamontes de citoplasma mais claro, núcleo mais compacto e de coloração mais escura e menos recurvados do que os microgamontes, (Siddall e Desser, 1992; Smith, 1996; Leville et al, 2014).

Os indivíduos 19 , 27, 28, e 75 apresentam alguns grânulos azurofílicos no citoplasma e embora não se saiba a origem ou função desses grânulos, já foram observados em outras espécies de hemogregarinas como *Hepatozoon kisrae*, *Haemogregarina* sp., *Karyolysus latus*, *Karyolysus minor* e *Hemolivia mauritanicum* (Telford, 2009). O encapsulamento do parasita, como observado nos indivíduos 25 (Figura 11), 75 e 79 (Figura 12, é uma condição descrita apenas para *Hepatozoon kisrae* (Telford, 2009), mas a presença da cápsula é uma característica comum para identificação dos gêneros *Hemolivia* e *Karyolysus*, sendo observada somente nos eritrócitos circulantes (Boulard et al., 2001; Telford, 2009). A origem e função dessas cápsulas ainda não foram bem determinadas, podendo estar associada à formação de um vacúolo parasitóforo, com função de promover proteção ao gamonte durante a digestão do sangue no vetor após o repasto sanguíneo, ou ser uma defesa do parasita contra a resposta imune do hospedeiro vertebrado (Davies e Johnston, 2000; Telford, 2009; Netherlands et al., 2014b).

## **4.2 Testes moleculares**

### **4.2.1 Padronização da reação de PCR**

As reações de PCR testadas seguindo os protocolos descritos na literatura citados na metodologia não obtiveram sucesso para amplificação das amostras. A principal dificuldade em estabelecer o protocolo adequado foi obter as concentrações e quantidades ideais para cada reagente, além de ter sido necessário definir a melhor temperatura de anelamento, uma vez que a grande maioria dos protocolos disponíveis não apresentavam todas informações (Tabela 7). O primer HEMO resulta em um fragmento pequeno, e pode ser facilmente confundido com o resto de reagente que se forma no final gel de agarose após corrida em eletroforese, não sendo possível determinar se a amostra havia sido realmente amplificada. Desta forma, não foi possível apresentar os resultados para esse par de primer.

Tabela 7 – Protocolo molecular final utilizado nesse estudo

Reagente	Concentração	Concentração	
		HepF300/HepR900	APC1/APC2
Água		Até 50 µl	Até 50 µl
Tampão	1X PCR Buffer	6,25 µl	6,25 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,75 µl	1,75 µl
dNTP	10 mM	0,25 µl	0,25 µl
Forward	60 pmol	2,5 µl	1,4 µl
Reverse	60 pmol	2,5 µl	1,2 µl
Taq DNA polimerase	1U	0,5 µl	0,5 µl

As reações utilizando os primers Hep e APC foram realizadas em duplicatas seguindo o protocolo estabelecido nesse estudo (Tabela 7) e o programa de ciclagem abaixo (Tabela 8). O volume final da reação para amplificação desses fragmentos foi de 50 µl e concentração ideal de DNA de 60 ng/µl. Os amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados com GelRed e visualizados e capturados em transluminador de luz UV (Loccus Biotecnologia – Brasil, LTB-21X26 HE), (Figura 18 e 19).

Tabela 8- Programa de ciclagem utilizado para o novo protocolo

	HepF300/HepR900			APC1/APC2		
	°C	Tempo	Nº Ciclos	°C	Tempo	Nº Ciclos
<b>Desnaturação</b>	94	3 min	1	95	3 min	1
<b>Ciclo</b>	94	30 seg		95	1 min	
	60	1 min	34	45	3 min	29
	72	1 min		72	50 seg	
<b>Extensão final</b>	72	10 min	1	72	10 min	1

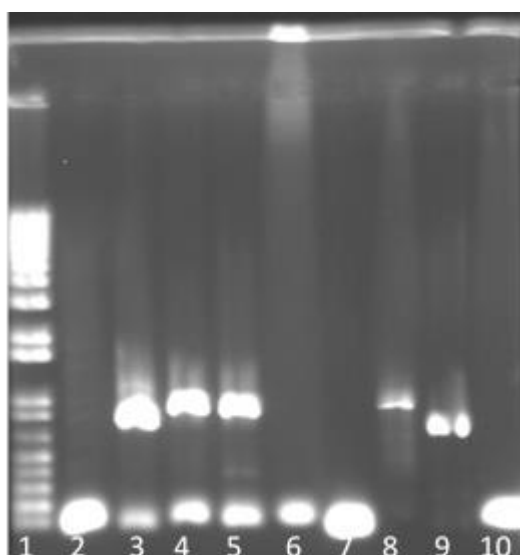


Figura 18- Eletroforese em gel de agarose do protocolo final utilizando os primers HepF300/HepR900. Da direita para esquerda: 1- 1kb 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,6,7- Amostras negativas na microscopia; 3,4,5,8,9 - Amostras positivas na microscopia; 10- Controle negativo.

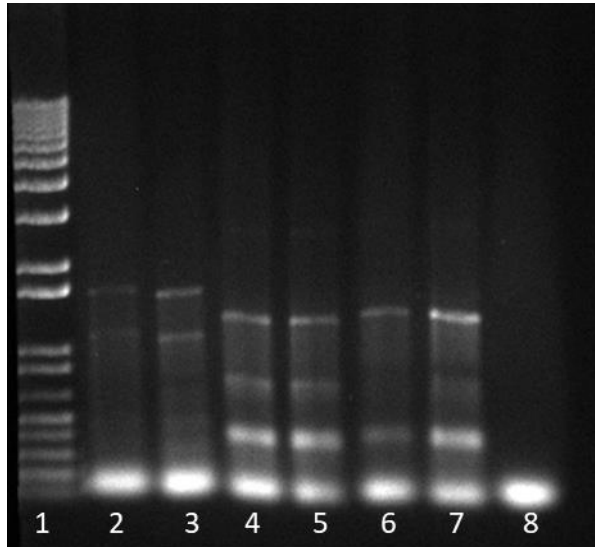


Figura 19- Eletroforese em gel de agarose do protocolo final utilizando os primers APC1/APC2. Da direita para esquerda: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,3- Amostras negativas na microscopia; 4 a 7- Amostras positivas na microscopia; 8- Controle negativo.

Do total de 117 amostras coletadas, seis não obtiveram concentração de DNA suficiente para realização da PCR. Considerando que quatro eram provenientes do IB, e após a colheita os animais eram destinados para outras instituições, e dois provenientes da FPZSP, um de vida livre que foi amostrado em uma colheita oportuna e um de cativeiro que veio a óbito durante o estudo, não foi possível a realização de novas colheitas.

Das 111 amostras submetidas à reação de PCR (Tabela 8), sete (6,3%) apresentaram resultado positivo quando amplificadas com os primers HepF300/HepR900, dentre esses apenas um é proveniente de cativeiro e o mesmo foi o único identificado como negativo na microscopia óptica, exemplificando a presença dos falsos negativos quando somente a microscopia é utilizada. É possível notar que a positividade utilizando o primer Hep está abaixo do esperado quando comparado à microscopia. Sabe-se que as técnicas moleculares são mais sensíveis do que as técnicas de microscopia, e considerando que o primer Hep foi desenhado para ser usado em pesquisas do parasita em serpente, é possível que essa discrepância na positividade ocorra por dois motivos:

- (i) Como descrito anteriormente, os gamontes de *Hepatozoon* spp. são semelhantes morfológicamente aos gamontes dos demais gêneros de hemogregarinas, assim é possível ocorrer a



identificação errada do gênero (Pessoa e De Biasi, 1973 a,b; O'Dwyer et al., 2003), além disso, outros gêneros de hemogregarinas infectam serpentes, como já foram descritos casos de *Karyolysus* infectando lagartos na Europa e Ásia e de *Haemogregarina* e *Hemolivia* em tartarugas e cágados (Siddall, 1995; Kvičerová et al., 2014). Por esta razão a identificação apenas morfológica é desencorajada por muitos autores (Ball et al., 1967; Siddall, 1995; Smith, 1996);

- (ii) A presença de infecções mistas é algo comum no diagnóstico parasitológico (Valkiūnas, 2004) e pode influenciar na eficácia da reação de PCR, o que acarretaria a não detecção pela técnica de PCR convencional (Perkins et al., 2011). Desta forma, a presença de possíveis infecções mistas nas amostras coletadas nesse estudo pode ter influência na eficácia da reação.

Como citado acima, sete amostras foram positivas quando submetidas ao PCR utilizando os primers Hep, sendo assim, um segundo teste utilizando os primers APC1/APC2, foi preparado (Figura 19). O teste foi realizado a partir do mesmo protocolo de reação estabelecido nesse estudo, utilizando as amostras já confirmadas como positivas na microscopia e com a amostra falso-negativo que foi amplificada na reação utilizando o primer. Das 15 amostras submetidas à reação de PCR para amplificação da subunidade do aplicoplasto com o primer APC (Tabela 9), 14 (93,33%) apresentaram resultados positivos, sendo dois de cativeiro e 11 de vida livre. A positividade observada para o primer APC pode ser explicada pela baixa especificidade do primer, uma vez que abrange uma subunidade presente em todos os Apicomplexa e por se tratar de um primer degenerado (Oborník et al., 2003), é possível que identifique outros parasitas do filo Apicomplexa como os do grupo das hemogregarinas.

Tabela 9- Amostras positivas na PCR

<b>HepF300/ HepR900</b>		
<b>Espécie</b>	<b>Instituição</b>	<b>Procedência</b>
<i>Boa constrictor constrictor</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Vida livre
<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Vida livre
<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Tupinambis sp.</i>	FPZSP	Cativeiro
<b>APC1/APC2</b>		
<b>Espécie</b>	<b>Instituição</b>	<b>Procedência</b>
<i>Boa constrictor</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Vida livre
<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Vida livre
<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	Vida livre
<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Cativeiro
<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Epicrates maurus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Tupinambis merianae</i>	FPZSP	Vida livre
<i>Tupinambis sp.</i>	FPZSP	Cativeiro

### 4.3 Análise filogenética

As amostras submetidas à reação de PCR para o gene 18S utilizando os primers Hep foram amplificadas com sucesso (figura 18), por outro lado, a amplificação para o “target” Apicoplasto com os primers APC, apresentou bandas inespecíficas (figura 19). Todos os produtos amplificados, tanto para o gene 18S rRNA quanto para o “target” Apicoplasto foram submetidos ao sequenciamento, porém no caso do primer APC foi necessário realizar a extração das bandas inespecíficas do gel, e submeter todas ao sequenciamento. Após análise das sequências, foi realizada a filogenia apresentada na figura abaixo (Figuras 20 e 21).

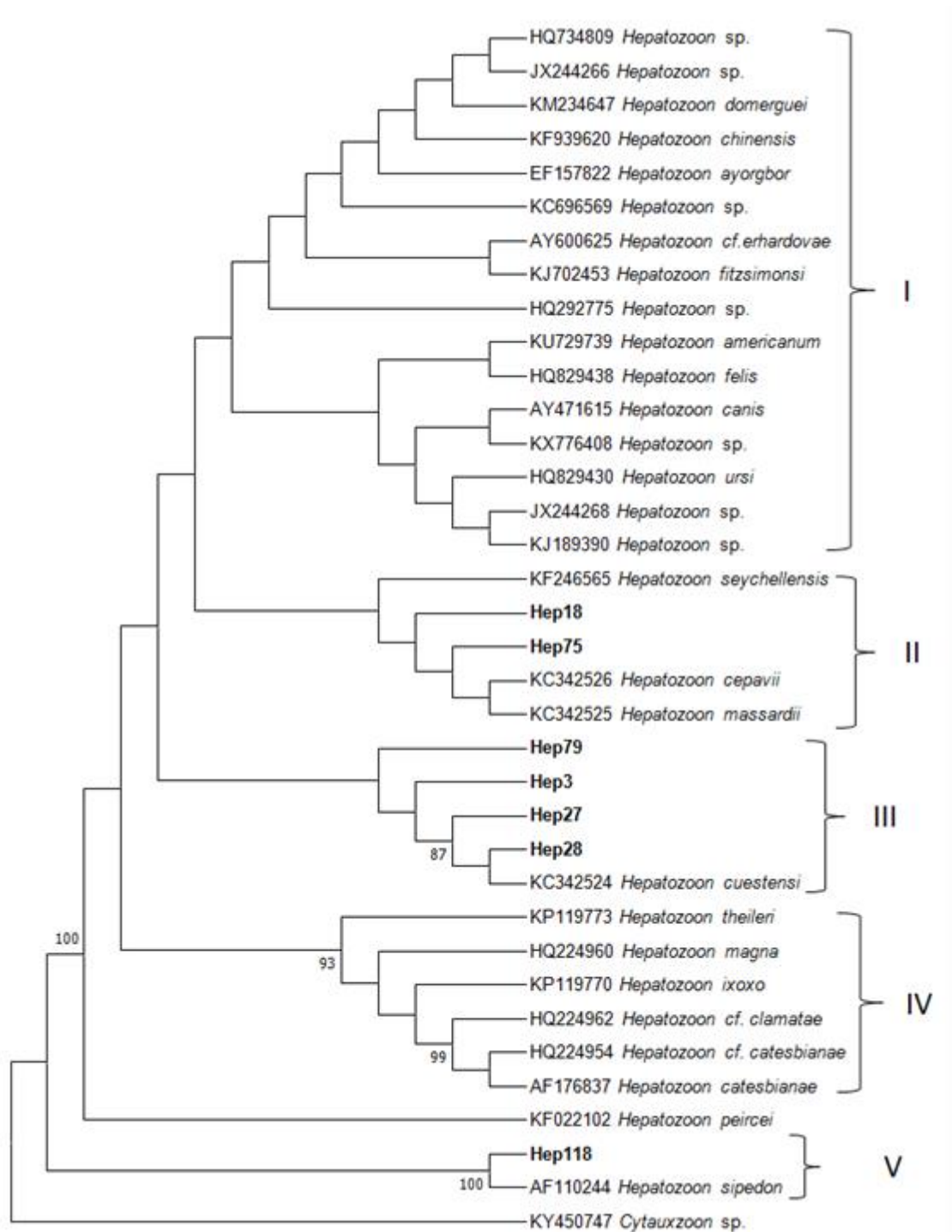


Figura 20- Topologia filogenética obtida para as amostras Hep 18, Hep27, Hep 28, Hep 75, Hep 79 e Hep 118 utilizando o método de Neighbor-Joining e distância-p, baseado na sequência de 18S rRNA. O número indica os resultados da análise de bootstrap com 1000 repetições.

Com base na topologia da árvore filogenética para o gene 18S rRNA, é possível observar a formação de cinco agrupamentos (clusters) definindo a proximidade entre as espécies de *Hepatozoon*. Os agrupamentos foram divididos para melhor visualização e discussão da filogenia.

O agrupamento I – É formado por nove espécies diferentes, além de *Hepatozoon* sp. Essas espécies são diferentes entre elas devido à localização de coleta e hospedeiro, além disso, o valor de bootstrap (confiança) ficou abaixo dos 75%, indicando a diferença entre essas espécies. As espécies de *Hepatozoon* sp. foram descritas em três lugares e em hospedeiros das classes Mammalia e Reptilia, sendo descrito na África (Maia et al., 2011; Harris et al., 2011; Tomé et al., 2012), Península Ibérica (Tomé et al., 2012; Maia et al., 2014) e Brasil (Sousa et al., 2016- Unpublished).

Dentre as espécies do grupo I que foram descritas infectando serpentes, *H. domerguei* (Maia et al., 2014), *H. chinensis* (Wu et al., 2014- Unpublished) e *H. ayorgbor* (Sloboda et al., 2007) foram relatados em Madagascar, China e Gana, infectando as espécies *Madagascarophis colubrinus*, *Elaphe carinata* e *Lamprophis fuliginosus*, respectivamente.

O agrupamento II – Constituído por três espécies descritas através de técnicas de microscopia e biologia molecular, sendo elas *H. seychellensis*; *H. cepavii* e *H. massardii*, além de duas amostras provenientes deste estudo Hep18 e Hep75. A primeira espécie foi descrita na África infectando Caecílias pertencentes à família Indotyphlidae (Harris et al., 2014); *H. cepavii* e *H. massardii* foram descritas na região de Botucatu (São Paulo) infectando *Crotalus durissus* (O'Dwyer et al., 2013).

As amostras Hep 18 e Hep 75 foram encontradas em serpentes pertencentes a família Boidae e apesar de serem mantidas em cativeiro são provenientes de vida livre, encontradas na cidade de São Paulo. As amostras e *H. cepavii* e *H. massardii* também promovem alterações no eritrócito e o deslocamento do núcleo. A amostra Hep 75 possui citoplasma azurofílico assim como *H. massardii*, e é possível observar grânulos no citoplasma como em *H. cepavii*.

O agrupamento III - Formado por quatro amostras obtidas nesse estudo e uma espécie descrita formalmente utilizando microscopia e técnicas moleculares. *Hepatozoon cuestensi* foi inicialmente descrita infectando *Crotalus durissus* também na região de Botucatu (O'Dwyer et al., 2013). As quatro amostras desse agrupamento e *H. cuestensi* apresentam citoplasma azurofílico, promovem a alteração do eritrócito, deslocamento do núcleo e apresentam características nucleofílicas. As amostras Hep 27 e Hep 28 são

provenientes de *B. jararaca* de vida livre, tendo sido capturadas em Jujutiba (São Paulo). Entre as amostras é possível observar a formação de grânulos no citoplasma e morfologia semelhante como observado nas figuras 12 e 13. A amostra Hep 3 foi extraída em uma coleta oportuna de *Tupinambis* sp. e adicionada ao estudo como forma de teste do funcionamento do protocolo em outro grupo de Squamata.

O agrupamento IV - Composto por seis espécies descritas em anfíbios, sendo elas: *H. theileri*, *H. magna*, *H. ixoxo*, *H. cf. clamatae*, *H. cf. catesbiana* e *H. catesbiana*. A espécie *H. theileri* foi descrita na África do Sul em *Amietia quecketti* (Netherlands et al., 2014a) e apresenta citoplasma basofílico, promove alterações no eritrócito, deslocamento do núcleo e característica nucleofílicas. *Hepatozoon ixoxo* que também foi descrito na África do Sul em espécies do gênero *Amietophrynus* (Netherlands et al., 2014b). Os exemplares de *H. magna*, *H. cf. clamatae* e *H. cf. catesbiana* utilizados nesse estudo foram descritos na França apenas utilizando técnicas moleculares, sendo que *H. magna* foi encontrado parasitando *Pelophylax kl. Esculentus*, *H. cf. clamatae*, *H. cf. catesbiana* e *Rana clamitans* (Barta et al., 2012). Já *H. catesbiana* foi descrito na Índia infectando *Rana catesbeiana* (Mathew et al., 2000). É possível notar que com exceção de *H. magna* todas as outras espécies foram descritas infectando anfíbios da família Ranidae.

O agrupamento V - Formado pela espécie *H. sipedon*, descrita em *Nerodia sipedon* no Canadá utilizando microscopia e biologia molecular (Smith et al., 1994) e a amostra Hep 118 coletada em *Chironius flavolineatus* na cidade de São Paulo. A amostra Hep 118 e a espécie *H. sipedon* foram encontradas em indivíduos da família Columbridae, o parasita promove o deslocamento do núcleo da célula infectada além de alterar a morfologia do eritrócito. Entretanto *H. sipedon* e Hep 118 possuem tamanhos e formatos diferentes.

Com base na topologia da árvore e comparando as amostras desse estudo, nota-se que a maior parte das novas amostras obtidas nesse estudo, concentram-se no agrupamento III e, apesar das semelhanças compartilhadas entre elas, o teste de confiança (*bootstrap*) para esse agrupamento também fica abaixo de 75%, com exceção das amostras Hep 27 e Hep 28 que são agrupadas com 87%.

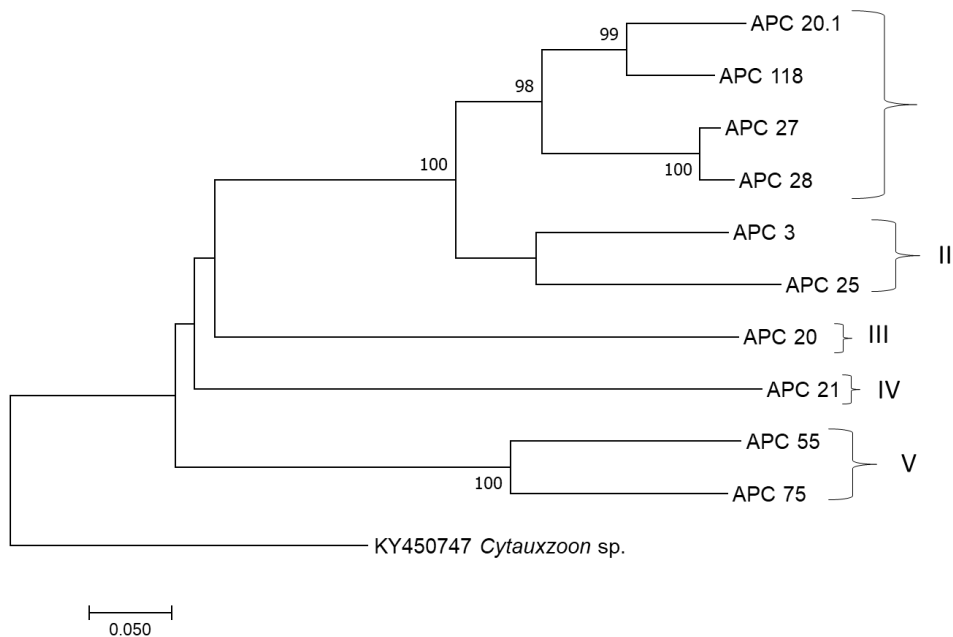


Figura 21– Topologia filogenética obtida para as amostras APC 3, APC 20, APC 20.1, APC 21, APC 25, APC 27, APC 28, APC 55, APC 75 E APC 118 utilizando o método de Neighbor-Joining e distância-p, baseado na sequência de Apicoplasto target SSU rRNA. O número indica os resultados da análise de bootstrap com 1000 repetições.

Com base na topologia da árvore filogenética para o “target” Apicoplasto é possível observar a formação de cinco agrupamentos definindo a proximidade entre as amostras, sendo que a amostra 20 apresenta dividida em APC 20 com 348 pb e APC 20.1 com 292 pb.

No agrupamento I - Formado pelas amostras APC 20.1, APC 118, APC 27 e APC 28, é possível observar dois subgrupos sendo o primeiro formado pelas amostras APC 20.1 e APC 118 e o segundo APC 27 e APC 28. A amostra APC 20.1 foi isolada de *Spilotes pullatus* e a amostra Hep 118 de *C. flavolineatus*. Foi possível observar que a primeira apresenta citoplasma azurofílico e a segunda basofílico. As amostras APC 27 e APC 28 foram isoladas de *B. jararaca* e também possuem citoplasma azurofílico, porém com presença de grânulos, todas as amostras desse grupo promovem alterações no eritrócito, deslocamento do núcleo e característica nucleofílica. Com base na análise da topologia de árvore gerada para o gene 18S rRNA, as amostras 27 e 28 também foram agrupadas com valor de bootstrap em 100%.

O agrupamento II- É formado por duas amostras coletadas em lagartos do gênero *Tupinambis*. A presença desse parasita nesse gênero de lagarto foi

descrita apenas morfológicamente por Pessoa e colaboradores em 1974. Assim como descrito pelos autores, as amostras desse agrupamento também apresentaram alterações do eritrócito e deslocamento do núcleo. Apesar de serem amostras coletadas de *Tubinambis* sp., nota-se que o valor de bootstrap fica abaixo dos 75%, indicando uma provável distância entre as espécies.

O agrupamento III – Constitui-se apenas pela amostra APC 20 que foi representada como APC 20 e APC20.1. Durante amplificação do PCR, duas bandas, de tamanhos diferentes, foram obtidas no gel e submetidas ao sequenciamento. Após análise filogenética, as duas se posicionaram separadamente, indicando a possibilidade de serem diferentes entre elas, ou que houve interferência no PCR por conta dessa morfologia diferenciada. Com base nos achados microscópicos, essa amostra apresentou 2 morfologias distintas, o que pode ser o indicativo dessa separação quando gerada a topologia da árvore.

Agrupamento IV - Composto pela amostra APC 21, que possui três morfologias diferentes quando observada na microscopia, sendo duas com citoplasma basofílico e uma azurofílico e, todas, apresentam alterações no eritrócito, deslocamento do núcleo e características nucleofílicas.

O agrupamento V - Formado pelas amostras APC 55 e APC 75 e com teste de confiança (bootstrap) em 100%, apresentam citoplasma basofílico e azurofílico com grânulos, respectivamente. APC 55 não altera o eritrócito nem a posição do núcleo, enquanto APC 75 promove alterações e deslocamento do núcleo.

De acordo com a análise filogenética preliminar e busca no banco de dados (GenBank), nenhuma sequência para o alvo está disponível, sendo os resultados apresentados nesse trabalho inéditos. Vale ressaltar a necessidade de melhor explorar o “alvo” APC como um possível marcador molecular na diferenciação dentro do grupo *Hepatozoon*. Uma estratégia alternativa e complementar seria aumentar o tamanho do fragmento analisado, porém se faz necessário também ressaltar a dificuldade em amplificação para esse alvo sem que haja à amplificação de fragmentos inespecíficos. Com a possível utilização do “target” Apicoplasto associado ao gene Hep, a abordagem de junção (concatenação) dos fragmentos e aumento da sequência, a informação poderá

ser eficaz na diferenciação das espécies encontradas para as amostras utilizadas nesse estudo.

#### **4.4 Parasitas e conservação das espécies**

Os estudos relacionados com a conservação dos parasitas despertam pouco interesse dos pesquisadores. A maioria dos estudos envolvendo parasitas é voltada para saúde humana ou de animais domésticos, principalmente com aqueles que apresentam algum potencial zoonótico. Isso se deve, provavelmente, à dificuldade em estudar esses organismos, considerando seu pequeno tamanho, ciclos de vida complexos, problemas de definição taxonômica, e grande dificuldade em quantificar os reais efeitos nas espécies hospedeiras de vida livre (Gómez e Nichols, 2013). Poucas espécies de parasitas apresentam listadas na lista de espécies ameaçadas da IUCN, sendo, a maioria, ectoparasitas (Whiteman e Parker, 2005).

Considerando que os parasitas representam uma parte importante da biodiversidade do planeta, somente uma pequena parte é conhecida e o número de espécie apenas estimado (Nadler e León, 2011). Isso é bem explícito quando se trata de Apicomplexa, pois se estima que cerca de 0,1% do filo foi descrito (Adler et al., 2007; Morrison, 2009). Embora os parasitas devam chamar atenção para sua conservação apenas pela alta biodiversidade que o grupo apresenta ou pelo importante papel que desempenham no ecossistema, a importância desses parasitas e o impacto que podem provocar acabam sendo subestimados pela aparente pressão causada pelo homem (Thompson et al., 2010; Tomé et al., 2012). Por isso, realizar uma coleção de dados e análises da diversidade, ecologia dos parasitas no ecossistema e estudos mais aprofundados dessa relação parasita-hospedeiro é extremamente importante para a conservação da fauna principalmente devido aos impactos que eles podem causar nas populações (Thompson et al., 2010).

Esses organismos podem afetar diretamente o sucesso de um programa de conservação pela influência que eles têm no balanço energético e no fitness do hospedeiro, podendo até mesmo deixar o hospedeiro estéril (Lafferty e



Kuris, 2009), além de comprometendo o sucesso da prole com baixas taxas de crescimento e sobrevivência.

#### 4.4.1 Importância do estudo de *Hepatozoon* spp. para conservação

Estudos com *Hepatozoon* spp. ainda são escassos e limitados, principalmente com serpentes e de seus reais impactos no hospedeiro. Embora normalmente seja descrito como sendo uma infecção assintomática, quando encontrado em hospedeiros não naturais ou em ambientes que promovem o aumento dessa carga parasitária, como o cativeiro, são encontrados relatos de esplenomegalia, hepatite necrosante, anemia hemolítica, doenças inflamatórias e problemas neurais já foram descritos em serpentes (Griner, 1983; Wosniak et al., 1994; Campbell, 1996; Wosniak et al., 1996). Além desses sintomas, em estudo realizado por Madsen e colaboradores (2005), a infecção por *Hepatozoon* spp. resultou em significativa redução no crescimento de fêmeas na natureza, o que também interfere na diminuição do fitness dos indivíduos infectados. Estes e outros estudos dão ênfase ao impacto que a infecção por *Hepatozoon* spp. pode ter no hospedeiro sem que o mesmo apresente sintomas, justificando o quão importante é a realização de estudos aprofundados com esse parasita, principalmente para ecologia e conservação das espécies.

Devido a esse potencial em causar doenças nos hospedeiros não naturais, a presença desses parasitas em cativeiro é considerada uma ameaça à saúde e ao bem-estar animal (Keymer, 1974; Primarck, 2001; Panayotova-Pencheva, 2013), uma vez que diversas espécies estão coexistindo na mesma área, os estudos de diagnóstico se mostram essenciais para a conservação das espécies, principalmente *Ex situ*.

## 5. Conclusões

- a) A microscopia se mostrou uma técnica eficiente para identificação de Hemogregarinas.
- b) Os autores descrevem morfologicamente 121 espécies de *Hepatozoon* spp. em répteis, portanto esse número pode diminuir ou aumentar consideravelmente com o uso de técnicas moleculares.
- c) O PCR se mostrou menos sensível quando aplicado em amostras com possível infecção mista.
- d) Mais estudos envolvendo o “target” Apicoplasto podem auxiliar na identificação de *Hepatozoon* e demais parasitas do grupo das hemogregarinas.
- e) Esse seria um bom protocolo a ser aplicado comercialmente no mercado de Pets exóticos.

## 6. Considerações finais

Conservar uma espécie vai além da tentativa para aumentar o número de indivíduos da população e promover o fluxo gênico. Para conservar uma espécie é preciso entender todo o sistema em que ela está e será inserida, seja em vida livre ou cativo. Assim, estudos de diagnóstico se tornam uma nova ferramenta para compreender as interações parasita-hospedeiro presentes no ambiente e a influência direta e indireta na conservação da espécie alvo. Também é necessário firmar que conservação da fauna inclui ambientes *ex situ* e *in situ*, assim, é fundamental que pesquisadores considerem estudos de diagnóstico em populações em áreas naturais e de cativeiro.

## 7. Referências

Albon, S. D.; Stien, A.; Irvine, R. J.; Langvatn, R.; Ropstad, E.; Halvorsen, O. (2002). The role of parasites in the dynamics of a reindeer population. **The Royal Society**, 269:1625–1632.

Allen, K. E.; Yabsley, M. J.; Johnson, E. M.; Reichard, M. V.; Panciera, R. J.; Ewing, S.; Little, S. E. (2011). Novel *Hepatozoon* in vertebrates from the southern United States. **The Journal of Parasitology**, 97(4):648-653

Altizer, S.; Harvell, D.; Friedle, E. (2003). Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. **Trends in Ecology and Evolution**, 18(11): 589-596.

Ball, G. H., Chao, J., Telford, S. R. Jr. (1967). The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae) and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). **Journal of Parasitology**, 53 (5): 897-909.

Baneth, G.; Samish, M.; Shkap, V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* (apicomplexa: adeleorina: hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal of Parasitology**, 93(2):.283-299.

Barraclough, R. K.; Robert, V.; Peirce, M. A. (2008). New species of haematozoa from the avian families Campephagidae and Apodidae. **Parasite**, 15:105–110.

Barta, J. R. (1989). Phylogenetic analysis of the class Sporozoea (phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. **The Journal of Parasitology**, 75(2):195-206.

Barta, J. R.; Ogedengbe, J. D.; Martin, D. S.; Smith, T. G. (2012). Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 59(2):171-180.

Begon, M.; Townsend, C. R.; Harper, J. L. (2007). *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. 4ª ed., Porto Alegre, Artmed, 740pp.

Biasi, P.; Cardoso Junior, R.B.; Santos, S.M.A. (1989). Presença de *Hepatozoon plimмери* (Sambom, 1909) - Coccidia, Haemogregarinidae - em exemplar de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) - Serpentes, Viperidae, Crotalinae - mantido em cativeiro. **Memórias do Instituto Butantan**, 51:117-121.

Brown, G. P.; Shilton, C. M.; Shine, R. (2006). Do parasites matter? Assessing the fitness consequences of haemogregarine infection in snakes. **Canadian Journal of Zoology**, 84(12):668-676.

Borges, C. E. F.; Figueiró, B. S.; Gomide, C. R.; Alvarenga, T. M. P.; Neto, F. D. M. (2015). Alterações Hematológicas em cães infectados pelo *Hepatozoon canis*. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 13(3):6-11.

Calvete, J. J.; Ju, P.; Sanz, L. (2007). Snake venomomics: Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, 42:1405–1414.

Campbell, K. R.; Campbell, T. S. (2001). The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: A review. **Environmental Monitoring and Assessment**, 70(3):253-301.

Chaves, L. F.; Chuang, T. W.; Sasa, M.; Gutierrez, J. M. (2015). Snakebites are associated with poverty, weather fluctuations, and El Niño. **Science Advances**, 1(8):1-6.

Chiareli, R. A. (2009). Investigação clínico-laboratorial e molecular da infecção por *Hepatozoon canis* em cães da região periurbana de Brasília. Dissertação de mestrado em saúde animal. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília.

Conrad, J. L. (2008). Phylogeny and systematics of Squamata (reptilia) based on morphology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 310:1-182.

Costa, H. C.; Bérnils, R. S. (2015). Répteis brasileiros: lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, 4(3):75-92.

Davies, A. J. (1995). The Biology of Fish Haemogregarines. **Advances in Parasitology**, 36:117-203.

Davies, A. J.; Johnston, M. R. (2000). The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. **Advances in parasitology**, 45:1-107.

Desser, S. S.; Hong, H.; Martin, D. S. (1995). 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. **The Journal of Parasitology**, 81(2): 212-222.

Escoubas, P.; King, G. F. (2009). Venomics as a drug discovery platform. **Expert Review of Proteomics**, 6(3):221-224.

Gazzinelli, S. (2016). Apostila de parasitologia. Disponível em: <[http://www.fernandosantiago.com.br/fic\\_papo.pdf](http://www.fernandosantiago.com.br/fic_papo.pdf)>. Acesso em: 26/01/2017

Gómez, A.; Nichols, E. (2013). Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, 2:222–227.

Harris, C. N.; Coonan, T. J.; King, J. L.; Dunn, R. R. (2013). Endemism in host–parasite interactions among island populations of an endangered species. **Diversity and Distributions**, 19:377–385.

Hatcher, M. J.; Dick, J. T. A.; Dunn, A. M. (2012). Diverse effects of parasites in ecosystems: linking independent processes. **Ecological Society of America**, 10(4):186-194.

Hudson, P. J.; Dobson, A. P.; Lafferty, K. D. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? **Trends in Ecology and Evolution**, 21(7):381–385.

International Union for Conservation of Nature (2016). Redlist. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/search>>. Acesso em 10/05/2017.

Lane, T. J.; Mader, D. R. (1996). Parasitology. In: Mader DR. Reptile Medicine and Surgery. Philadelphia, W.B. Saunders, 1242pp.

Madsen, T.; Ujvari, B.; Olsson, M. (2005). Old pythons stay fit: effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. **Oecologia**, 142:407-412.

Morand, S.; Krasnov, B. R. (2010). The Biogeography of Host–Parasite Interactions. 1ª ed, New York, Oxford University Press, 288pp.

Raxworthy, C.J.; Pearson, R.G.; Zimkus, B.M.; Reddy, S.; Deo, A.J.; Nussbaum, R.A.; Ingram, C.M. (2008). Continental speciation in the tropics: contrasting biogeographic patterns of divergence in the *Uroplatus* leaf-tailed gecko radiation of Madagascar. **Journal of Zoology**, 275:423–440.

The Reptile Database 2016. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em: 18/10/2017.

Schmidt, G. D.; Roberts, L. S. (2009). Foundations of parasitology. 8ªed, New York, McGraw-Hill, 720pp.

Smith, T. G. (1996). The genus *Hepatozoon* (apicomplexa:adeleina). **The Journal of Parasitology**, 82(4):565-585.

Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. **World Journal of Biological Chemistry**, 6(2):28-33.

Vetter, I.; Davis, J. L.; Rash, L. D.; Anangi, R.; Mobli, M.; Alewood, P. F.; Lewis, R. J.; King, G. F. (2011). Venomics: a new paradigm for natural products-based drug Discovery. **Amino Acids**, 40:15–28.

Warrell, D. A. (2012). Venomous Bites, Stings, and Poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, 26(2):207–223.

# **Anexos**





**Anexo 2:** Matriz de similaridade obtida a partir do alinhamento das sequências geradas para o “target” Apicoplasto utilizando o modelo de distância p.

APC 3										
APC 20	0,667									
APC 20.1	0,320	0,620								
APC 21	0,667	0,687	0,660							
APC 25	0,267	0,693	0,440	0,647						
APC 27	0,280	0,573	0,247	0,693	0,420					
APC 28	0,267	0,593	0,273	0,713	0,427	0,033				
APC5 5	0,660	0,720	0,687	0,680	0,673	0,673	0,660			
APC 75	0,673	0,680	0,653	0,727	0,693	0,640	0,633	0,273		
APC1 18	0,227	0,627	0,127	0,687	0,413	0,187	0,207	0,667	0,633	
KY450747 <i>Cytauxzoon</i> sp	0,700	0,640	0,673	0,673	0,687	0,700	0,700	0,653	0,667	0,707

**Anexo 3:** Artigo publicado no Journal of Entomology and Zoology Studies.  
“Hemogregarine parasites in wild captive animals, a broad study in São Paulo Zoo”. Calil et al., 2017.



E-ISSN: 2320-7078

P-ISSN: 2349-6800

JEZS 2017; 5(6): 1378-1387

© 2017 JEZS

Received: 16-09-2017

Accepted: 20-10-2017

**Priscila Rodrigues Calil**

(A) Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luiz Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

(B) Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

**Irys Hany Lima Gonzalez**

Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

**Paula Andrea Borges Salgado**

Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

**João Batista da Cruz**

(A) Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luiz Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

(B) Technical-Scientific Directory, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

**Patrícia Locosque Ramos**

(A) Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luiz Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

(B) Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

**Carolina Romeiro Fernandes Chagas**

Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

**Correspondence****Carolina Romeiro Fernandes Chagas**

Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation Foundation, Av. Miguel Estéfano 4241, São Paulo, SP 04301-905, Brazil

## Hemogregarine parasites in wild captive animals, a broad study in São Paulo Zoo

**Priscila Rodrigues Calil, Irys Hany Lima Gonzalez, Paula Andrea Borges Salgado, João Batista da Cruz, Patrícia Locosque Ramos and Carolina Romeiro Fernandes Chagas**

### Abstract

Hemogregarine is a group of blood parasites that infect a wide variety of vertebrates and hematophagous invertebrates. The signs of infection can range from anemia to severe interference in host's fitness. The purpose of this study was to gather information from the database available at the Clinical Analyses Laboratory at São Paulo Zoo Foundation in the last ten years and determine the occurrence of hemogregarine parasites in captive animals of the São Paulo Zoo Foundation. The analysis was conducted on the haemoparasitic results from 2972 blood samples, of 1637 individuals of all terrestrial vertebrate group (mammals, birds, reptiles and amphibians). Positive results were observed in 1.1% of the individuals and this parasite was found only in reptiles and amphibians. The lack of study with hemogregarine parasites infecting reptiles and amphibians is evident; this work will contribute to the knowledge of parasitological data for captive animals in future works.

**Keywords:** haemoparasites, *Hepatozoon*, reptile, amphibian, Apicomplexa

### 1. Introduction

Apicomplexan parasites from Adeleina suborder are recognized as hemogregarine and are composed of six genera: *Cyrtilia*, *Desseria*, *Haemogregarina*, *Hemolivia*, *Hepatozoon*, and *Karyolysus* [1-3]. *Cyrtilia* and *Desseria* are known as fish parasites and are transmitted by leeches [1, 4]. *Haemogregarina* can be found in aquatic and terrestrial hosts, such as fishes, turtles, tortoises and amphibians, being transmitted by leeches, mosquitoes and ticks [1, 5]. *Hemolivia* has only three species described so far, the reports consisting of infections in amphibians and tortoises, being transmitted by ticks, and is the only hemogregarine parasite that has erythrocyte merogony [6]. The most known parasite of this group is *Hepatozoon*, which has been reported in mammals, birds, amphibians and reptiles and can be transmitted by ticks and mosquitoes or by ingestion of another infected vertebrate host [2, 3, 7]. *Karyolysus* has been reported in lizards from Europe and Asia and has as the only vector the mite *Ophionyssus* sp. [8]. Traditionally, studies that identified these parasites used only erythrocytic stage of development, and these descriptions are based on the measure of the length and width of gamont and its nucleus [3, 7, 9]. Despite that, differentiating the parasite genera using only morphological features of blood stages can be difficult and it is not recommended by many authors [1, 2, 10]. Nevertheless, parasites' morphology can vary according to the technique used to made blood smears [8], and is already known, for other intraerythrocytic parasites, that they can have some morphological variations depending on their hosts [11]. To describe new species and identify parasite genus it is recommended to combine data of its ultrastructural features, blood, tissue and vector development stages [1, 2, 9].

Even, there is few data about clinical symptoms for five of six genera of these parasites; for *Hepatozoon* they are better known, especially for mammals [12]. Notwithstanding the fact that infections in wild animals are usually subclinical [13, 14], some symptoms have been associated with anaemia, erythrocyte hypertrophy, haemoglobin loss and alterations in the plasma membrane of erythrocytes [15]. Although the lack of information about the effects of hemogregarine infections in their hosts, it is well known that parasites can influence the fitness, life cycle and even reproduction and offspring survival rates [16-18].

Zoos and aquariums have the role to promote a clear view of the contribution that they can make as stakeholders of the global conservation efforts [19].

So, taking this into consideration, the objective of this work was to gather the information available in the database of the clinical analyses laboratory during the last nine years and report the occurrence of hemogregarine parasites in captive wild animals from São Paulo Zoo Foundation.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Study area

São Paulo Zoo Foundation (SPZF) is located inside the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, one of the most important remaining fragments of the Atlantic Rain Forest in São Paulo City that harbors some of the Ipiranga stream and shelter dozens of native species. Since 1958, SPZF provides interaction with nature and technical professional training, and lately, has been intensely involved in scientific research, integrated actions for *ex situ* and *in situ* conservation of wildlife, effective participation in national plans for maintenance and reproduction of endangered native species allied to education programs to promote citizenship and conscience on environmental awareness<sup>[20]</sup>.

### 2.2 Population studied and sample preparation and analysis

This study conducted a retrospective analysis of hemogregarine parasites in wild captive animals using the results of exams of 2972 blood samples collected from 1637 individuals, including 639 avian, 616 mammals, 375 reptiles, and seven amphibians. The avian group is represented by 130 species of 26 different families (Table 1); mammals by 96 species and 32 families (Table 2); reptiles by 66 species of 21 families (Table 3); and amphibian by four species and three families (Table 4). All exam that presented positive results for hemogregarine or *Hepatozoon* sp. were considered positive for this study.

The samples were collected during the veterinary routine for preventive or emergency exams and sent to the Clinical Analyses Laboratory at SPZF, in the period of April 2007 to May 2016. Laboratory already has a protocol for blood collection and processing, blood smears are prepared with or without the anticoagulants (EDTA or lithium heparin); air dried and stained using Rosenfeld technique<sup>[21]</sup> for reptiles, amphibians and birds, while mammals had their smears stained by a rapid stain Instant-Prov (New Prov). Each blood smear has 100 field examined under low magnification (400X) and in oil immersion (1000X)<sup>[22]</sup>.

## 3. Results

Hemogregarine infections were found in 0.8% of evaluated samples (23/2972). The positive cases represented 1.1% of all individuals sampled (18/1637), but only reptiles and amphibians were positive (Table 5). The positive results represented 3% reptiles sampled (20/672) and 42.8% of amphibians sampled (3/7). The parasite was present in 18 individuals: one lizard, three amphibians and 14 snakes (Table 6).

The parasite was found in seven species of snakes (*Hydrodynastes gigas*, *Eunectes murinus*, *Epicrates chenchria*, *Corallus caninus*, *Boa constrictor*, *Spilotes pullatus*, *Corallus hortulanus*), one species of lizard (*Varanus doreanus*) and in two species of amphibians (*Rhinella marina*, *Rhinella schneideri*). All birds and mammals that had their results analyzed were negative for hemogregarine infections.

## 4. Discussion

The analysis of results of the microscopic examination to

detect the presence of hemogregarine parasites in blood smears of captive wild animals was conducted at the Laboratory of Clinical Analyses of SPZF, using samples processed during the last ten years, and it is one of the largest studies done in this field.

It is known that Hemogregarine parasites have very similar morphological characteristics, being hard to differentiate them in their blood stage using only microscopic analysis<sup>[1, 2]</sup>. These parasites infects erythrocytes which can be deformed during blood smears preparation, affecting parasite shape if this procedure is not properly done<sup>[8, 23]</sup>. On the other hand, prior studies have suggested that hemogregarines found in reptiles and birds should be referred as *Hepatozoon*<sup>[1, 3]</sup>. For that reason, it is suggested that hemogregarine found in this study belong to genus *Hepatozoon*.

This study had seven species of snakes with infection by hemogregarine infections, all of them had already been described harboring these parasites<sup>[24, 25]</sup>. The only positive lizard was *Varanus doreanus*, but there is no report of *Hepatozoon* spp. infections in this host.

The prevalence of infections found in this study (1.1%) is lower than infections found by *Hepatozoon* sp., the most common hemoparasite found in reptiles<sup>[7]</sup>, with the prevalence ranging from 8% to 48%<sup>[26-29]</sup>. Among the reptiles that have been described as infected with this parasite, the most common are *Boa constrictor*<sup>[30-32]</sup> and *Crotalus durissus*<sup>[32-34]</sup>. Besides the varieties of *Hepatozoon* spp. found in snakes, it is worth to highlight the presence of this parasite in *Caiman c. crocodilus*<sup>[35]</sup>, *Gecko gecko*<sup>[36]</sup> and tuataras species<sup>[37]</sup>, in the present study there was no infections by hemogregarine in any of *Caiman* sp. or *Gecko* sp.

In the amphibians group, the parasite was found in two species of toads, there was not was found any literature report for *Hepatozoon* spp. infections in the toad species that were positive in this study; despite of that, these infections should be more carefully investigated to confirm the hemogregarine species involved in the infections. The prevalence of infections in amphibians was of 42.8% in this study, which corroborates with the literature that shows prevalence in amphibian ranging between 2.6% to 75.4% and can vary seasonally over spring and winter<sup>[38-40]</sup>. *Hepatozoon* spp. were already reported infecting mainly *Rana catesbeiana*<sup>[35, 39, 41, 42]</sup>, *Rana clamitans*<sup>[39, 41-44]</sup>, *Rana pipiens*<sup>[42, 45]</sup>; but can also infects *Seychelles caecilians*<sup>[46]</sup>, *Amietia queckettii*<sup>[40]</sup>, *Leptopelis christyi*, *Leptopelis kivuensis*, *Ptychadena mascareniensis*<sup>[47]</sup>, *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*<sup>[38]</sup>, *Rana pretiosa*<sup>[48]</sup> and *Hoplobatrachus rugulosus*<sup>[49]</sup>, but these studies were carried out only in wildlife animals. About the body size of the amphibians studied, it is important to highlight the difficulty to obtain adequate blood sample volume for analysis in small animals, such as the body size of most captive amphibians at SPZF. For this reason, this data does not represent a characteristic of our collection and they should be analyzed carefully.

There was not any positive bird species for hemogregarine infections in this study. *Hepatozoon* species found in birds are relatively uncommon and little is known about its life cycle, symptoms and virulence in infected animals<sup>[50]</sup>. Some authors described many species of *Hepatozoon* in birds<sup>[51-53]</sup>, but the use of molecular techniques showed that some of them were from *Lankesteria* sp. and not *Hepatozoon* sp. Although the presence of *Hepatozoon* is rare in birds, the most part of findings was in water birds. Frequency of *Hepatozoon* sp. infections in *Oceanodroma* spp. was reported as 42.5%<sup>[54]</sup>; and the parasite was found in the freshwater birds

*Acrocephalus arundinaceus* and *Acrocephalus scirpaceus* <sup>[55]</sup>. A prevalence of 31.2% based on microscopy was also registered in *Cyanistes caeruleus* <sup>[56]</sup>.

The presence of hemogregarine in mammals was not verified in the present study. Despite of that, they can infect a wide variety of mammals, mainly in canids and felids, and the study of the host-parasite relationship has increased in the past decade due to its veterinary importance <sup>[57]</sup>. A molecular survey realized in different Brazilian zoos with this parasite in captive canids, found *Hepatozoon* spp. in bush dogs in the same study site of the present study <sup>[58]</sup>. For Brazilian mammals, a *Hepatozoon* spp. prevalence of 78.2% was registered in *Cerdocyon thous* and 71.4% in *Leopardus pardalis* <sup>[59]</sup>. *Hepatozoon* was also detected in *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* <sup>[60]</sup>. For exotic species of mammals, this parasite was found in five out of nine *Panthera leo*, two out of five *Panthera tigris tigris*, two out of four *Panthera pardus* and described a *Hepatozoon ursi* in *Melursus ursinus* <sup>[61, 62]</sup>. Some other studies show that *Hepatozoon* spp. can

occur in *Vulpes vulpes* <sup>[63]</sup> and *Canis mesomelas* <sup>[64]</sup>.

Around 45% of reptile and 85% of amphibians species had their conservation status evaluated by International Union for Conservation of Nature Redlist (IUCN) <sup>[65]</sup>; knowing the conservation status of positive animals is as important as know the fitness influence that hemogregarine parasites cause in their hosts, especially in wildlife conservation field. The IUCN classifies *Corallus caninus*, *Corallus hortulanus*, *Rhinella marina*, *Rhinella schneideri* and *Varanus doreanus* as least concern, while *Eunectes murinus*, *Spilotes pullatus* and *Boa constrictor* are classified as not threatened <sup>[65]</sup>. There is no data for *Hydrodynastes gigas* in IUCN Redlist, but is classified as endangered by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade <sup>[66]</sup>. There is no data about the conservation status for *Epicrates chenchria*. All of the positive species are native from Brazil, except for *Varanus doreanus* that is native from Australia, Indonesia and Papua New Guinea <sup>[65]</sup>.

**Table 1:** Species of birds sampled in this study

Specie	N	n
<i>Acridotheres cristatellus</i>	2	2
<i>Alopochen aegyptiaca</i>	11	8
<i>Amazona aestiva</i>	27	10
<i>Amazona amazonica</i>	3	3
<i>Amazona brasiliensis</i>	8	8
<i>Amazona farinosa</i>	5	3
<i>Amazona festiva</i>	9	7
<i>Amazona ochrocephala</i>	9	3
<i>Amazona rhodocorytha</i>	5	4
<i>Amazona vinacea</i>	10	7
<i>Amazonetta brasiliensis</i>	6	4
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	39	26
<i>Anodorhynchus leari</i>	25	15
<i>Anser anser</i>	1	1
<i>Anser cygnoides</i>	1	1
<i>Ara ararauna</i>	7	5
<i>Ara chloropterus</i>	6	3
<i>Ara macao</i>	11	4
<i>Ara rubrogenys</i>	5	5
<i>Ara severus</i>	2	2
<i>Aramides cajaneus</i>	1	1
<i>Aratinga jandaya</i>	6	2
<i>Aratinga nenday</i>	6	3
<i>Asio stygius</i>	4	3
<i>Balearica regulorum</i>	12	8
<i>Branta canadensis</i>	1	1
<i>Brotogeris tirica</i>	1	1
<i>Bubo virginianus</i>	3	1
<i>Buceros rhinoceros</i>	8	1
<i>Bucorvus abyssinicus</i>	11	4
<i>Buteogallus coronatus</i>	7	3
<i>Buteogallus lacernulata</i>	10	5
<i>Buteogallus meridionalis</i>	5	4
<i>Buteogallus urubitinga</i>	4	2
<i>Cacatua alba</i>	1	1
<i>Cacatua galerita</i>	6	2
<i>Cacatua moluccensis</i>	1	1
<i>Cacatua s. citrinocristata</i>	1	1
<i>Caracara plancus</i>	4	1
<i>Cariama cristata</i>	6	2
<i>Cereopsis novaehollandiae</i>	21	9
<i>Chauna torquata</i>	3	2
<i>Chenonetta jubata</i>	8	2
<i>Chunga burmeisteri</i>	14	5
<i>Coscoroba coscoroba</i>	20	18
<i>Crax blumenbachii</i>	1	1

<i>Crax rubra rubra</i>	1	1
<i>Cyanopsitta spixii</i>	4	2
<i>Cygnus atratus</i>	80	65
<i>Cygnus melanocoryphus</i>	28	19
<i>Dendrocygna bicolor</i>	4	1
<i>Dendrocygna viduata</i>	8	7
<i>Deropteryx accipitrinus</i>	4	2
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	9	6
<i>Egretta thula</i>	1	1
<i>Eos bornea</i>	4	4
<i>Eudocimus ruber</i>	7	6
<i>Eupsittula aurea</i>	3	3
<i>Falco femoralis</i>	4	2
<i>Geranoaetus albicaudatus</i>	4	2
<i>Geranoaetus melanoleucos</i>	7	3
<i>Graydidascalus brachyurus</i>	1	1
<i>Guaruba guaruba</i>	10	6
<i>Gypohierax angolensis</i>	1	1
<i>Haliaeetus vocifer</i>	4	1
<i>Harpia harpyja</i>	17	10
<i>Leptodon cayanensis</i>	1	1
<i>Megascops choliba</i>	6	4
<i>Milvago chimachima</i>	2	1
<i>Mitu tomentosum</i>	6	4
<i>Mitu tuberosum</i>	1	1
<i>Musophaga violacea</i>	3	3
<i>Netta erythrophthalma</i>	2	2
<i>Nothocrax urumutum</i>	5	4
<i>Nymphicus hollandicus</i>	1	1
<i>Odontophorus capueira</i>	2	2
<i>Pavo cristatus</i>	52	35
<i>Pavo muticus</i>	1	1
<i>Pelecanus onocrotalus</i>	3	3
<i>Penelope sp.</i>	2	2
<i>Phoeniconaias minor</i>	2	2
<i>Phoenicopterus chilensis</i>	49	37
<i>Pionites leucogaster</i>	12	8
<i>Pionopsitta pileata</i>	1	1
<i>Pionus fuscus</i>	6	4
<i>Pionus maximiliani</i>	2	2
<i>Pionus menstruus</i>	9	4
<i>Pipile jacutinga</i>	6	3
<i>Platalea ajaja</i>	1	1
<i>Plectropterus gambensis</i>	6	4
<i>Poicephalus senegalus</i>	9	2
<i>Primolius auricollis</i>	3	3
<i>Primolius maracana</i>	5	2
<i>Psarocolius decumanus</i>	2	1
<i>Pseudastur polionota</i>	1	1
<i>Pseudoscops clamator</i>	15	3
<i>Psittacara leucophthalmus</i>	4	2
<i>Psittacus erithacus erithacus</i>	1	1
<i>Pteroglossus aracari</i>	17	5
<i>Pteroglossus bailloni</i>	9	4
<i>Pteroglossus castanotis</i>	2	2
<i>Pteroglossus inscriptus</i>	1	1
<i>Pulsatrix koeniswaldiana</i>	2	2
<i>Pulsatrix perspicillata</i>	9	4
<i>Pyroderus scutatus</i>	2	1
<i>Pyrrhura frontalis</i>	7	3
<i>Pyrrhura lepida lepida</i>	10	9
<i>Pyrrhura perlata</i>	4	2
<i>Ramphastos dicolorus</i>	32	7
<i>Ramphastos toco</i>	34	11
<i>Ramphastos tucanus</i>	28	5
<i>Ramphastos vitellinus</i>	16	3
<i>Rhea americana</i>	4	4
<i>Rupicola rupicola</i>	1	1
<i>Sarcoramphus papa</i>	16	8

<i>Selenidera maculirostris</i>	41	11
<i>Spheniscus magellanicus</i>	22	7
<i>Spizaetus ornatus</i>	24	10
<i>Spizaetus tyrannus</i>	12	6
<i>Struthio camelus</i>	20	15
<i>Tadorna ferruginea</i>	16	7
<i>Tadorna radjah</i>	8	2
<i>Tadorna tadornoides</i>	8	2
<i>Tadorna variegata</i>	2	1
<i>Tauraco leucotis</i>	5	4
<i>Theatocercus acuticaudatus</i>	3	2
<i>Therisdicus caudatus</i>	1	1
<i>Trigonoceps occipitalis</i>	9	1
<i>Tyto alba</i>	6	4
<i>Vultur gryphus</i>	2	1

N= number of samples; n= number of individuals.

**Table 2:** Species of mammals sampled in this study

Specie	N	n
<i>Addax nasomaculatus</i>	34	7
<i>Aepyceros melampus</i>	4	1
<i>Alouatta caraya</i>	15	3
<i>Alouatta guariba clamitans</i>	14	4
<i>Ammotragus lervia</i>	21	5
<i>Aotus trivirgatus</i>	4	2
<i>Ateles chamek</i>	4	4
<i>Ateles marginatus</i>	7	3
<i>Ateles paniscus</i>	6	3
<i>Ateles sp.</i>	25	15
<i>Bison bonasus</i>	13	7
<i>Brachyteles arachnoides</i>	10	3
<i>Bradypus variegatus</i>	1	1
<i>Callithrix jacchus</i>	2	2
<i>Callithrix penicillata</i>	1	1
<i>Camelus bactrianus</i>	8	5
<i>Camelus dromedarius</i>	3	3
<i>Canis lupus</i>	16	5
<i>Caracal caracal</i>	4	2
<i>Cebus kaapori</i>	4	3
<i>Cebus olivaceus</i>	10	5
<i>Ceratotherium simum</i>	4	1
<i>Cerdocyon thous</i>	40	8
<i>Cervus elaphus</i>	27	11
<i>Choloepus didactylus</i>	9	3
<i>Choloepus hoffmanni</i>	2	1
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	28	6
<i>Cuniculus paca</i>	1	1
<i>Dama dama</i>	70	37
<i>Dasyprocta azarae</i>	1	1
<i>Dasyprocta novemcinctus</i>	3	1
<i>Didelphis aurita</i>	3	2
<i>Eira barbara</i>	13	4
<i>Elephas maximus</i>	3	2
<i>Equus grevyi</i>	6	4
<i>Eudorcas thompsonii</i>	2	2
<i>Galictis vittata</i>	3	3
<i>Giraffa camelopardalis</i>	7	4
<i>Hippopotamus amphibius</i>	2	2
<i>Hylobates lar</i>	2	1
<i>Kobus e. ellipsiprymnus</i>	22	13
<i>Lagothrix lagotricha</i>	14	4
<i>Lama glama</i>	11	6
<i>Lama pacos</i>	4	2
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	102	59
<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	62	27
<i>Leontopithecus rosalia</i>	10	4
<i>Leopardus colocolo</i>	14	9
<i>Leopardus geoffroyi</i>	36	14
<i>Leopardus pardalis</i>	11	4



<i>Leopardus tigrinus</i>	113	40
<i>Leopardus wiedii</i>	29	11
<i>Leptailurus serval</i>	50	9
<i>Lontra longicaudis</i>	4	3
<i>Lycaon pictus</i>	2	2
<i>Mazama americana</i>	1	1
<i>Mazama gouazoubira</i>	7	2
<i>Mico argentata</i>	5	3
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	25	13
<i>Nasua nasua</i>	23	7
<i>Oryx gazella</i>	7	3
<i>Otaria flavescens</i>	2	2
<i>Pan troglodytes</i>	21	9
<i>Panthera leo</i>	46	14
<i>Panthera onca</i>	21	7
<i>Panthera pardus melas</i>	1	1
<i>Panthera tigris altaica</i>	28	11
<i>Panthera tigris tigris</i>	9	4
<i>Panthera uncia</i>	1	1
<i>Papio cynocephalus</i>	1	1
<i>Phacochoerus africanus</i>	2	2
<i>Pithecia albicans</i>	8	2
<i>Pithecia pithecia</i>	4	3
<i>Pongo pygmaeus</i>	8	2
<i>Potos flavus</i>	5	2
<i>Prionailurus viverrinus</i>	2	1
<i>Puma concolor</i>	8	4
<i>Puma yagouaroundi</i>	48	12
<i>Rusa unicolor</i>	11	7
<i>Saguinus midas niger</i>	11	4
<i>Saimiri sciureus</i>	6	3
<i>Sapajus apella</i>	43	29
<i>Sapajus flavius</i>	8	5
<i>Sapajus xanthosternos</i>	24	13
<i>Speothos venaticus</i>	7	4
<i>Sphiggurus villosus</i>	8	2
<i>Suricata suricatta</i>	14	10
<i>Tamandua tetradactyla</i>	49	16
<i>Tapirus terrestris</i>	16	5
<i>Tayassu pecari</i>	20	10
<i>Tayassu tajacu</i>	11	7
<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	6	4
<i>Tremarctos ornatus</i>	3	2
<i>Ursus americanus</i>	3	2
<i>Ursus arctos</i>	2	1

N= number of samples; n= number of individuals.

**Table 3:** Species of reptiles sampled in this study

<b>Specie</b>	<b>N</b>	<b>n</b>
<i>Aldabrachelis gigantea</i>	10	4
<i>Amphisbaena alba</i>	2	2
<i>Astrochelys radiata</i>	1	1
<i>Boa constrictor</i>	22	11
<i>Bothrops alternatus</i>	7	4
<i>Bothrops jararaca</i>	5	4
<i>Bothrops jararacussu</i>	2	2
<i>Bothrops moojeni</i>	3	3
<i>Caiman crocodilus</i>	11	3
<i>Caiman latirostris</i>	33	11
<i>Caiman yacare</i>	3	1
<i>Chelonoidis carbonarius</i>	55	29
<i>Chelonoidis denticulatus</i>	38	22
<i>Chelydra serpentina</i>	25	7
<i>Corallus caninus</i>	4	3
<i>Corallus hortulanus</i>	12	4
<i>Corucia zebrata</i>	18	9
<i>Crotalus durissus</i>	4	4
<i>Cuora amboinensis</i>	2	1
<i>Drymarchon corais</i>	2	1

<i>Epicrates cenchria</i>	5	4
<i>Epicrates crassus</i>	3	2
<i>Epicrates maurus</i>	2	2
<i>Erytrolamprus miliaris</i>	5	3
<i>Eryx colubrinus</i>	2	2
<i>Eublepharis macularius</i>	3	3
<i>Eunectes murinus</i>	18	12
<i>Graptemys pseudogeographica</i>	2	1
<i>Hydrodynastes gigas</i>	5	3
<i>Hydromedusa tectifera</i>	1	1
<i>Iguana iguana</i>	41	13
<i>Kinosternon scorpioides</i>	13	9
<i>Lampropeltis californiae</i>	5	3
<i>Lampropeltis getula</i>	1	1
<i>Melanosuchus niger</i>	1	1
<i>Mesoclemmys tuberculata</i>	37	14
<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	2	2
<i>Morelia spilota</i>	5	1
<i>Oxyrhophus guibei</i>	5	5
<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	7	1
<i>Paleosuchus trigonatus</i>	7	2
<i>Philodryas olfersii</i>	1	1
<i>Philodryas patagoniensis</i>	4	4
<i>Phrynops geoffroanus</i>	13	8
<i>Phrynops hillarii</i>	10	10
<i>Podocnemis concinna</i>	1	1
<i>Podocnemis expansa</i>	20	18
<i>Podocnemis unifilis</i>	15	15
<i>Pogona vitticeps</i>	3	1
<i>Pseudemys concinna floridana</i>	4	3
<i>Python curtus</i>	2	1
<i>Python molurus</i>	1	1
<i>Python regius</i>	8	7
<i>Salvator merianae</i>	13	6
<i>Spilotes pullatus</i>	12	5
<i>Stigmochelys pardalis</i>	1	1
<i>Testudo graeca</i>	3	2
<i>Tiliqua scincoides</i>	8	3
<i>Tomistoma schlegelli</i>	5	2
<i>Trachemys dorbigni</i>	34	28
<i>Trachemys scripta elegans</i>	68	37
<i>Trachemys scripta scripta</i>	4	4
<i>Tropidrodryas striaticiceps</i>	1	1
<i>Tupinambis rufescens</i>	7	2
<i>Varanus doreanus</i>	3	1
<i>Xenodon merremi</i>	2	2

N= number of samples; n= number of individuals.

**Table 4:** Species of amphibian sampled in this study

Specie	N	n
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	3	3
<i>Lithobates catesbeianus</i>	1	1
<i>Rhinella marina</i>	2	2
<i>Rhinella schneideri</i>	1	1

N= number of samples; n= number of individuals.

**Table 5:** Prevalence of hemogregarine parasites in captive animals from São Paulo Zoo Foundation

	N (N+)	P (%)	n (n+)	p (%)
Amphibians	7 (3)	42.8	7 (3)	42.8
Birds	1152 (0)	0	639 (0)	0
Mammals	1141 (0)	0	616 (0)	0
Reptiles	672 (20)	3	375 (15)	4

N: number of samples; N+: number of positive samples; n: number of individuals; n+: number of positive individuals; P: prevalence of positive samples; p: prevalence of positive individuals.

**Table 6:** Positive species for hemogregarine parasites

Animal	N	n
<i>Rhinella marina</i>	2	2
<i>Rhinella schneideri</i>	1	1
<i>Boa constrictor</i>	1	1
<i>Corallus caninus</i>	2	2
<i>Corallus hortulanus</i>	2	2
<i>Epicrates cenchria</i>	3	3
<i>Epicrates cenchria crassus</i>	1	1
<i>Eunectes murinus</i>	1	1
<i>Hydrodynastes gigas</i>	1	1
<i>Spilotes pullatus</i>	6	3
<i>Varanus doreanus</i>	3	1

N= number of samples; n= number of individuals.

## 5. Conclusions

The role of hemogregarine parasites in wild animals is not completely understood, more studies addressing wild and captive animals should be done. The relevance of this study is supported by the considerable number of the samples and species that were analyzed, expecting that these findings would add a substantial contribution to the understanding on hemogregarine and their hosts, bringing more opportunities to improve studies and knowledge on this group of parasites. This study also provides a perception that training of professionals for conducting reliable microscopic analyses of diagnostic material is essential to maintain the good standards of laboratories devoted to recognition of parasitic evaluation of wildlife fauna. Considering that investigation and development of molecular techniques to pursue further studies is strongly recommended in this field, the Applied Research Department of São Paulo Zoo is currently establishing a molecular protocol for *Hepatozoon* spp. diagnosis to be used as a complementary technique to microscopic analyses of these species.

## 6. Acknowledgements

We would like to acknowledge the São Paulo Zoo Foundation.

## 7. References

- Siddall ME. Phylogeny of Adeleid blood parasites with partial systematic revision of Haemogregarine complex. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1995; 42(2):116-125.
- Smith TG. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology*. 1996; 82(4):565-585.
- Telford SR. Hemoparasites of the Reptilia: Color atlas and text. CRC Press, Boca Raton, 2009, 376.
- Magro NM, Oliveira AT, O'Dwyer LH. First report and description of a *Cyrtospora* sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from a freshwater cururu stingray *Potamotrygon cf. hystrix* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae), from the Amazon Region, Brazil. *Journal of Fish Diseases*. 2016; 39(8):907-911.
- Karadjian G, Chavatte JM, Landaul I. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*. 2015, 22-31.
- Kvičerová J, Hypša V, Dvořáková N, Mikulíček P, Jandzike D, Gardner MG *et al.* *Hemolivia* and *Hepatozoon*: Haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist*. 2014; (165):688-700.
- Telford SR. Haemoparasites of reptiles. In: *Diseases of Amphibians and Reptiles*. Hoff GL, Frye FL, Jacobson ER (Eds.). Plenum Press, New York, 1984, 385-517.
- Hassi AR. Blood parasitism by hemogregarines in central European lizards. *Herpetozoa*. 2012; (25):83-86.
- Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D. A new specie of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology*. 2007; 93(5):1189-1198.
- Ball GH, Chao J, Telford SR. The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae) and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). *Journal of Parasitology*. 1967; 53(5):897-909.
- Valkiūnas G. General section: methods of collection and investigation. In: *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Valkiūnas G. CRC Press, New York, 2005, 213-224.
- John DT. Tissue-Inhabiting Protozoans. In: *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA (Eds). 2<sup>nd</sup> edn, Iowa State University Press, Iowa, 2001, 460-519.
- Kocan AA, Cummings CA, Panciera RJ, Mathew JS, Ewing SA, Barker RW. Naturally occurring and experimentally transmitted *Hepatozoon americanum* in coyotes from Oklahoma. *Journal of Wildlife Disease*. 2000; 36(1):149-153.
- Metzger B, Santos PK dos, Rubini AS, Oliveira TG de, Pereira C, O'Dwyer LH. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2008; (152):28-33.
- Wozniak E, Kazacos K, Telford SR, McLaughlin G. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *International Journal for Parasitology*. 1996; 26(2):141-146.
- Barta JR, Desser SS. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Wildlife Disease*. 1984; 20(3):180-189.
- Madsen T, Ujvari B, Olsson M. Old pythons stay fit: effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia*. 2005; (142):407-412.
- Wobeser GA. Parasitism: costs and effects. In: *Parasitic diseases of wild birds*. Atkinson CT, Thomas NJ, Hunter DB (Eds). Ames: Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, 2008, 3-9.
- Stämpfli AG. Building a future for wildlife - The world zoo and aquarium conservation strategy. *World Association of Zoos and Aquariums*. Bern, 2005, 72.
- Quem Somos. In: <http://www.zoologico.com.br/a-fundacao/quem-somos/>. 10 May, 2017.
- Rosenfeld G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*. 1947; 20(1):329-334.
- Godfrey RD, Fedynich AM, Pence DB. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Disease*. 1987; 23(4):558-565.
- Krogstad DJ, Sutera SP, Boylan CW, Gluzman IY, Qian FF, Rao PR. Intraerythrocytic parasites and red cell deformability. *Blood Cells*. 1991; (17):209-221.
- Pessoa SB, Sacchetta L, Cavalheiro J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras -

- Hemogregarinas da *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. *Revista Latinoamericana de microbiologia*. 1970; (12):197-200.
25. Pessoa SB, Biasi P, Puerto G. Nota sobre a frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*. 1974; (58):69-118.
  26. Wicks RM, Spencer PB, Moolhuijzen P, Clark P. Morphological and molecular characteristics of a species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) from the blood of *Isoodon obesulus* (Marsupialia: Peramelidae) in Western Australia. *Systematic Parasitology*. 2006; (65):19-25.
  27. Tomé B, Maia JP, Harris DJ. *Hepatozoon* infection prevalence in four snake genera: influence of diet, prey parasitemia levels, or parasite type? *Journal of Parasitology*. 2012; (98):913-917.
  28. Nasiri V, Mobedi I, Dalimi A, Mirakabadi AZ, Ghaffarifar F, Teymurzadeh S *et al.* A description of parasites from Iranian snakes. *Experimental Parasitology*. 2014; (147):7-15.
  29. Maia JP, Crottini A, Harris DJ. Microscopic and molecular characterization of *Hepatozoon domerguei* (Apicomplexa) and *Foleyella furcata* (Nematoda) in wild endemic reptiles from Madagascar. *Parasite*. 2014; 21:47.
  30. Thoisy B, Michel JC, Vogel I, Vié JC. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. *Journal of Parasitology*. 2000; 86(5):1035-1040.
  31. Santos MM, O'Dwyer LH, Silva RJ. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). *Parasitology Research*. 2005; (97):94-97.
  32. Moço TC, O'Dwyer LH, Vilela FC, Barrella TH, Silva RJ. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(8):1169-1176.
  33. Motta RO, Cunha LM, Leite RCL, Silva IJ, Pinto AC, Braga EM *et al.* *Hepatozoon* ssp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) infection and selected hematological values of the neotropical rattlesnake, *Crotalus durissus collilineatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae), from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2011; 42(3):399-407.
  34. Sumrandee C, Baimai V, Trinachartvanit W, Ahantarig A. *Hepatozoon* and *Theileria* species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015; 6(3):309-315.
  35. Lainson R, Paperna I, Naiff RD. 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*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(1):103-113.
  36. Ursula H, Rüdiger K, Frank M, Monika R. Blood parasites in reptiles imported to Germany. *Parasitology Research*. 2014; (113):4587-4599.
  37. Godfrey SS, Moore JA, Nelson NJ, Bull M. Social network structure and parasite infection patterns in a territorial reptile, the tuatara (*Sphenodon punctatus*). *International Journal for Parasitology*. 2010; (40):1575-1585.
  38. Leal DD, Dreyer CS, Silva RJ, Ribolla PE, Paduan KS, Bianchi I *et al.* Characterization of *Hepatozoon* spp. in *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus* from two regions of the Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Parasitology Research*. 2015; 114(4):1541-1549.
  39. Boulianne B, Evans RC, Smith TG. Phylogenetic analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. *Journal of Parasitology*. 2007; 93(6):1435-1144.
  40. Netherlands EC, Cook CA, Smith NJ, Preez LH. Redescription and molecular diagnosis of *Hepatozoon theileri* (Laveran, 1905) (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting *Amietia quecketti* (Anura: Pyxicephalidae). *Folia Parasitologica*. 2014; 61(4):293-300.
  41. Dickson CM, Ogbuah CT, Smith TG. The role of gamont entry into erythrocytes in the specificity of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleida) for their frog hosts. *Journal of Parasitology*. 2013; 99(6):1028-1033.
  42. Smith TG, Kim B, Hong H, Desser SS. Intraerythrocytic development of species of *Hepatozoon* infecting ranid frogs: evidence for convergence of life cycle characteristics among apicomplexans. *Journal of Parasitology*. 2000; 86(3):451-458.
  43. Leveille AN, Ogedengbe ME, Hafeez MA, Tu H, Barta JR. The complete mitochondrial genome sequence of *Hepatozoon catesbiana* (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina), a blood parasite of the Green frog, *Lithobates* (Formerly *Rana*) *clamitans*. *Journal of Parasitology*. 2014; 100(5):651-656.
  44. Shutler D, Smith TG, Robinson SR. Relationships between leukocytes and *Hepatozoon* spp. in green frogs, *Rana clamitans*. *Journal of Wildlife Disease*. 2009; 45(1):67-72.
  45. Smith TG, Desser SS. Ultrastructural features of cystic and merogonic stages of *Hepatozoon sipedon* (Apicomplexa: Adeleorina) in northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and northern water snakes (*Nerodia sipedon*) from Ontario, Canada. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1998; 45(4):419-425.
  46. Harris DJ, Damas-Moreira I, Maia JP, Perera A. First report of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) in Caecilians, with description of a new species. *Journal of Parasitology*. 2014; 100(1):117-120.
  47. Readell AM, Goldberg TL. Blood parasites of frogs from an Equatorial African Montane Forest in Western Uganda. *Journal of Parasitology*. 2010; 96(2):448-450.
  48. Stenberg PL, Bowerman WJ. First report of *Hepatozoon* sp. in the Oregon spotted frog, *Rana pretiosa*. *Journal of Wildlife Disease*. 2010; 46(3):956-960.
  49. Sailasuta A, Satetasit J, Chutmongkonku M. Pathological study of blood parasites in rice field frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Veterinary Medicine International*. 2011, 850568.
  50. Valkiūnas G, Mobley K, Iezhova TA. *Hepatozoon ellisgreineri* n. sp. (Hepatozoidae): description of the first avian apicomplexan blood parasite inhabiting granulocytes. *Parasitology Research*. 2016; 115(2):609-613.
  51. Kruszewicz AG, Dyrz A. *Hepatozoon kabeeni* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa; Hemogregarina) from the sedge warbler, *Acrocephalus schoenobaenus* (Aves: Passeriformes). *Wiadomości Parazytologiczne*. 2000; (46):507-510.
  52. Peirce MA. A checklist of the valid avian species of

- Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmorida), *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida), and *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). Journal of Natural History. 2005; 39(42):3621-3632.
53. Barraclough RK, Robert V, Peirce MA. New species of haematozoa from the avian families Campephagidae and Apodidae. Parasite. 2008; (15):105-110.
  54. Merino S, Martínez J, Masello JF, Bedolla Y, Source PQ. First molecular characterization of a *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting birds and description of a new species infecting Storm Petrels (Aves: Hydrobatidae). Journal of Parasitology. 2014; 100(3):338-343.
  55. Shurulinkov P, Chakarov N. Prevalence of blood parasites in different local populations of reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) and great reed warbler (*Acrocephalus arundinaceus*). Parasitology Research. 2006; (99):588-592.
  56. Merino S, Martínez J, Puente JM, Criado-Fornelio A, Tomás G, Morales J *et al.* Molecular characterization of the 18S rDNA gene of avian *Hepatozoon* reveals that it is closely related to *Lankesterella*. Journal of Parasitology. 2006; 92(6):1330-1335.
  57. Criado-Fornelio A, Ruas JL, Casado N, Farias NA, Soares MP, Müller G *et al.* New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. Journal of Parasitology. 2006; 92(1):93-99.
  58. André MR, Adania CH, Teixeira RHF, Vargas GH, Falcade M, Sousa L *et al.* Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. Veterinary Parasitology. 2010; (173):134-138.
  59. Sousa KC, Fernandes MP, Herrera HM, Benevenuto JL, Santos FM, Rocha FL *et al.* Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. Veterinary Parasitology. 2017; (237):37-46.
  60. Rodrigues AF, Daemon E, Massard CL. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procionid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). Parasitology Research. 2007; (100):347-350.
  61. Pawar RM, Poornachandar A, Arun AS, Manikandan S, Shivaji S. Molecular prevalence and characterization of *Hepatozoon ursi* infection in Indian sloth bears (*Melursus ursinus*). Veterinary Parasitology. 2011; (182):329-332.
  62. Pawar RM, Poornachandar A, Srinivas P, Rao KR, Lakshmikantan U, Shivaji S. Molecular characterization of *Hepatozoon* spp. infection in endangered Indian wild felids and canids. Veterinary Parasitology. 2012; (186):475-479.
  63. Conceição-Silva FM, Abranches P, Silva-Pereira MC, Janz JG. Hepatozoonosis in foxes from Portugal. Journal of Wildlife Disease. 1988; (24):344-347.
  64. McCully RM, Basson PA, Bigalke RD, De-Vos V, Young E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. Journal of Veterinary Research. 1975; (42):117-134.
  65. Redlist - International Union of Conservation of Nature. <http://www.iucnredlist.org/search>, 2017.
  66. Registro de ocorrência do Instituto Chico Mendes de

**Anexo 4:** Artigo submetido no Folia parasitológica. “Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp. in Brazilian snakes”. Calil et al., 2018.



# Folia Parasitologica

Institute of Parasitology

Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, v.v.i.

Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

CZECH REPUBLIC

**Editorial Office:** e-mail: [folia@paru.cas.cz](mailto:folia@paru.cas.cz) phone: +420 387 775 406 fax: +420 385 310 388

**Editor-in-Chief:** e-mail: [tscholz@paru.cas.cz](mailto:tscholz@paru.cas.cz)

<http://www.paru.cas.cz/folia>

---

ID: 412

**Title: Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp. in Brazilian snakes**

Authors: Priscila Rodrigues Calil, Giuseppe Puerto, Carolina Romeiro Fernandes Chagas, Patrícia Locosque Ramos

Submitted: 22.2.2018

Pdf: 23.2.2018

1 **Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp. in Brazilian**  
2 **snakes**

3 **Priscila Rodrigues Calil<sup>1,3</sup>, Giuseppe Puerto<sup>2</sup>, Carolina Romeiro Fernandes**  
4 **Chagas<sup>3</sup>, Patrícia Locosque Ramos<sup>1,3</sup>.**

5 <sup>1</sup>Federal University of São Carlos;

6 <sup>2</sup>Butantan Institute;

7 <sup>3</sup>Applied Research Department, São Paulo Zoo Foundation;

8 Calil et al.: *Hepatozoon* spp. in Brazilian snakes.

9 Abstract: The genus *Hepatozoon* (Miller, 1908) represents one of six genera in  
10 the hemogregarine group. Some studies in snakes indicated some effects in the host,  
11 from slight influences on fitness to severe effects on growth rate, reproduction and  
12 offspring survival rates. Diagnosis and identification are usually through blood smear  
13 visualization; but not all infected individuals show positive blood smears. Based on this,  
14 the present study established an adapted molecular protocol to identify *Hepatozoon* spp.  
15 to be used as complementary test for routine diagnoses at the Clinical Analysis  
16 Laboratory at São Paulo Zoological Park Foundation. The study was accomplished with  
17 113 individuals. Microscopy and molecular techniques were used to identify the  
18 parasite. The microscopic analyses show 13.3% positive samples. The first pair of  
19 primers, used to amplify the 18S gene, amplified DNA in 6.3% of samples. The second  
20 pair of primers that amplify the Apicoplast fragment, screened only those samples  
21 positive by microscopy and detected 93.33% of positive samples. Phylogenetic analysis  
22 of the resulting sequences found five clusters for the 18S gene and five clusters for the  
23 Apicoplast fragment. Studies involving *Hepatozoon* spp. are still scarce and limited,  
24 mainly with snakes and their actual impacts on the host, so diagnostic studies are  
25 essential for wildlife conservation, especially in *ex situ* work.

26 Keywords: PCR, Captive, Reptiles, Hemoparasites, Wildlife, Conservation.

27 Address for correspondence: P.R. Calil, Federal University of São Carlos, Rodovia  
28 Washington Luiz Km 235, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil. (+55 34) 988028316,  
29 [pr.calil@hotmail.com](mailto:pr.calil@hotmail.com).



31 Hemogregarinidae, Karyolysidae and Hepatozoidae are three apicomplexan parasite  
32 families that can be distinguished by the different development stages in the invertebrate  
33 hosts (Sloboda et al. 2007, Telford 1984). Among Hepatozoidae, the genus *Hepatozoon*  
34 (Miller, 1908) represents one of six genera of haemogregarines, which all have a  
35 heterogeneous life cycle involving a vertebrate intermediate host and a definitive  
36 hematophagous invertebrate host (Smith et al. 1996). Their transmission can occur in  
37 two different ways, (i) by ingestion of ticks and insects (Smith et al. 1996), or (ii) by  
38 ingestion of another infected vertebrate, for example mice and frogs (Baneth et al.  
39 2013).

40 One of the main obstacles in haemogregarine studies is the lack of information about  
41 infections in wild animals and some authors affirm that they are usually subclinical  
42 (Metzger et al. 2008). Some infections are associated with anemia, erythrocyte  
43 hypertrophy, hemoglobin loss and some alterations in the erythrocyte plasmatic  
44 membrane (Wozniak et al. 1996). Consequently, these symptoms can cause changes in  
45 the host life cycle, with little fitness influence until severe effects on reproduction and  
46 offspring survival rates (Madsen et al. 2005).

47 In the tissue stage of infection, these parasites infect mainly the liver and spleen (Levine  
48 1988), and when parasitemia is present, gamonts infect erythrocytes. Considering this,  
49 the diagnosis and identification of *Hepatozoon* infection is usually through blood smear  
50 visualization, however these results cannot be reliable in negative cases, because  
51 chronic infections can produce low parasitemia and make microscopic diagnosis time  
52 consuming (Telford 1984). Therefore, this study proposes an adaptation of existing  
53 molecular protocols to be used as a complementary method during the routine screening  
54 of individuals by the laboratory of clinical analyses to identify *Hepatozoon* spp. in  
55 snakes at São Paulo Zoological Foundation and Butantan Institute.

56

## 57 MATERIAL AND METHODS

58

### 59 Blood sampling and microscopy

60 This study was conducted with 113 snakes of 32 species (Table 1), with 60 from the São  
61 Paulo Zoological Foundation (FPZSP) collection and 53 from the Butantan Institute  
62 (IB), being possible to obtain samples from captive and wild animals. Sample collection  
63 took place between October 2016 and July 2017. All individuals were physical

64 restrained for blood sampling, at least 0.5 ml of blood were collected of each animal and  
65 were stored at -20°C in EDTA tubes until DNA extraction. Thin blood smears were  
66 made with fresh blood, air-dried, fixed with methanol and stained with Giemsa  
67 (Valkiūnas 2005). Each slide was examined under oil immersion 1000X for 30 minutes  
68 (Valkiūnas 2008) and in positive cases, the parasitemia was calculated per 10,000  
69 erythrocytes (Godfrey et al. 1987).

70

#### 71 DNA extraction

72 Genomic DNA was extracted from 20µl of pelleted red blood cells using the Wizard  
73 Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA), according to the  
74 manufacturer's instructions. DNA quality and concentration were verified using a  
75 NanoVue*Plus* spectrophotometer (GE Healthcare, Cambridge, United Kingdom).

#### 76 Amplification of 18S rRNA and Apicoplast fragment

77 PCR amplification of the 18S rRNA gene was performed using the specific primers  
78 HepF300 (5'-GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGAC-3') and HepR900 (5'-  
79 CAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC-3') following Ujvari et al. (2004), and to  
80 amplify the Apicoplast fragment, the primers APC1 (5'-  
81 CAGCAGCMGCGGTAATAC-3') and APC2 (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-  
82 3') described by Oboník et al. (2002) were used. PCRs were carried out in a total  
83 volume of 50 µl, comprising 1U of Taq DNA polymerase (Invitrogen- Thermo Fisher  
84 Scientific, São Paulo, São Paulo, Brazil), 1.75µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µl of 10 mM  
85 dNTPs, 6.25µl of 1X PCR buffer, 2.5µl of each 50-60 pmol primer, with 60 ng of  
86 template DNA.

87 Amplification was performed using an Applied Biosystems ABI – Verti Thermal Cycler  
88 (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, São Paulo, Brazil), the 18S rRNA thermal profile  
89 was: initial denaturation at 94 °C for 3 minutes, 35 cycles of 94 °C for 30 seconds,  
90 annealing temperature of 60 °C for 1 minute and 72 °C for 1 minute. The final extension  
91 step was 72 °C for 10 minutes, with an expected fragment size of approximately 666 bp  
92 for the 18S rRNA primer set. The PCR thermal profile to amplify the Apicoplast  
93 fragment was the same as in Oboník et al. (2002), with a product size of approximately  
94 200 bp. All PCR products were visualized on 1% agarose gel, stained with GelRed 10X  
95 (Biotium Inc., Hayward, California, USA) and examined by UV transillumination  
96 (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil).

97 Sequencing of the 18S rRNA and Apicoplast

98 PCR products were purified using a GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE  
99 Healthcare, Cambridge, United Kingdom, England), according to the manufacturer's  
100 instructions. Sequencing was conducted using a 3500 Genetic Analyzer Sequencer  
101 (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) with the primers used for PCR  
102 reaction (HepF300/HepR900 for 18S rRNA, and primers APC1/APC2 for Apicoplast  
103 fragment). As observed in the results, the electrophoresis gel from Apicoplast fragment  
104 shows non-specific bands for some samples with a range of 500 to 2500 bp, so as the  
105 exact size of the fragment is not known. All these bands were purified from the agarose  
106 gel and submitted for sequencing analysis.

107 Phylogenetic analyses

108 The 18S rRNA gene sequences were compared to sequences deposited in GenBank  
109 (Altschul et al. 1997). The sequences obtained were edited using the software Chromas  
110 Pro version 1:34, sequences with high 18S rRNA gene sequence homology were  
111 retrieved and consensus sequences were aligned using CLUSTAL W (Altschul et al.  
112 1990) and MEGA 7.0.1 (Kumar et al. 2016)). The topology of phylogenetic trees was  
113 constructed in MEGA using the neighbour-joining method (Saitou et al. 1987) with a  
114 sequence of *Cytauxzoon* sp. was used as outgroup p-distance and the resultant tree  
115 topologies were evaluated by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) based on 1000  
116 replicates. As the Apicoplast fragment sequences do not match with any sequence  
117 deposited in GenBank, the sequences were compared between themselves. The  
118 sequences obtained were analysed as described for 18S rRNA gene.

119 RESULTS

120 Microscopy

121 Microscopic analyses of the 113 snakes (Figure 1), revealed 15 positive samples  
122 (13.3%), comprising one (6.7%) from captive and 14 (93.3%) from wild animals.  
123 Parasitemia ranged from 0.01% and 0.86%. The negative cases represent 98 (86.7%)  
124 individuals which 22 (22.4%) are from captive and 76 (77.6%) from wildlife. No  
125 differences between males and females were observed in this study.

126

127

128 The morphology of parasites observed in positive samples was analysed and  
129 morphological features of gamonts found in light microscopy was compared with the  
130 literature (Table 2). Only ten smears presented parasitemia that allowed  
131 photomicrographic analysis. Five out of ten positive samples that was photographed  
132 shows only a parasite standard each (Figure 2); while, five samples show more than one  
133 type of gamont morphology (Figure 3) suggesting the presence of mixed infections,  
134 different stages of the life cycle or even sexual dimorphism (Telford 2009).

135

#### 136 Molecular techniques

137 For the molecular protocol, 110 samples were analysed using PCR with Hep primers,  
138 the remaining three had insufficient DNA concentration for amplification. From these  
139 110 samples, six (5.45%) were positive using the pair of primer HepF300/ HepR900  
140 (Ujvari et al. 2004), all of them from wildlife (Figure 4).

141 The APC primers were used in 14 out of 15 positive samples in microscopy with  
142 sufficient DNA concentration. From these 14 samples, 12 (85.7%) amplified DNA  
143 using the APC primers, being one from captivity and 11 from wildlife (Figure 5).

144

#### 145 Phylogenetic analysis

146 All positive samples for infection using Hep primers successfully produced sequence  
147 data (Table 3). As shown in figure 5, APC primers produced multiple non-specific  
148 bands: from 25 bands submitted to sequencing, 17 were sequenced and eight presented  
149 sufficient base pairs to be analysed (Table 4).

## 150 DISCUSSION

### 151 Microscopy

152 The parasitemia range and the prevalence found in this study using optical microscopy  
153 matches those observed in previously studies. Several reports have shown that the  
154 prevalence of *Hepatozoon* spp. from microscope analyses ranges between 8% to 48%  
155 (Maia et al. 2014) with parasitemia between 0.03 and 0.52% (Han et al. 2015). It is  
156 important to highlight that these data were obtained from studies of wild animals.

157 From 32 species sampled in this study (Table 2), eight presented at least one positive  
158 individual and all positive species occur in Brazil (*Boa constrictor* (Linnaeus, 1758),  
159 *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824), *Chironius flavolineatus* (Jan, 1863),

160 *Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758), *Crotalus durissus terrificus* (Linnaeus, 1758),  
161 *Epicrates cenchria* (Linnaeus, 1758), *Epicrates maurus* (Gray, 1849) and *Spilotes*  
162 *pullatus* (Linnaeus, 1758)) (Reptile database 2015). The presence of *Hepatozoon* spp.  
163 has previously been described for all positive species in this study, except for *E.*  
164 *maurus*. From these positive species, only *C. hortulanus* is listed on the IUCN Redlist  
165 and is classified as least concern (IUCN 2017); while *E. cenchria* is classified as  
166 vulnerable, *C. durissus* as not threatened and *B. jararaca* as data deficient by the Brazil  
167 redlist (Martins and Molina, 2005). No data related to conservation status is evident for  
168 *B.constrictor*, *C. flavolineatus*, *E. maurus* and *S. pullatus*.

169

#### 170 Morphology description

171 Some authors described a possible sex differentiation (macrogamont and microgamont)  
172 in some *Hepatozoon* species, with the macrogamont presenting light cytoplasm with a  
173 compact and dark stained nucleus, and the microgamont with cytoplasm staining darker  
174 than the magrogamont and the nucleus less compact; microgamonts are also more  
175 curved than magrogamonts (Smith 1996, Leville 2014). Four of our 15 positive samples  
176 showed azurophilic granules in the cytoplasm and this characteristic has been observed  
177 in *Hepatozoon kisrae* (Paperna et al., 2002), *Haemogregarina* sp., *Karyolysus latus*  
178 (Svahn, 1975), *Karyolysus minor* (Svahn, 1975) and *Hemolivia mauritanicum* (Sergent  
179 and Sergent, 1904) (Telford 2009). Two of the 15 presented encapsulated gamonts, and  
180 this condition has been observed only in *Hepatozoon kisrae* (Telford 2009) but the  
181 presence of a capsule is a common characteristic of *Hemolivia* and *Karyolysus* generas  
182 (Telford 2009).

#### 183 Molecular methods

184 It is known that molecular techniques are more sensitive than microscopy for  
185 diagnosing parasite infections and considering that Hep primers were designed for  
186 research in reptiles hosts, it is possible that the low number of positive occurs according  
187 two motives: (i) *Hepatozoon* gamonts and other Hemogregarine parasites have similar  
188 morphological features, so it is hard to differentiate them microscopically using blood  
189 stages (Smith 2009; Calil et al. 2017), so a misidentification of the parasite genus is  
190 possible; (ii) mixed infections are common, as described for other blood parasites  
191 (Valkiūnas 2004) and this can influence the effectiveness of conventional PCR (Perkins  
192 et al. 2011). The Apicoplast fragment has a low specificity because the apicoplast

193 organelle is found in all Apicomplexa parasites and besides this the high positivity also  
194 can be explained derive from a degenerated primer (Oborník et al. 2002).

195

196 Phylogenetic analysis

197 Based on the topology for the 18S rRNA gene (Figure 6), it is possible to observe the  
198 formation of five clusters defining the proximity of the species of *Hepatozoon*.

199 Cluster I – Formed by nine different species, besides *Hepatozoon* sp. These  
200 species are different because of their locations and hosts. In addition, the bootstrap  
201 value (trust) was below 75%, indicating the difference between these species. The  
202 species of this cluster described infecting snakes, *H. domerguei* (Landau et al., 1970)  
203 (Maia et al. 2014), *H. chinensis* (Wu et al., 2014) and *H. ayorgbor* (Sloboda et al.,  
204 2007) were reported in Madagascar, China and Ghana, infecting *Madagascarophis*  
205 *colubrinus* (Schlegel, 1837), *Elaphe carinata* (Günther, 1864) and *Lamprophis sooty*  
206 (Boulenger, 1887), respectively.

207 Cluster II – Formed of three described species through microscope techniques  
208 and molecular biology, *H. seychellensis* (Harris et al., 2014); *H. cepavii* (O' Dwyer et  
209 al., 2013) and *H. massardii* (O' Dwyer et al., 2013), and two samples from this study  
210 Hep18 and Hep75. Hep 18 and Hep 75 were found in snakes belonging to the family  
211 Boidae, and although they are held in captivity, they originate from the wild, collected  
212 in São Paulo. Hep 18, Hep 75, *H. cepavii* and *H. massardii* promote changes in the  
213 erythrocyte and the displacement of the nucleus. Hep 75 has azurophilic cytoplasm,  
214 similar to *H. massardii*, and it is possible to observe granules in the cytoplasm as in *H.*  
215 *cepavii*.

216 Cluster III - Formed from four samples obtained in this study, and *H. cuestensi*  
217 (O' Dwyer et al., 2013). The four samples in this cluster and *H. cuestensi* all present  
218 azurophilic cytoplasm, promote the alteration of the erythrocyte, and displacement of  
219 the nucleus. Hep 27 and Hep 28 are from free living *B. jararaca*, having been captured  
220 in the same place and it is possible to observe the formation of granules in the  
221 cytoplasm and similar morphology.

222 Cluster IV - Composed of six species previously described in amphibians.  
223 *Hepatozoon theileri* (Leveran, 1905) was described in South Africa in *Amietia quecketti*  
224 (Boulenger, 1895) (Netherlands et al. 2014a) and presents basophilic cytoplasm,

225 changes in the erythrocyte and nucleus displacement. *Hepatozoon ixoxo*, also described  
226 in South Africa, infects species of the genus *Amietophrynus* (Netherlands et al., 2014b).  
227 The samples of *H. magna* (Grassi and Feletti, 1891), *H. cf. clamatae* (Barta et al., 2012)  
228 and *H. cf. catesbiana* (Barta et al., 2012) were described in France: *H. magna* was  
229 found infecting *Pelophylax kl. esculentus* (Linnaeus, 1758) and *H. cf. clamatae*, *H. cf.*  
230 *catesbiana* infecting *Rana clamitans* (Latreille, 1801) (Barta et al. 2012). *H.*  
231 *catesbiana* has been described in India infecting *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802)  
232 (Mathew et al. 2000). With exception of *H. magna*, all other species were described as  
233 infecting amphibians of the Ranidae family.

234 Cluster V - Formed by the species *H. sipedon* (Smith et al., 1994), described in  
235 *Nerodia sipedon* (Linnaeus, 1758) in Canada (Smith et al. 1994) and Hep 118 collected  
236 from *Chironius flavolineatus* in São Paulo. Hep 118 and *H. sipedon* were both found in  
237 individuals of colubridae family, both promote the displacement of the nucleus of the  
238 infected cell and change erythrocyte morphology. However, *H. sipedon* and Hep 118  
239 have different sizes and formats.

240 Based on phylogenetic topology and by comparison of the samples of this study,  
241 it is noted that most of the new samples obtained in this study are found in cluster III.  
242 Despite the similarities shared between them, the confidence test (bootstrap) for that  
243 cluster is below 75%, except for Hep 27 and Hep 28 that are grouped together with a  
244 bootstrap value of 87%.

245 Based on the topology of Apicoplast fragment (Figure 7), it is possible to  
246 observe the formation of four clusters defining the proximity between the samples.  
247 Sample 20 is divided into APC 20 with 348 bp and APC 20.1 with 292 bp.

248 Cluster I - Formed by the Samples APC 20.1, APC 118, APC 27 and APC 28, it  
249 is possible to observe two subgroups: the first formed by the samples APC 20.1 and  
250 APC 118; and the second by APC 27 and APC 28. Sample APC 20.1 was isolated from  
251 *S. pullatus* and the Hep 118 of *C. favolineatus*. It was possible to observe that the first  
252 presents an azurophilic cytoplasm and the second a basophilic cytoplasm. APC 27 and  
253 APC 28 were isolated from *B. jararaca* and they also have azurophilic cytoplasm, but  
254 with the presence of granules. All samples of this group promote changes in the  
255 erythrocyte, displacement of the nucleus and characteristic nucleophilic.

256            Cluster II – Formed only by sample APC 20 which was represented as APC 20  
257 and APC 20.1 (which clustered with Cluster I). During PCR amplification, two bands of  
258 different sizes were obtained from agarose gel and submitted for sequencing. After  
259 phylogenetic analysis, these two bands were positioned separately, indicating the  
260 possibility of amplifying the two morphologies observed under microscopy.

261            Cluster III - Formed by the samples APC 55 and APC 75 and with a bootstrap of  
262 100%, these samples have basophilic cytoplasm and azurophilic cytoplasm with  
263 granules, respectively. APC 55 does not alter the erythrocyte or the position of the  
264 nucleus, while APC 75 promotes changes and displacement of the nucleus.

265            Cluster IV – Formed of APC 21, which has three different morphologies when  
266 observed under microscopy: two with basophilic cytoplasm and one with azurophilic  
267 cytoplasm; all present erythrocyte changes and nucleus displacement.

268 Preliminary searches in GenBank shows that the Apicoplast fragment sequence has not  
269 previously been sequenced, and the results presented in this work are unprecedented. It  
270 is worth pointing out the need to explore the Apicoplast fragment as a possible  
271 molecular marker in the differentiation within the genus *Hepatozoon*. An alternative and  
272 complementary strategy would be to increase the size of the fragment analysed;  
273 however, it is also necessary to highlight the difficulty of amplifying this fragment  
274 without the amplification of non-specific fragments. With the possible use of the  
275 Apicoplast fragment associated with the 18S gene, the concatenation of the fragments  
276 and increased sequence length would be effective in differentiating the species found for  
277 the samples used in this study.

278

279 **Acknowledgements:** This study was supported by the Fundação Parque Zoológico de  
280 São Paulo and Universidade Federal de São Carlos. The authors would like to thank  
281 Paulo Magalhães Bressan, João Batista da Cruz (Fundação Parque Zoológico de São  
282 Paulo) and Butantan Institute for providing access to the biological samples. We thank  
283 Prof. Dr. Claudio Marinho and Erika Machado for kindly providing the use of Zeiss  
284 Axio Imager M2 light microscope equipped with a Zeiss Axio Cam HRc in which the



285 photographs of this paper were produced. We thank Dra. Jenny Dunn from Josepha  
286 Banks Laboratories, School of Science, University of Lincoln for English revision.

287

## 288 REFERENCES

289 Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local  
290 alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403–410.

291 Baneth G., Samish M., Shkap V. 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa:  
292 Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog  
293 (*Canis familiaris*). *J. Parasitol.* 93(2):283–299.

294 Barta J.R., Ogedengbe J.D., Martin D.S., Smith T.G. 2012. Phylogenetic position of the  
295 adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina)  
296 inferred using 18S rDNA sequences. *J Eukaryot Microbiol.* 59(2):171–180.

297 Boulenger G.A. 1887. On a new snake of the genus *Lamprophis* now living in the  
298 Society's Gardens. *Proc Zool Soc London* .1887: 397-398

299 Boulenger G.A. 1895. Third report on additions to the batrachian collection in the  
300 Natural-History Museum. *Proc Zool Soc Lond.* 1894:640–646.

301 Calil P.R., Gonzalez I.H.L., Salgado P.A.B., Cruz J.B., Ramos P.L., Chagas C.R.F.  
302 2017. Hemogregarine parasites in wild captive animals, a broad study in São Paulo  
303 Zoo. *J Entomol Zool Stud.* 5(6): 1378–1387.

304 Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.  
305 *Evolution.* 39:783–791.

306 Gray J.E. 1849. Catalogue of the specimens of snakes in the collection of the British  
307 Museum. Edward Newman, London, 125 pp.

308 Godfrey R.D.Jr., Fedynich A.M., Pence D.B. 1987. Quantification of hematozoa in  
309 blood smears. *J Wildlife Dis.* 23(4):558–565.

310 Günther A. 1864. *The Reptiles of British India.* Taylor & Francis, London, 452 pp.

- 311 Han H., Wu Y., Dong H., Zhu S., Li L., Zhao Q. et al. 2015. First report of *Hepatozoon*  
312 (Apicomplexa: Adeleorina) from king ratsnakes (*Elaphe carinata*) in Shanghai, with  
313 description of a new species. *Acta Parasitol.* 60(2):266–274.
- 314 Harris D.J., Damas-Moreira I., Maia J.P., Perera A. 2014. First report of *Hepatozoon*  
315 (Apicomplexa: Adeleorina) in Caecilians, with description of a new species. *J Parasitol.*  
316 100(1):117–120.
- 317 Jan G. 1863. *Elenco sistematico degli ofidi descritti e disegnati per l'iconografia*  
318 *generale*. Tipografia A. Lombardi, Milano, 143 pp.
- 319 Landau I., Chabaud A.G., Michel J.C., Brygoo E.R. 1970. Mise en évidence d'un  
320 double mode de transmission chez un *Hepatozoon* de reptiles malgaches. *C R Acad Sci.*  
321 270:2308–2310.
- 322 Latreille P.A. 1801. In: Sonnini C.S. Latreille P.A. *Histoire naturelle des reptiles, avec*  
323 *figures dessinees d'après nature*. Ches Deterville, Paris, 344 pp.
- 324 Laveran A. 1905. Contribution a l'étude des grandes hemogregarines des grenouilles.  
325 *C.R. Soc. Seances Soc. Biol.* 59: 172– 175.
- 326 Levine N.D. 1988. *The protozoan phylum Apicomplexa*. CRC Press Incorporated, Boca  
327 Raton, Florida, 224 pp.
- 328 Linnaeus C. 1758. *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines,*  
329 *genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio*  
330 *decima, reformata*. Laurentii Salvii, Holmiæ. 10th Edition: 824 pp.
- 331 Madsen T., Ujvari B., Olsson M. 2005. Old pythons stay fit: effects of haematozoan  
332 infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia.* 142:407–412.
- 333 Maia J.P., Harris D.J., Carranza S., Gómez-Díaz E. 2014. A comparison of multiple  
334 methods for estimating parasitemia of Hemogregarine Hemoparasites (Apicomplexa:  
335 Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. *PLOS*  
336 *ONE.* 9(4):1–13.
- 337 Martins M., Molina F.B. 2005. Panorama geral dos répteis ameaçados do brasil. In:  
338 Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP. *Livro vermelho da fauna brasileira*  
339 *ameaçada de extinção*. MMA, Brasília, p. 327-376.

340 Mathew J.S., Van Den Bussche R.A., Ewing S.A., Malayer J.R., Latha B.R., Panciera  
341 R.J. 2000. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based  
342 on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *J Parasitol.* 86(2):366–372.

343 Metzger B., Paduan K.S., Rubini A.S., Oliveira T.G., Pereira C., O’Dwyer L.H. 2008.  
344 The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids  
345 from Brazil. *Vet Parasitol.* 152:28–33.

346 Miller W.W. 1908. *Hepatozoon perniciosum* (n.g., n.sp.); a haemogregarine pathogenic  
347 for white rats, with a description of the sexual cycle in the intermediate host, a mite  
348 (*Laelaps echidninus*). *Hyg Lab Bull.* 46:1–51.

349 Netherlands E.C., Cook C.A., Smith N.J., Preez L.H. 2014a. Redescription and  
350 molecular diagnosis of *Hepatozoon theileri* (Laveran, 1905) (Apicomplexa: Adeleorina:  
351 Hepatozoidae), infecting *Amietia quecketti* (Anura: Pyxicephalidae). *Folia Parasitol.*  
352 61(4):293–300.

353 Netherlands E.C., Cook C.A., Smith N.J. 2014b. *Hepatozoon* species (Adeleorina:  
354 Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular  
355 diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasitising three *Amietophrynus* species  
356 (Anura: Bufonidae). *Parasit Vectors.* 7:1–12.

357 Oboník M., Jirků M., Šlapeta R.J., Modrý D., Koudela B., Lukeš J. 2002. Notes on  
358 coccidian phylogeny, based on the apicoplast small unit ribosomal DNA. *Parasitol Res.*  
359 88:360–363.

360 O’Dwyer L.H., Moço T.C., Paduan K.S., Spenassatto C., Silva R.J., Ribolla P.E.M.  
361 2013. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae)  
362 from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and  
363 morphologic characters. *Exp Parasitol.* 135:200–207.

364 Paperna I., Kremer-Mecabell T., Finkelman S. 2002. *Hepatozoon kisrae* n. sp. infecting  
365 the lizard *Agama stellio* is transmitted by the tick *Hyalomma cf. aegyptium*. *Parasite.*  
366 9:17–27.

367 Perkins S.L., Martinsen E.S., Falk B.G. 2011. Do molecules matter more than  
368 morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology.* 38(13):1664–1674.

369 Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing  
370 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406–425.

371 Schlegel H. 1837. Essai sur la physionomie des serpens. Partie Descriptive. In: Kips J.,  
372 van Stockum W.P. Nabu Press, France, 632 pp.

373 Sergent Ed., Sergent Et. 1904. Sur une hemogrégarine, parasite de *Testudo mauritanica*.  
374 *C R Soc Biol.* 56:130–131.

375 Shaw G. 1802. General Zoology or Systematic Natural History. Volume 3. G Kearsley,  
376 London, 424 pp.

377 Sloboda M., Kamler M., Bulantová J., Votýpka J., Modrý D. 2007. A new species of  
378 *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae)  
379 and its experimental transmission by a mosquito vector. *J Parasitol.* 93(5):1189–1198.

380 Smith T.G., Desser S.S., Martin D.S. 1994. The development of *Hepatozoon sipedon*  
381 sp. Nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the northern water  
382 snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*,  
383 and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitol Res.*  
384 80:559–568.

385 Smith T.G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa:Adeleina). *J Parasitol.*  
386 82(4):565–585.

387 Smith K.F., Acevedo-Whitehouse K., Pedersen A.B. 2009. The role of infectious  
388 diseases in biological conservation. *Anim Conserv.*12:1–12.

389 Svahn K. 1975. Blood parasites of the genus *Karyolysus* (Coccidia, Adeleidae) in  
390 Scandinavian lizards: Description and life cycle. *Norweg J Zool.* 23:277–295.

391 Telford S.R. 1984. Haemoparasites of reptiles. In: Hoff GL, Frye FL, Jacobson ER  
392 (Eds.). *Diseases of Amphibians and Reptiles*. Plenum Press, New York, p, 385–517.

393 Telford S.R. 2009. *Hemoparasites of the Reptilia: Color atlas and text*. CRC Press,  
394 Florida, 394 pp.

395 The IUCN Red List of Threatened Species. 2017. International Union for Conservation  
396 of Nature. Access: 18/10/2017. Available from: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

- 397 Uetz P., Freed P., Jirí H. (eds.). 2015. The Reptile Database. Access: 15/10/2017.  
398 Available from: <http://www.reptile-database.org>
- 399 Ujvari B., Madsen T., Olsson M. 2004. High prevalence of *Hepatozoon* spp.  
400 (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical  
401 Australia. J Parasitol. 90(3):670–672.
- 402 Valkiūnas G. 2005. General section: Methods of Collection and Investigation. In:  
403 Valkiūnas, G. (Eds). Avian Malaria Parasites and other Haemosporidia. CRC Press,  
404 Florida, p.213–216.
- 405 Valkiūnas G., Iezhova T.A., Križanauskienė A., Palinauska V., Schgal N.M., Bensch S.  
406 2008. A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for  
407 blood parasites. J Parasitol. 94(6):1395–1401.
- 408 Wied-Neuwied M., Prinz Z. 1824. Abbildungen zur zaturgeschichte Brasiliens. Isis von  
409 Oken. 15:1103.
- 410 Wozniak E., Kazacos K., Telford S.R.Jr., Mc Laughlin G. 1996. Characterization of the  
411 clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini*  
412 infections in unnatural reptilian hosts. Int J Parasitol. 26(2):141–146.
- 413 Wu Y.L., Dong H., Zhu S.H., Li L.J., Han H.Y.H., Zhao Q.P. et al. Report of A new  
414 species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Elaphe carinata* (Squamata:  
415 Colubridae) in Shanghai, China. Unpublished.

416

## 417 TABLES

418 Table 1- Species sampled in this study

419 Legend: Nt: Total of individuals samples in this study; Nm: Number of males; Nf:  
420 Number of females; IB: Number of samples from Butantan Institute; FPZSP: Number  
421 of samples from São Paulo Zoo.

422 Table 2- Morphologic description of positive samples under microscopy

423 Legend: **A:** Absent; **Az:** Azurophilic; **AZA:** Azurophilic with azurophilic points; **B:**  
424 Basophilic; **C:** Circular; **Ce:** Centralized; **E:** Elongated; **En:** Encapsulated; **I:**  
425 Immature; **Ir:** Irregular; **SAB:** Slightly azurophilic with basophilic points; **SAE:**  
426 Slightly azurophilic with eosinophilic points; **M:** Mature; **N/A:** Not applicable; **O:**  
427 Oval; **P:** Present; **Pl:** Polar; **Pr:** Peripheral; **R:** Regular.

428 Table 3- Positive samples resulted from PCR protocol using Hep primers.

429 Table 4- Positive samples resulted from PCR protocol using APC primers.

430

#### 431 FIGURES

432 Fig. 1- Prevalence of infection in blood smears from both study sites using light  
433 microscopy.

434 Fig. 2- Photomicrography of samples with single infections. A-B- *Spilotes pullatus*  
435 (Linnaeus, 1758); C- *Boa constrictor* (Linnaeus, 1758); D- *Chironius flavolineatus* (Jan,  
436 1863); E- *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824). Arrow: *Hepatozoon* spp.

437 Fig. 3- Photomicrography of samples with gamonts presenting more than one  
438 morphology. A-E - *Epicrates cenchria* (Linnaeus, 1758); F-G - *Bothrops jararaca*  
439 (Wied-Neuwied, 1824); H-I - *Crotalus durissus terrificus* (Linnaeus, 1758); J-K -  
440 *Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758); L-M - *Boa constrictor constrictor* (Linnaeus,  
441 1758). Arrow: Parasite; Curved arrow: Capsule; Big arrow: Hemoglobin loss; Triangle:  
442 Vacuole.

443 Fig. 4- Agarose gel electrophoresis of amplified 18S rRNA using Hep primers. From  
 444 left to right: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,6,7- negative samples under  
 445 microscopy; 3 to 5,8,9- positive samples under microscopy; 10- Negative control.

446 Fig. 5- Agarose gel electrophoresis of amplified Apicoplast fragment using APC  
 447 primers. From left to right: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,3- negative  
 448 samples under microscopy; 4 to 7- positive samples under microscopy; 8- Negative  
 449 control.

450 Fig. 6- Phylogenetic topology obtained for strains Hep 18, Hep 27, Hep 28, Hep 75,  
 451 Hep 79 and Hep 118 using the Neighbor-Joining method and p-distance, based on their  
 452 18S rDNA sequence. Numbers indicate the results of the bootstrap analysis with 1000  
 453 replicates above 75%.

454 Fig. 7- Phylogenetic topology obtained for strains APC 20, APC 20.1, APC 21, APC27,  
 455 APC 28, APC 55, APC 75 and APC 118 using the Neighbor-Joining method and p-  
 456 distance, based on their Apicoplast fragment sequence. Numbers indicate the results of  
 457 the bootstrap analysis with 1000 replicates above 75%.

458 Tables

459 Table 1- Species sampled in this study

<b>Specie</b>	<b>Nt</b>	<b>Nm</b>	<b>Nf</b>	<b>IB</b>	<b>FPZSP</b>
<i>Boa constrictor amarali</i>	2	-	2	1	1
<i>Boa constrictor constrictor</i>	9	3	6	2	7
<i>Bothrops alternatus</i>	2	-	2	-	2
<i>Bothrops insularis</i>	6	2	4	-	6
<i>Bothrops jararaca</i>	16	6	10	13	3

<i>Bothrops jararacussu</i>	2	-	2	1	1
<i>Bothrops moojeni</i>	3	-	3	-	3
<i>Corallus caninus</i>	2	2	-	-	2
<i>Chironius flavolineatus</i>	1	1	-	-	1
<i>Corallus hortulanus</i>	2	-	2	-	2
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	11	1	10	8	3
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	2	1	1	1	1
<i>Elapomorphus quinquelineatus</i>	1	-	1	1	-
<i>Epicrates cenchria</i>	3	2	1	-	3
<i>Epicrates crassus</i>	2	1	1	-	2
<i>Epicrates maurus</i>	1	-	1	-	1
<i>Eunectes murinus</i>	1	1	-	-	1
<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	1	1	-	1	-
<i>Erythrolamprus miliaris</i>	2	1	1	2	-
<i>Oxyrhopus guibei</i>	8	3	5	8	-
<i>Pantherophis guttatus</i>	2	2	-	2	-
<i>Philodryas olfersii</i>	13	7	6	1	12
<i>Philodryas patagoniensis</i>	1	-	1	-	1
<i>Python regius</i>	1	1	-	-	1
<i>Python bivittatus</i>	1	1	-	-	1
<i>Python molurus</i>	1	1	-	-	1
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	1	-	1	1	-
<i>Sibynomorphus neuwiedi</i>	1	-	1	1	-
<i>Spilotes pullatus</i>	3	2	1	-	3
<i>Tomodon dorsatus</i>	7	4	3	7	-

---



<i>Tropidodryas striaticeps</i>	3	1	2	2	1
<i>Xenodon merremii</i>	2	-	2	1	1

460 Nt: Total of individuals sampled in this study; Nm: Number of males; Nf: Number of  
461 females; IB: Number of samples from Butantan Institute; FPZSP: Number of samples  
462 from São Paulo Zoo.

463

464

465 Table 2- Morphologic description of positive samples under microscopy

466

	19	20	21			23	27		28	55	75		79		118
			A-C	D-G	H-I		A-F	G-L			A-C	D-J	A-B	C-F	
Parasite position	Pl	Pr	Pl	(E) Pr (D/F/	Pr	Pr	Pl	Pr	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl
Nucleophilic	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	P
Gamont	I	(A)-I	(A)-I	M	M	M	M	M	M	M	En	(D) I (E-J)	Em	M	M
Vacuole	P	P	A	A	A	A	P	A	P	A	A	P	A	A	A
Cytoplasm	Az	Az	Az	SAE	B	(A/B) SAE (C/D)	AZA	Az	AZA	B	Az	SAB	Az	Az	Az
Cytoplasm average	11,68± 0,69 x	16,12± 0,35 x	13,90± 3,41 x	13,90± 1,57 x	12,45± 0,33 x	14,16± 0,46 x	13,20± 0,80 x	13,66± 0,34 x	13,45± 0,44 x	14,14± 0 x	12,73± 0,36 x	13,93± 1,60 x	12,72± 0,88 x	14,20± 0,30 x	14,63± 0,65 x
Nucleo	Ir	R	R	R	N/A	Ir	R	R	R	R	N/A	R	(A) Ir (B)	R	R
Shape	O	E	C	Rt	N/A	O	O	O	O	O	N/A	S	(A) E (B)	R	R
Nucleo localization	Ce	Ce	Pl	Pl	N/A	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	N/A	Pl	(A) Pl (B)	Pl	Pl

Nucleo average	4,62± 0,40 x	7,20± 1,25 x	5,91± 0,99 x	5,91± 1,35 x	N/A	3,95± 0,19 x	4,42±0 ,69 x	5,45±0 ,45 x	4,79±0 ,30 x	5,41± 0 x	4,55± 2,67 x	4,14± 0,89 x	8,98± 6,35 x	4,45± 0,40 x	6,01± 0,28 x
Erythrocyte change	A	P	P	P	P	A	P	A	P	A	P	P	P	P	P
Nucleus displacement	A	P	P	P	P	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P

467

468 **A:** Absent; **Az:** Azurophilic; **AZA:** Azurophilic with azurophilic points; **B:** Basophilic; **C:** Circular; **Ce:** Centralized; **E:** Elongated;; **En:**

469 Encapsulated; **I:** Immature; **Ir:** Irregular; **SAB:** Slightly azurophilic with basophilic points; **SAE:** Slightly azurophilic with eosinophilic points;

470 **M:** Mature; **N/A:** Not applicable; **O:** Oval; **P:** Present; **Pl:** Polar; **Pr:** Peripheral; **R:** Regular.

Table 3- Positive samples resulted from PCR protocol using Hep primers.

<b>Sample</b>	<b>Specie</b>	<b>Institution</b>	<b>Provenance</b>
Hep 18	<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Wildlife
Hep 27	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
Hep 28	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
Hep 75	<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	Wildlife
Hep 79	<i>Boa constrictor constrictor</i>	FPZSP	Wildlife
Hep 118	<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	Wildlife

Table 4- Positive samples resulted from PCR protocol using APC primers.

<b>Sample</b>	<b>Specie</b>	<b>Institution</b>	<b>Provenance</b>
APC 20	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	Wildlife
APC 20 (1)	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	Wildlife
APC 21	<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Wildlife
APC 27	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
APC 28	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
APC 55	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	Wildlife
APC 75	<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	Wildlife
APC 79	<i>Boa constrictor constrictor</i>	FPZSP	Wildlife
APC 118	<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	Wildlife

## Figures

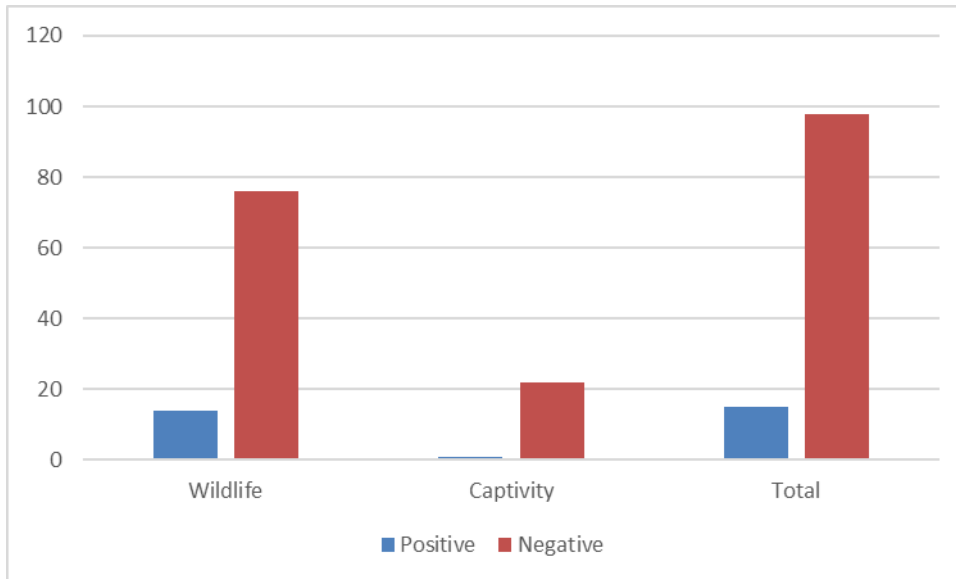


Figure 1: Prevalence of infection in blood smears from both study sites using light microscopy.

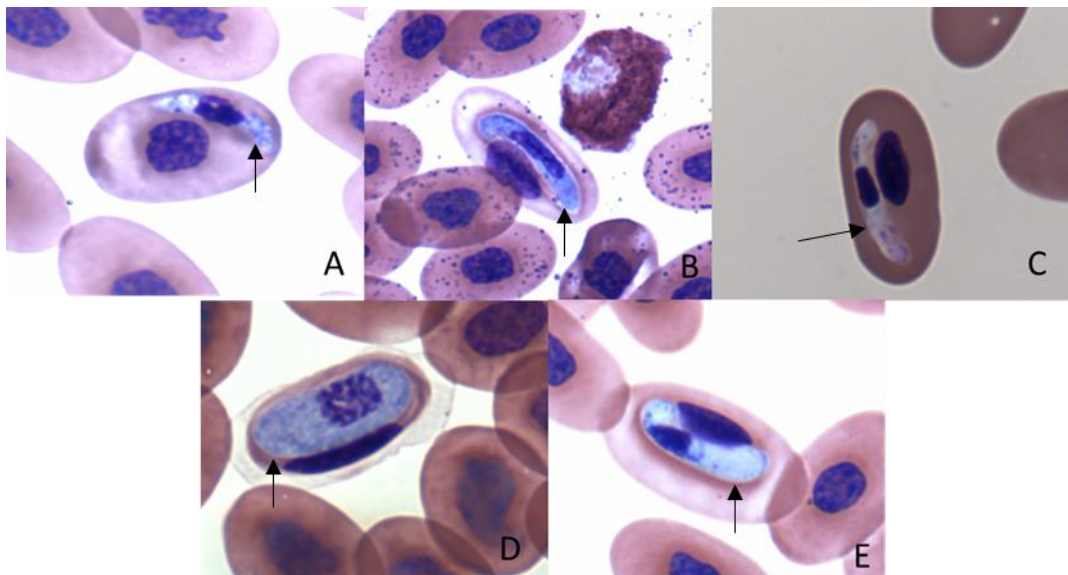


Figure 2. Photomicrography of samples with single infections. A-B- *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758); C- *Boa constrictor* (Linnaeus, 1758); D- *Chironius*

*flavolineatus* (Jan, 1863); E- *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824). Arrow:  
*Hepatozoon* spp.

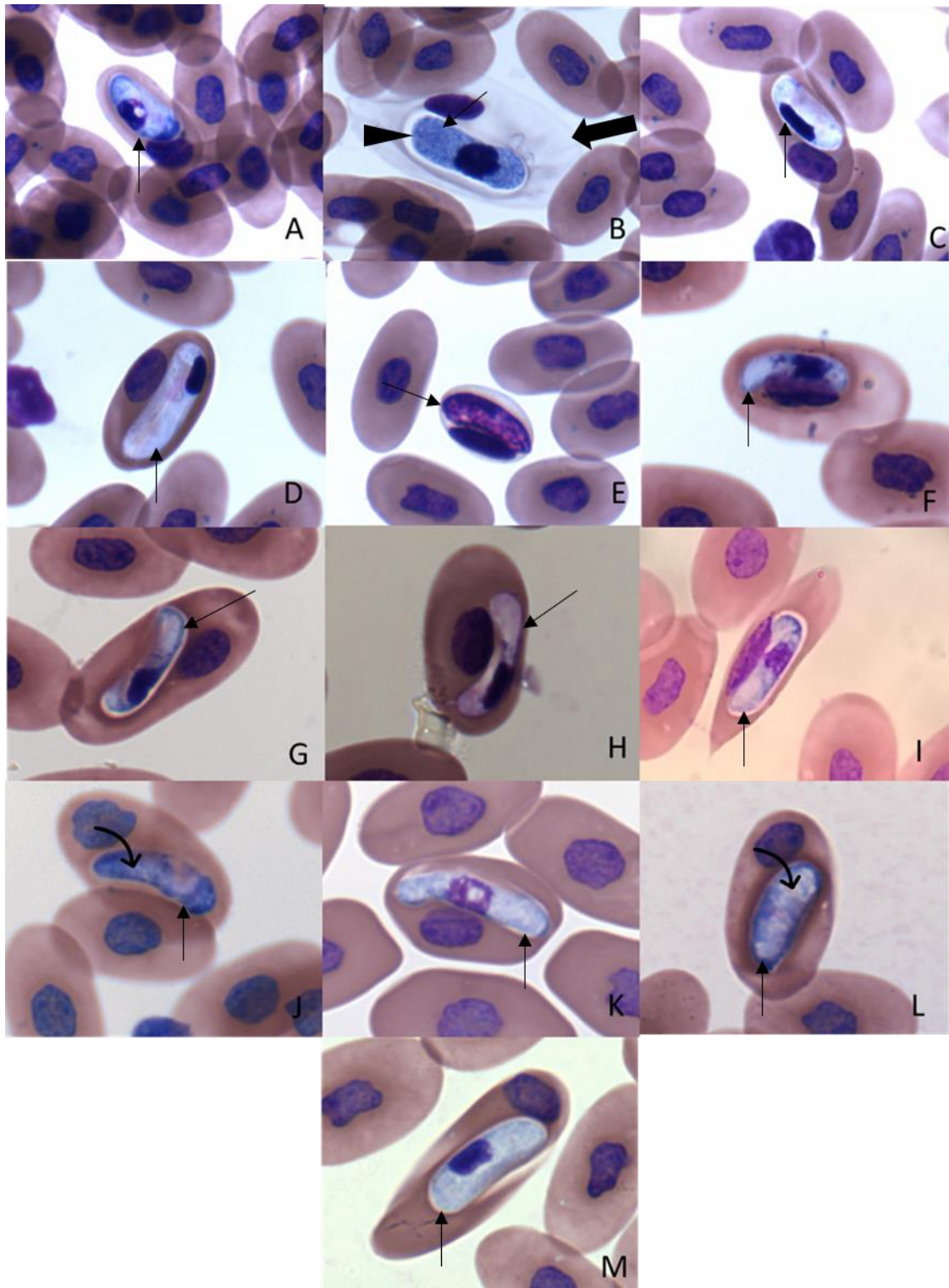


Figure 3. Photomicrography of samples with gamonts presenting more than one morphology. A-E - *Epicrates cenchria* (Linnaeus, 1758); F-G - *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824); H-I - *Crotalus durissus terrificus* (Linnaeus, 1758); J-K -

*Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758); L-M - *Boa constrictor constrictor* (Linnaeus, 1758). Arrow: Parasite; Curved arrow: Capsule; Big arrow: Hemoglobin loss; Triangle: Vacuole.

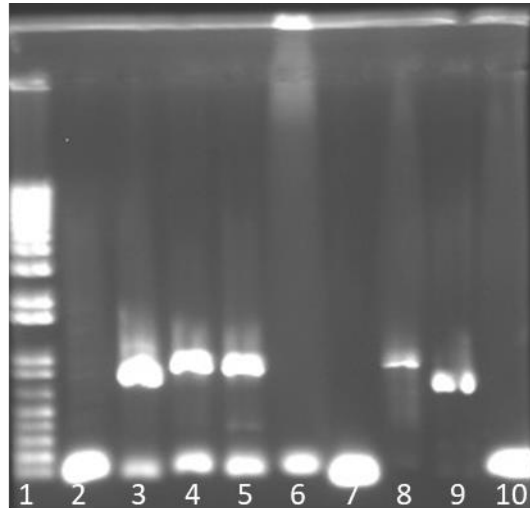


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of amplified 18S rRNA using Hep primers. From left to right: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,6,7- negative samples under microscopy; 3-5,8,9- positive samples under microscopy; 10- Negative control.



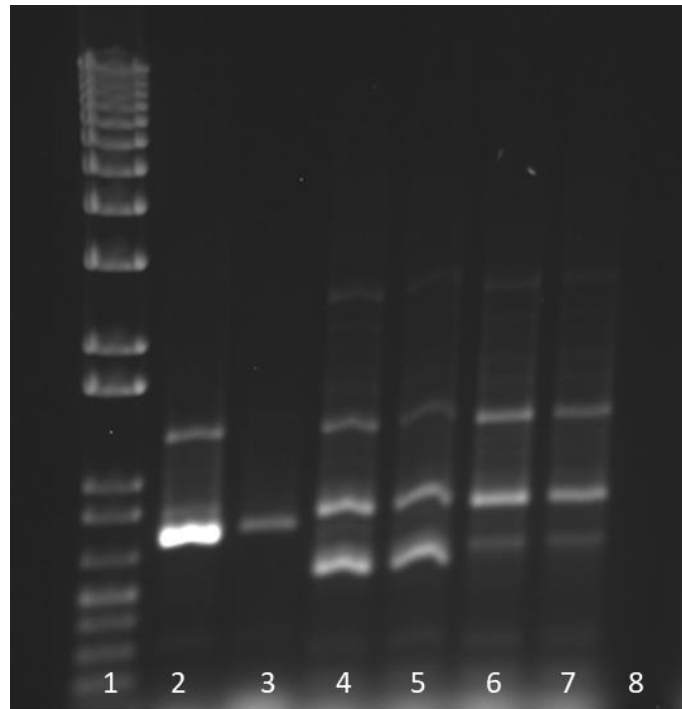


Figure 5- Agarose gel electrophoresis of amplified Apicoplast fragment using APC primers. From left to right: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,3- negative samples under microscopy; 4 to 7- positive samples under microscopy; 8- Negative control.

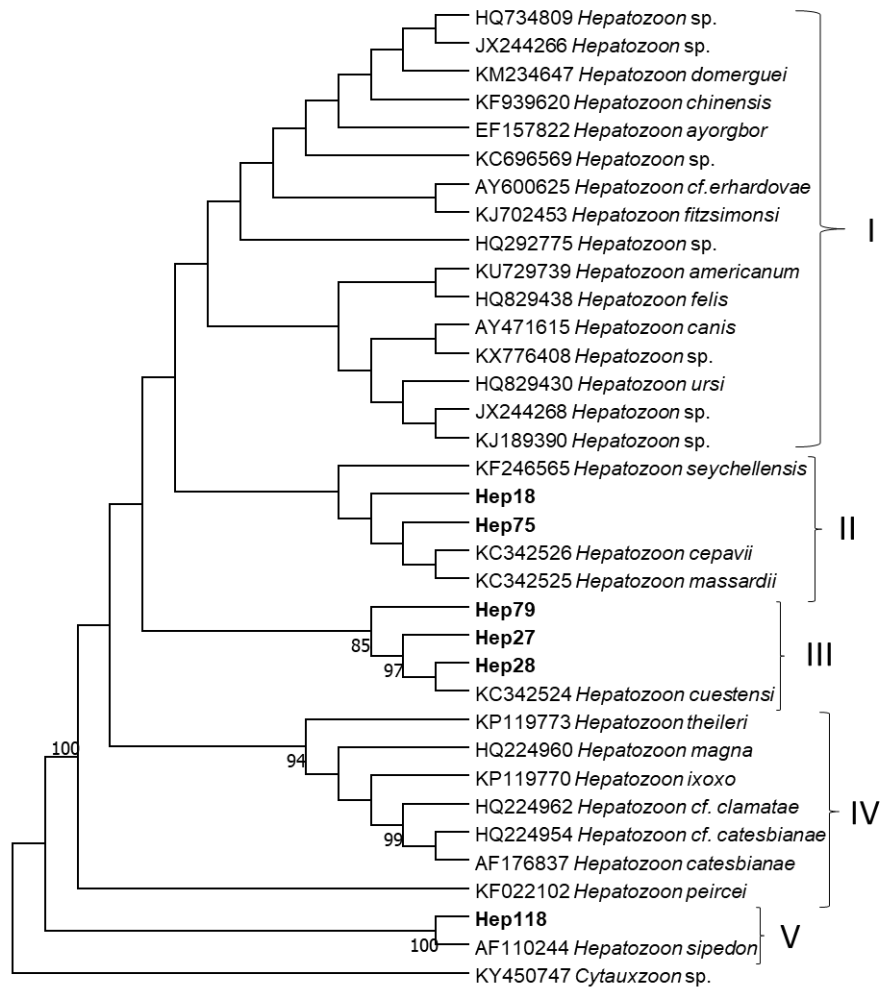


Figure 6- Phylogenetic topology obtained for strains Hep 18, Hep 27, Hep 28, Hep 75, Hep 79 and Hep 118 using the Neighbor-Joining method and p-distance, based on their 18S rDNA sequence. Numbers indicate the results of the bootstrap analysis with 1000 replicates above 75%.

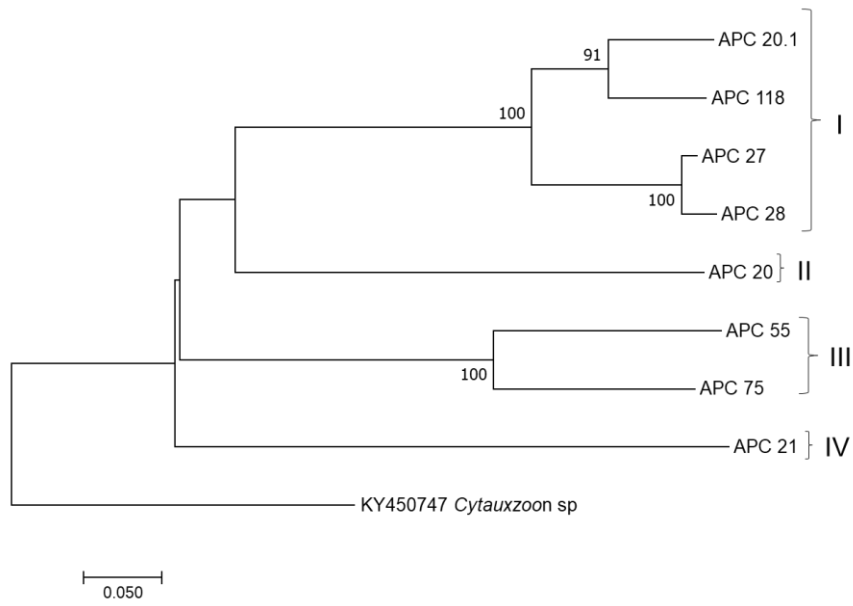


Figure 7- Phylogenetic topology obtained for strains APC 20, APC 20.1, APC 21, APC27, APC 28, APC 55, APC 75 and APC 118 using the Neighbor-Joining method and p-distance, based on their Apicoplast fragment sequence. Numbers indicate the results of the bootstrap analysis with 1000 replicates above 75%.

1 Tables

2 Table 1- Species sampled in this study

<b>Specie</b>	<b>Nt</b>	<b>Nm</b>	<b>Nf</b>	<b>IB</b>	<b>FPZSP</b>
<i>Boa constrictor amarali</i>	2	-	2	1	1
<i>Boa constrictor constrictor</i>	9	3	6	2	7
<i>Bothrops alternatus</i>	2	-	2	-	2
<i>Bothrops insularis</i>	6	2	4	-	6
<i>Bothrops jararaca</i>	16	6	10	13	3
<i>Bothrops jararacussu</i>	2	-	2	1	1
<i>Bothrops moojeni</i>	3	-	3	-	3
<i>Corallus caninus</i>	2	2	-	-	2
<i>Chironius flavolineatus</i>	1	1	-	-	1
<i>Corallus hortulanus</i>	2	-	2	-	2
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	11	1	10	8	3
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	2	1	1	1	1
<i>Elapomorphus quinquelineatus</i>	1	-	1	1	-
<i>Epicrates cenchria</i>	3	2	1	-	3
<i>Epicrates crassus</i>	2	1	1	-	2
<i>Epicrates maurus</i>	1	-	1	-	1
<i>Eunectes murinus</i>	1	1	-	-	1
<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	1	1	-	1	-
<i>Erythrolamprus miliaris</i>	2	1	1	2	-
<i>Oxyrhopus guibei</i>	8	3	5	8	-
<i>Pantherophis guttatus</i>	2	2	-	2	-

<i>Philodryas olfersii</i>	13	7	6	1	12
<i>Philodryas patagoniensis</i>	1	-	1	-	1
<i>Python regius</i>	1	1	-	-	1
<i>Python bivittatus</i>	1	1	-	-	1
<i>Python molurus</i>	1	1	-	-	1
<i>Sibynomorphus mikanii</i>	1	-	1	1	-
<i>Sibynomorphus newwiedi</i>	1	-	1	1	-
<i>Spilotes pullatus</i>	3	2	1	-	3
<i>Tomodon dorsatus</i>	7	4	3	7	-
<i>Tropidodryas striaticeps</i>	3	1	2	2	1
<i>Xenodon merremii</i>	2	-	2	1	1

3 Nt: Total of individuals sampled in this study; Nm: Number of males; Nf: Number of  
4 females; IB: Number of samples from Butantan Institute; FPZSP: Number of samples  
5 from São Paulo Zoo.

6

7

8 Table 2- Morphologic description of positive samples under microscopy

9

	19	20	21			23	27		28	55	75		79		118
			A-C	D-G	H-I		A-F	G-L			A-C	D-J	A-B	C-F	
Parasite position	Pl	Pr	Pl	(E) Pr (D/F/	Pr	Pr	Pl	Pr	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl
Nucleophilic	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	P
Gamont	I	(A)-I	(A)-I	M	M	M	M	M	M	M	En	(D) I (E-J)	Em	M	M
Vacuole	P	P	A	A	A	A	P	A	P	A	A	P	A	A	A
Cytoplasm	Az	Az	Az	SAE	B	(A/B) SAE (C/D)	AZA	Az	AZA	B	Az	SAB	Az	Az	Az
Cytoplasm average	11,68± 0,69 x	16,12± 0,35 x	13,90± 3,41 x	13,90± 1,57 x	12,45± 0,33 x	14,16± 0,46 x	13,20± 0,80 x	13,66± 0,34 x	13,45± 0,44 x	14,14± 0 x	12,73± 0,36 x	13,93± 1,60 x	12,72± 0,88 x	14,20± 0,30 x	14,63± 0,65 x
Nucleo	Ir	R	R	R	N/A	Ir	R	R	R	R	N/A	R	(A) Ir (B)	R	R
Shape	O	E	C	Rt	N/A	O	O	O	O	O	N/A	S	(A) E (B)	R	R
Nucleo localization	Ce	Ce	Pl	Pl	N/A	Pl	Pl	Pl	Pl	Pl	N/A	Pl	(A) Pl (B)	Pl	Pl

Nucleo average	4,62± 0,40 x	7,20± 1,25 x	5,91± 0,99 x	5,91± 1,35 x	N/A	3,95± 0,19 x	4,42±0 ,69 x	5,45±0 ,45 x	4,79±0 ,30 x	5,41± 0 x	4,55± 2,67 x	4,14± 0,89 x	8,98± 6,35 x	4,45± 0,40 x	6,01± 0,28 x
Erythrocyte change	A	P	P	P	P	A	P	A	P	A	P	P	P	P	P
Nucleus displacement	A	P	P	P	P	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P

10

- 11 **A:** Absent; **Az:** Azurophilic; **AZA:** Azurophilic with azurophilic points; **B:** Basophilic; **C:** Circular; **Ce:** Centralized; **E:** Elongated;; **En:**
- 12 Encapsulated; **I:** Immature; **Ir:** Irregular; **SAB:** Slightly azurophilic with basophilic points; **SAE:** Slightly azurophilic with eosinophilic points;
- 13 **M:** Mature; **N/A:** Not applicable; **O:** Oval; **P:** Present; **Pl:** Polar; **Pr:** Peripheral; **R:** Regular.

14 Table 3- Positive samples resulted from PCR protocol using Hep primers.

<b>Sample</b>	<b>Specie</b>	<b>Institution</b>	<b>Provenance</b>
Hep 18	<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Wildlife
Hep 27	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
Hep 28	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
Hep 75	<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	Wildlife
Hep 79	<i>Boa constrictor constrictor</i>	FPZSP	Wildlife
Hep 118	<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	Wildlife

15

16 Table 4- Positive samples resulted from PCR protocol using APC primers.

<b>Sample</b>	<b>Specie</b>	<b>Institution</b>	<b>Provenance</b>
APC 20	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	Wildlife
APC 20 (1)	<i>Spilotes pullatus</i>	FPZSP	Wildlife
APC 21	<i>Epicrates cenchria</i>	FPZSP	Wildlife
APC 27	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
APC 28	<i>Bothrops jararaca</i>	IB	Wildlife
APC 55	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	IB	Wildlife
APC 75	<i>Corallus hortulanus</i>	FPZSP	Wildlife
APC 79	<i>Boa constrictor constrictor</i>	FPZSP	Wildlife
APC 118	<i>Chironius flavolineatus</i>	FPZSP	Wildlife

17

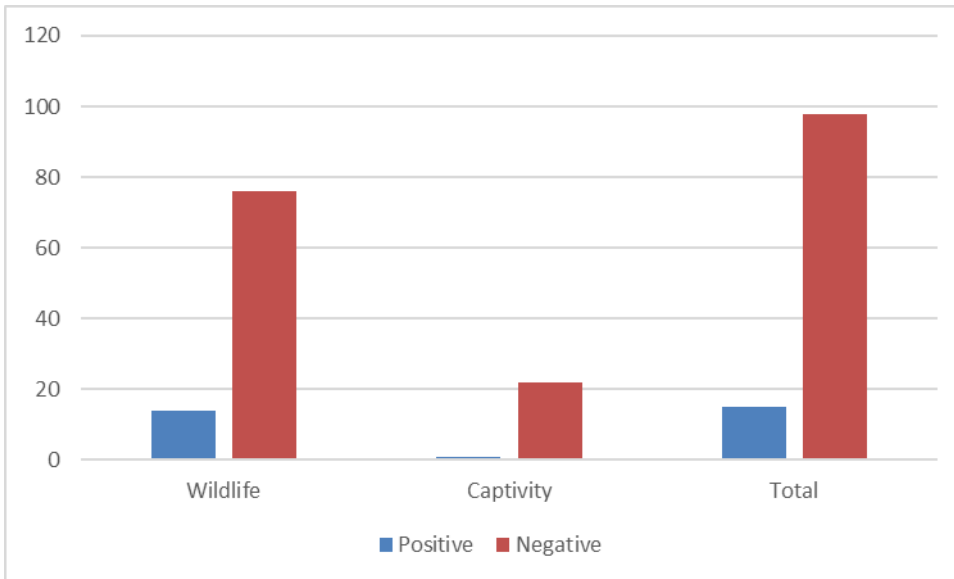
18

19



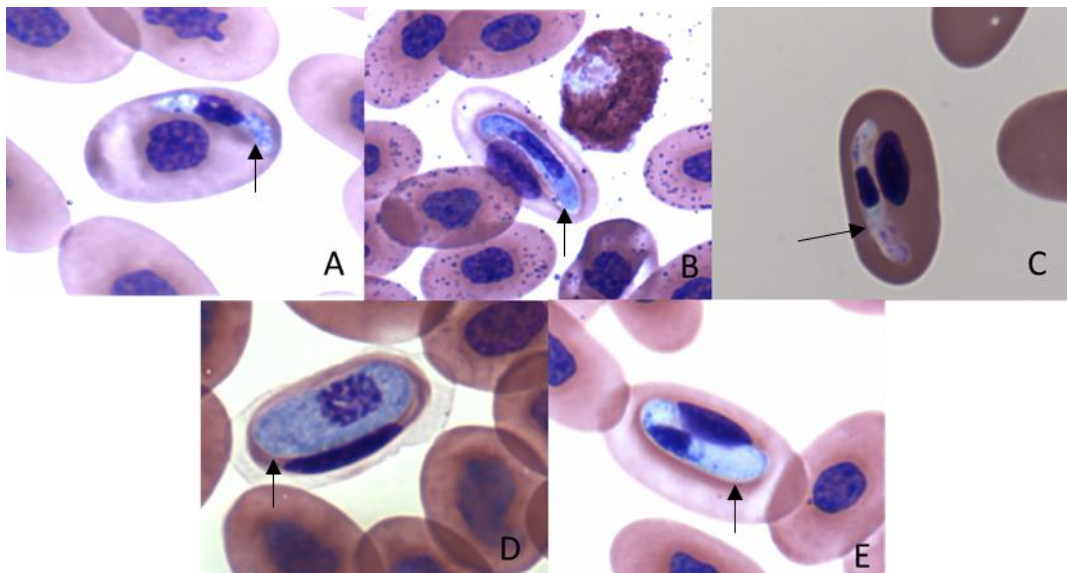
20 Figures

21



22

23 Figure 1: Prevalence of infection in blood smears from both study sites using  
24 light microscopy.



25

26 Figure 2. Photomicrography of samples with single infections. A-B- *Spilotes*  
27 *pullatus* (Linnaeus, 1758); C- *Boa constrictor* (Linnaeus, 1758); D- *Chironius*

28 *flavolineatus* (Jan, 1863); E- *Bothrops jararaca* (Wied-Neuwied, 1824). Arrow:

29 *Hepatozoon* spp.

30

31

32

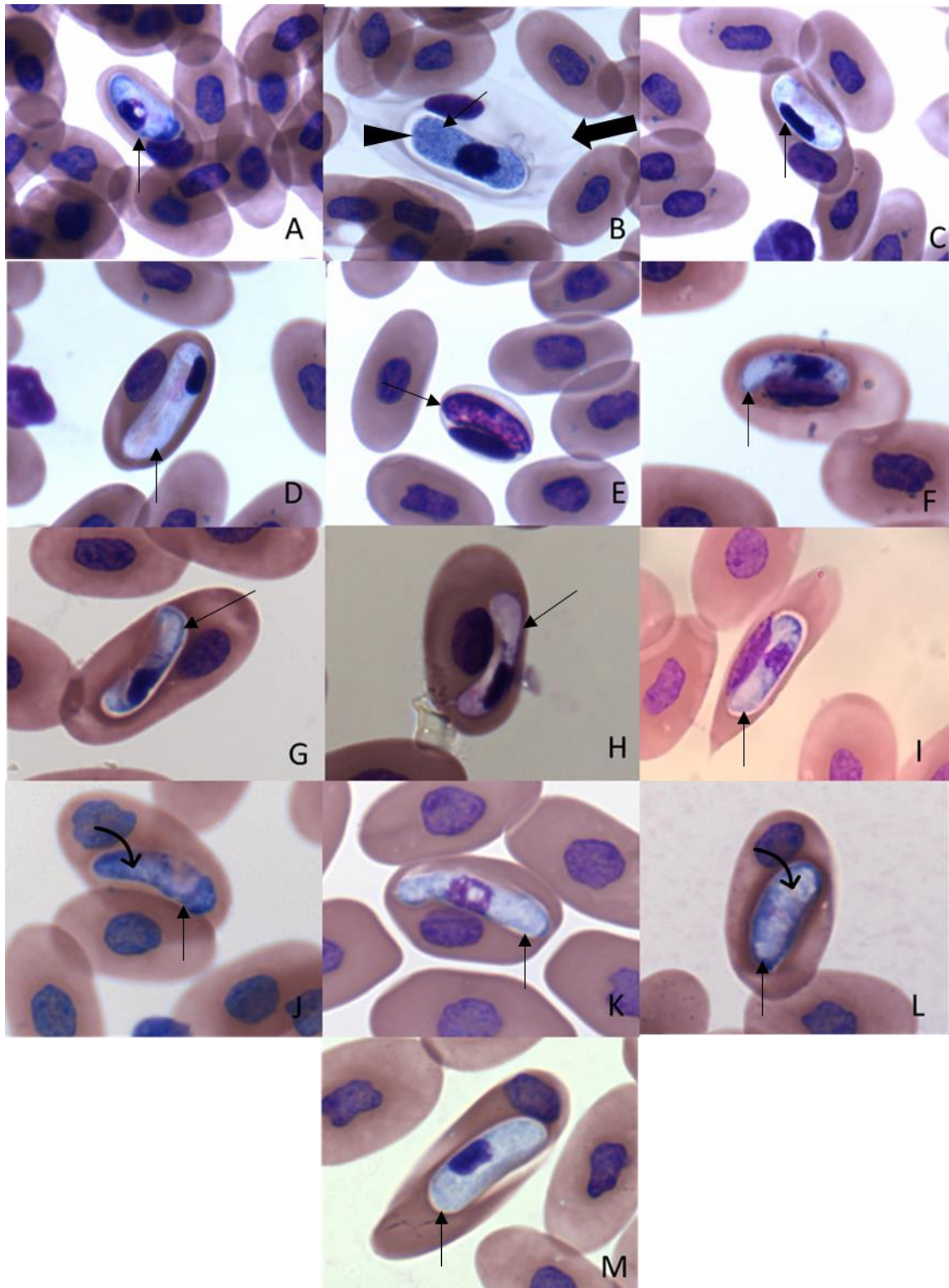
33

34

35

36

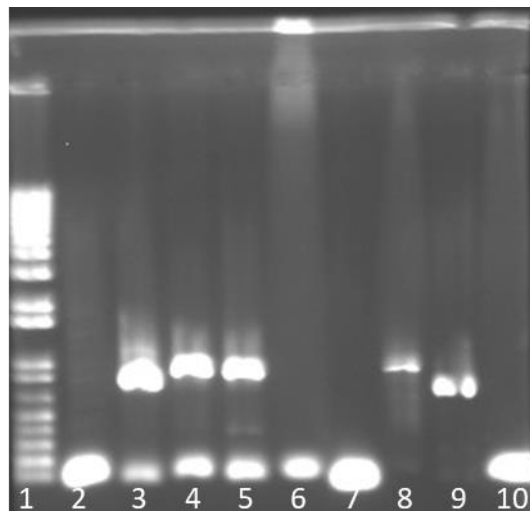
37



38

39 Figure 3. Photomicrography of samples with gamonts presenting more than one  
 40 morphology. A-E - *Epicrates cenchria* (Linnaeus, 1758); F-G - *Bothrops jararaca*  
 41 (Wied-Neuwied, 1824); H-I - *Crotalus durissus terrificus* (Linnaeus, 1758); J-K -  
 42 *Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758); L-M - *Boa constrictor constrictor* (Linnaeus,

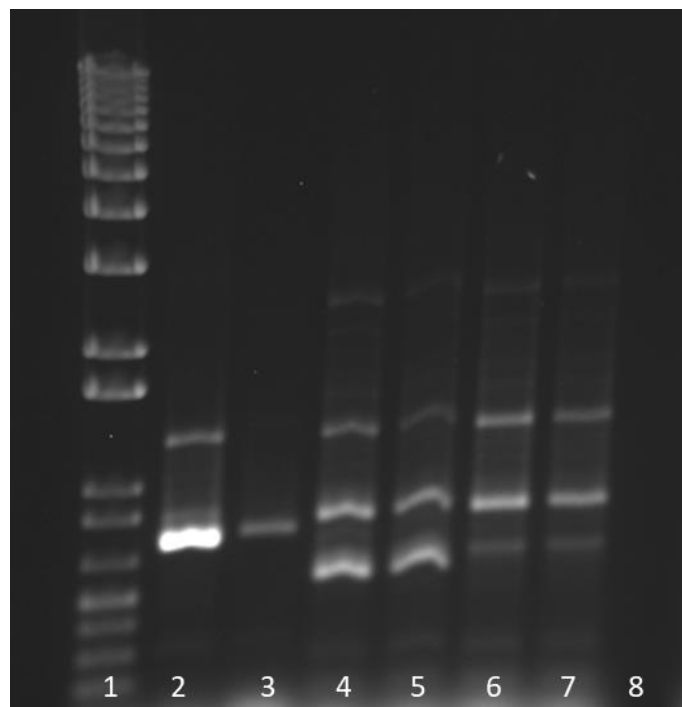
43 1758). Arrow: Parasite; Curved arrow: Capsule; Big arrow: Hemoglobin loss; Triangle:  
44 Vacuole.



45

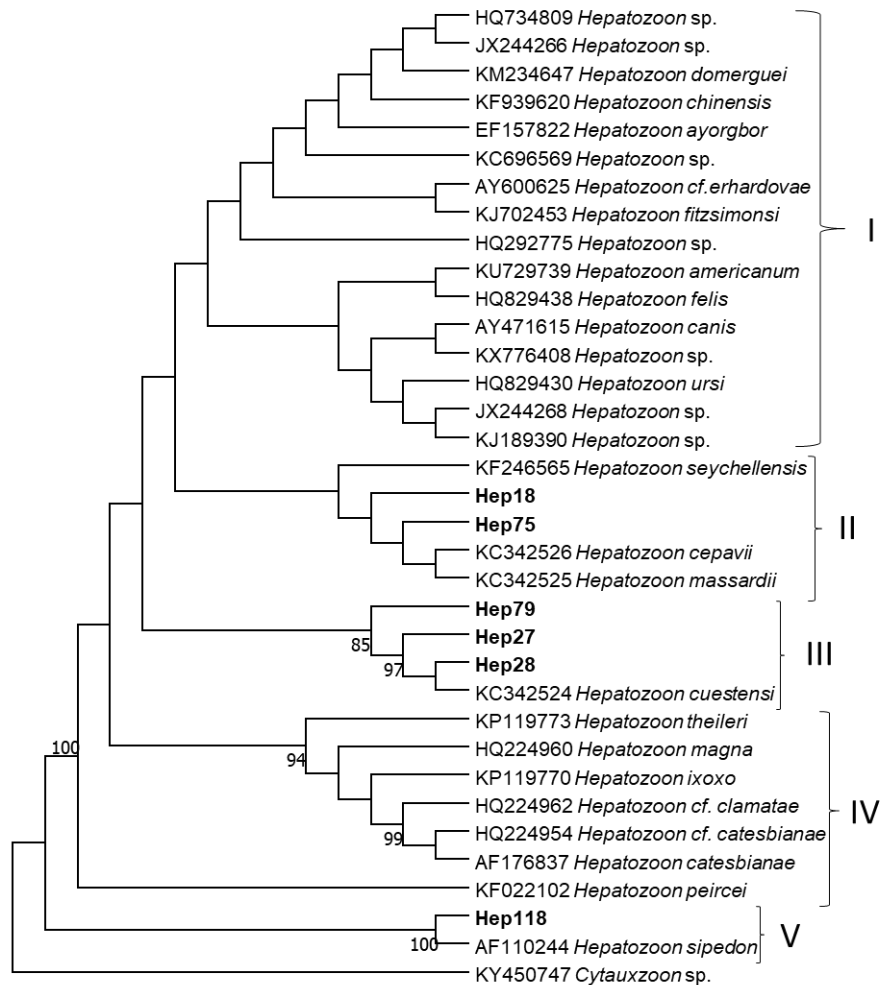
46 Figure 4. Agarose gel electrophoresis of amplified 18S rRNA using Hep  
47 primers. From left to right: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science); 2,6,7-  
48 negative samples under microscopy; 3-5,8,9- positive samples under  
49 microscopy; 10- Negative control.

50

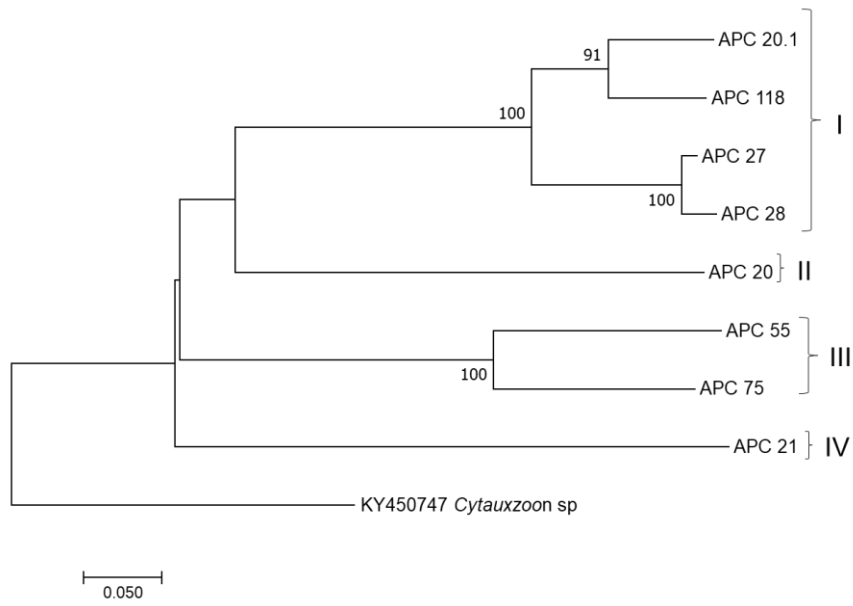


51

52 Figure 5- Agarose gel electrophoresis of amplified Apicoplast fragment using  
 53 APC primers. From left to right: 1- 1kb ladder (GeneRuler- Thermo Science);  
 54 2,3- negative samples under microscopy; 4 to 7- positive samples under  
 55 microscopy; 8- Negative control.  
 56



57  
 58 Figure 6- Phylogenetic topology obtained for strains Hep 18, Hep 27, Hep 28, Hep 75,  
 59 Hep 79 and Hep 118 using the Neighbor-Joining method and p-distance, based on their  
 60 18S rDNA sequence. Numbers indicate the results of the bootstrap analysis with 1000  
 61 replicates above 75%.



62

63 Figure 7- Phylogenetic topology obtained for strains APC 20, APC 20.1, APC 21,  
 64 APC27, APC 28, APC 55, APC 75 and APC 118 using the Neighbor-Joining method  
 65 and p-distance, based on their Apicoplast fragment sequence. Numbers indicate the  
 66 results of the bootstrap analysis with 1000 replicates above 75%.

67

68

69

**Anexo 5:** Autorização para atividades com finalidade científica. SISBIO 54335-

1



## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 54335-1</b>	<b>Data da Emissão: 27/05/2016 15:34</b>	<b>Data para Revalidação*: 26/06/2017</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

### Dados do titular

Nome: Priscila Rodrigues Calil	CPF: 104.498.986-60
Título do Projeto: Protocolo de detecção molecular para identificação de Hepatozoon sp. nas serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Instituto Butantan	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	CNPJ: 45.358.058/0001-40

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Revisão bibliográfica	05/2016	05/2016
2	Elaboração do projeto	06/2016	06/2016
3	Coletas de sangue	07/2016	08/2016
4	Microscopia	08/2016	10/2016
5	Padronização da Extração do DNA genômico	09/2016	11/2016
6	Padronização do PCR com amostra positiva	09/2016	11/2016
7	Realização da PCR 18S rRNA	12/2016	12/2016
8	Extração DNA e PCR 18S	01/2017	03/2017
9	Sequenciamento gênico	01/2017	05/2017
10	PCR-RFLP	02/2017	05/2017
11	Análise de dados	02/2017	06/2017
12	Análise Filogenética	04/2017	10/2017
13	Elaboração da Dissertação e atualização da bibliografia	10/2017	12/2017
14	Defesa pública	02/2018	02/2018

### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
---	------	--------	-----	-----------------	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 87591999**







## Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 54335-1</b>	<b>Data da Emissão: 27/05/2016 15:34</b>	<b>Data para Revalidação*: 26/06/2017</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

### Dados do titular

Nome: Priscila Rodrigues Calil	CPF: 104.498.986-60
Título do Projeto: Protocolo de detecção molecular para identificação de Hepatozoon sp. nas serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Instituto Butantan	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	CNPJ: 45.358.058/0001-40

1	Carolina Romeiro Fernandes Chagas	responsável da análises clínicas	324.700.598-60	330812191 SSP-SP	Brasileira
2	Patricia Locosque Ramos	Orientadora	263.190.078-26	270955768 SSP-SP	Brasileira
3	Fabício Braga Rassy	Responsável pela Divisão de Veterinária	899.437.403-53	95002027611 SSP-CE	Brasileira
4	Cybele Sabino Lisboa	responsável pelo setor de répteis	308.123.628-29	29277571-4 SSP-SP	Brasileira

### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Fora de UC Federal

### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Squamata

### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Coleta manual

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO PARQUE ZOOLOGICO DE SAO PAULO	







### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número: 54335-1</b>	<b>Data da Emissão: 27/05/2016 15:34</b>	<b>Data para Revalidação*: 26/06/2017</b>
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Priscila Rodrigues Caill	CPF: 104.498.986-60
Título do Projeto: Protocolo de detecção molecular para identificação de Hepatozoon sp. nas serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e do Instituto Butantan	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS	CNPJ: 45.358.058/0001-40

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 87591999**



**Anexo 6:** Parecer Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos. CEUA  
5726020616

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Protocolo de detecção molecular para identificação de Hepatozoon sp. nas serpentes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo", protocolada sob o CEUA nº 5726020616, sob a responsabilidade de **Priscila Rodrigues Calil e equipe; Priscila Rodrigues Calil; Carolina Romeiro Fernandes Chagas; Cybele Sabino Lisboa; Giuseppe Puerto; Fabrício Braga Rassy** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 13/06/2016.

We certify that the proposal "Molecular detection protocol to identify Hepatozoon sp. in snakes Park Foundation Sao Paulo Zoo", utilizing 100 Reptiles (males and females), protocol number CEUA 5726020616, under the responsibility of **Priscila Rodrigues Calil and team; Priscila Rodrigues Calil; Carolina Romeiro Fernandes Chagas; Cybele Sabino Lisboa; Giuseppe Puerto; Fabrício Braga Rassy** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 06/13/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2016** a **10/2017**

Área: **Programa de Pós-Graduação Em Conservação da Fauna**

Origem: **Fundação Parque Zoológico de São Paulo**

Espécie: **Répteis**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 15 anos**

N: **100**

Linhagem: **Squamata**

Peso: **200 a 3000 g**

Resumo: Hemogregarinas são os hemoparasitas mais comuns encontrados no grupo dos répteis. Hemogregarinidae, Karyolysidae e Hepatozoidae são distinguidos com base nos diferentes padrões de desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados que operam como vetores. Dentro desse grupo, o gênero Hepatozoon representa um dos seis gêneros de haemogregarinas, dos quais, todos, têm um ciclo heteroxênico envolvendo um hospedeiro intermediário vertebrado e um hospedeiro invertebrado definitivo. Encontrado nas células do fígado e pulmão, esse parasita, embora bem adaptado, pode causar hipertrofia dos eritrócitos, deslocamento do núcleo para borda, afetando a capacidade de carrear oxigênio promovendo uma liberação compensatória de glóbulos vermelhos imaturos na circulação, algumas espécies causam rompimento do núcleo e, outras podem causar desmoglobinização. O diagnóstico e identificação são, geralmente, através da identificação do parasita em esfregaços sanguíneos, porém os resultados podem não ser confiáveis em casos negativos, assim como para identificar as espécies, uma vez que são diferenciadas apenas por suas dimensões. Por essa razão há a necessidade de estabelecer um diagnóstico mais sensível para tal detecção.

Local do experimento: as contenções ocorrerão no Setor de Répteis e no laboratório do Museu de Zoologia do Instituto Butantan

São Carlos, 31 de agosto de 2016



Prof. Dr. Luiz Fernando Takase  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos