

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS.

**Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de hemogregarinas
(Apicomplexa: Adeleina) presentes em répteis de vida livre e cativeiro.**

Letícia Pereira Úngari

Uberlândia-MG

Abril, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS.

**Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de hemogregarinas
(Apicomplexa: Adeleina) presentes em répteis de vida livre e cativeiro.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Mestre.

Letícia Pereira Úngari
Aluna

Prof^a Dr^a Márcia Cristina Cury
Orientadora

Prof^o Dr^o André Luiz Quagliatto Santos
Co-orientador

Uberlândia
Abril – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

U57c

2017

Úngari, Letícia Pereira, 1991

Caracterização morfológica, morfométrica e molecular de hemogregarinas (Apicomplexa: Adeleina) presentes em répteis de vida livre e cativeiro / Letícia Pereira Úngari. - 2017.

136 p. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Cury.

Coorientador: André Luiz Quagliatto Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Epidemiologia - Teses. 3. Doenças parasitárias - Teses. 4. - Teses. I. Cury, Márcia Cristina. II. Santos, André Luiz Quagliatto. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS.

LETÍCIA PEREIRA ÚNGARI

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Parasitologia

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Maria Júlia Rodrigues da Cunha

Prof^a Dr^a Lúcia Helena O'Dwyer de Oliveira

Prof^a Dr^a Márcia Cristina Cury

Dedicatória

À Deus, meu anjo da guarda e meus mentores espirituais.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

À minha mãe, meu pai e minha irmã, por todo apoio e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Sempre aptos a me auxiliar e amparar. Amo vocês!

À minha vozinha, Zilda, por todo amor, paciência e compreensão nos momentos em que fui ausente, pois precisava estudar ou fazer experimentos.

Pensamento

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos,
numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos...

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...

TUDO BEM!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...

É amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ter fé mais ou menos, acreditar
mais ou menos...

Senão, a gente corre o risco de se tornar pessoas mais ou menos.”

Francisco Cândido Xavier.

Agradecimentos

À minhas amigas do Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos. Sem vocês meus dias não seriam tão alegres.

À minha amiga Júlia, “chefe”, por todo apoio, paciência e carinho. Sempre me auxiliando desde a Iniciação Científica. Obrigada pelos momentos de alegria e descontração, assim como pelo apoio em momentos difíceis.

À minha querida amiga Natália Nasser, por toda dedicação e paciência nesses dois anos, devo grande parte dessa conquista a você. Agradeço também por todo o apoio e carinho quando mais precisei, em momentos de angústia, sempre esteve presente. E é claro, por fazer todos os meus dias mais leves e divertidos, como todo esse carinho e amor que você transborda.

À minha amiga Kelem, por toda dedicação e paciência, sempre disposta a me ajudar, principalmente com o desenvolvimento do projeto e coleta das amostras. Obrigada também por todas as conversas e momentos alegres.

À minha orientadora e amiga Márcia Cristina Cury, sempre disposta a me ajudar. Sem você e todo o seu apoio eu não teria conseguido, obrigada por acreditar em mim e me auxiliar a realizar mais um sonho. Grande parte dessa conquista devo a você, “mãe científica”.

Ao meu Coorientador André Luiz Quagliatto Santos, por me acompanhar desde a Iniciação Científica, disposto a me auxiliar sempre. Obrigada por toda atenção e dedicação professor.

À professora Lúcia e à doutoranda Maria Regina por todo carinho, atenção e paciência com que me receberam e por todo ensinamento passado nesses meses que permaneci em Botucatu no Laboratório de vocês. Espero poder fazer por alguém um dia o que vocês fizeram por mim.

À toda equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres, pelo acolhimento e atenção que tiveram comigo durante minhas idas ao LAPAS e viagens à trabalho.

Aos irmãos Matheus Rabello e Rodrigo Rabello, por sempre estarem dispostos a ajudar. Por todo ensinamento passado durante as viagens a trabalho.

Ao Guilherme Carrara, por todo auxílio na pesquisa durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Lúcio André Viana e orientanda Amanda Picelli por todo apoio fornecido durante esses dois anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. João P. Maia por toda atenção, paciência e apoio fornecido nesses dois anos de mestrado, sempre apto a me auxiliar.

Aos meus amigos de Uberlândia, especialmente à Daniela Benevides, Bárbara Zelante, Júlia Medeiros, Letícia Penariol, Felipe Machini e Guilherme Ribeiro, por todos os momentos bons, cheios de risadas, e pela compreensão quando estive ausente.

Aos meus amigos de Araraquara, especialmente à Marcella Bassi, Marcela Alvarez, Marilia Munhoz, Patrícia Barão, Jéssica Aiello, Luiza Montoro e Fernanda Rodrigues, por todo carinho, apoio e incentivo nesses dois anos, vocês são minha segunda família.

Aos meus familiares, por sempre estarem ao meu lado. Essa conquista só foi possível com o apoio, paciência e carinho de vocês.

À Rose, por todo carinho e apoio nesses dois anos de mestrado.

Aos meus padrinhos, por todo apoio fornecido e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial.

À Gabriela, minha prima de consideração, por todo carinho e paciência nesses meses que fiquei em sua casa à trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelo conhecimento passado durante as disciplinas.

Às técnicas, Juliana e Elaine, do Laboratório de Parasitologia, por toda paciência e dedicação.

Às secretárias do PPIPA, Lucélia e Lucileide, pelos serviços prestados aos docentes e discentes da pós-graduação.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Muito obrigada!

Lista de Abreviaturas

AN: Núcleo do parasito
AP: Área do parasito
ANOVA: Análise de Variância
CEUA: Comitê de Ética Animal
CP: Comprimento do parasito
CN: Comprimento do núcleo
DP: Desvio Padrão
FAMEV: Faculdade de Medicina Veterinária
FUNED: Fundação Ezequiel Dias
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas
 Km^2 : Quilómetros quadrados
LAPAS: Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres
LN: Largura do núcleo
LP: Largura do parasito
M: Média
Macro1: Macrogametócito 1
Macro2: Macrogametócito 2
MAX: Máxima
Micro1: Microgametócito 1
Micro2: Microgametócito 2
Min.: Minutos
MIN: Mínima
mm: Milímetros
M1: Morfologia 1
M2: Morfologia2
M3: Morfologia 3
M4: Morfologia 4
M5: Morfologia 5
Nº: Número de amostras
N: Negatividade
P: Positividade
p: análise estatística
pb: Pares de bases
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
s: Segundos
SBH: Sociedade Brasileira de Herpetologia
SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFU: Universidade Federal de Uberlândia
UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
 χ^2 : χ ao quadrado
+/-: Mais ou menos
>: Maior que
<: Menor que
%: Porcentagem/Por cento
 μm : micrometro
 μm^2 : micrometros ao quadrado

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema taxonômico do Filo Apicomplexa.

Pág.14

Figura 2: Local de coleta de quelônios de vida livre no período de julho a setembro de 2015 e 2016.

Pág.32

Figura 3: Local de coleta de crocodilianos de vida livre no período de julho a agosto de 2015 e 2016.

Pág.33

Figura 4: Método de captura (A) e imobilização (B) de crocodilianos.

Pág.34

Figura 5: Coleta de sangue pelo seio venoso paravertebral cervical em *Crotalus durissus* (A), *Python* sp. (B), *Caiman crocodilus* (C) e *Chelonoids* sp. (D).

Pág.35

Figura 6: Macromerontes observados em extensões sanguíneas de testudines. (A) formação inicial com 9-15 núcleos. (B) intensa divisão da cromatina nuclear (>50 núcleos). Parasitos indicados por setas. Escala: (A) 10 μ m; (B) 20 μ m.

Pág.49

Figura 7: Estágios evolutivos de *Haemogregarina* sp. no sangue de *Podocnemis unifilis* (indicados por setas): A) trofozoíto; B) pré-merontes; C) merontes primários eritrocíticos; D) Microgametócitos (Micro1); E) Microgametócitos (Micro2) F-G) Macrogametócitos (Macro1); H) Macrogametócitos (Macro2). Escala: 10 μ m.

Pág.50

Figura 8: Gametócitos extraeritrocíticos e intraeritrocíticos de *Hepatozoon* sp. em *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro. A-B) Gametócitos extraeritrocíticos, ou formas livres. C-J) Gametócitos intraeritrocíticos. Escala: 10 μ m.

Pág.54

Figura 9: Variações nas características morfológicas de gametócitos intraeritrocíticos de *Hepatozoon* em serpentes de vida livre e de cativeiro. A) M1: *Crotalus durissus* de vida livre; B) M2: *Crotalus durissus* de vida livre; C) M3: *Bothrops moojeni* de cativeiro; D) *Boa constrictor* de cativeiro; E) M5: *Crotalus durissus* de cativeiro. Escala: 10 μ m.

Pág.58

Figura 10: Visualização em gel de agarose (1,5%) dos produtos da PCR do gene 18S rDNA de *Hepatozoon* sp. amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos HepF300/Hep900. CP: Controle positivo; 1: Amostra de sangue de crocodiliano de vida livre (coleta em 2015); 2: crocodiliano de vida livre (coleta em 2016); 3: crocodiliano de cativeiro; 4: serpentes de

vida livre; 5: serpente de cativeiro LAPAS; 6: serpente de cativeiro FUNED; CN: Controle negativo.

Pág.61

Figura 11: Visualização em gel de agarose (1,5%) dos produtos da PCR do gene 18S rDNA de hemogregarina amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2. CP: Controle positivo, 1: Amostra de sangue de testudine de cativeiro; 2: testudine de vida livre (coleta 2015); 3: testudine de vida livre (coleta 2016); 4: crocodiliano de cativeiro; 5: crocodiliano de vida livre (coleta em 2015); 6: crocodiliano de vida livre (coleta em 2016); CN: Controle negativo.

Pág.62

Figura 12: Árvore de “Neighbor-Joining” baseada no gene 18S rRNA (500pb), demonstrando as relações entre as sequências de *Haemogregarina* em quelônios e *Hepatozoon* em serpentes e crocodilianos obtidos neste estudo com sequências disponíveis no “GenBank”. *Babesia canis vogeli* foi usada como “outgroup”. Números nos nós indicam “Bootstrap” para 1000 réplicas. Valores inferiores a 50 não foram demonstrados. Escala indica a distância evolucionária 0,01 nucleotídeos por posição na sequência. Sequências obtidas nesse estudo estão destacadas em negrito.

Pág.64

Lista de tabelas

Tabela 1: Locais de ocorrência de *Hepatozoon* spp. e seus respectivos hospedeiros crocodilianos.

Pág.19

Tabela 2: Informações sobre as sequencias de oligonucleotídeos utilizadas na PCR para hemoparasitos do grupo das hemogregarinas.

Pág.39

Tabela 3: Condições do ciclo para cada par de oligonucleotídeo testado pela técnica da PCR.

Pág.39

Tabela 4: Espécies de testudines, crocodilianos e serpentes cativas presentes no LAPAS nos meses de junho a setembro de 2015 e espécies de serpentes cativas procedentes da FUNED nos meses de dezembro de 2015 a janeiro de 2016.

Pág.44

Tabela 5: Espécies de testudines, crocodilianos e serpentes de vida livre procedentes dos estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso, cujas amostras foram colhidas nos anos de 2015 e 2016.

Pág.45

Tabela 6: Relação entre positividade para hemogregarinas e ambiente de vida (vida livre/cativo) dos répteis analisados no presente estudo, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Pág.46

Tabela 7: Associação entre positividade e sexo de cada grupo de répteis analisados no presente estudo, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Pág.47

Tabela 8: Positividade para hemogregarinas entre as faixas etárias (adulto, jovem e filhote) de testudines, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Pág.47

Tabela 9: Positividade para hemogregarinas entre as faixas etárias (adulto, adulto-jovem e jovem) para os crocodilianos, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Pág.48

Tabela 10: Positividade para hemogregarinas nas espécies de serpentes peçonhentas e não peçonhentas procedentes da FUNED, cujas amostras sanguíneas foram coletadas no período de dezembro de 2015 a janeiro de 2016.

Pág.48

Tabela 11: Características morfológicas das formas evolutivas de *Haemogregarina* sp. observadas por microscopia óptica nas extensões sanguíneas de testudines de vida livre e cativeiro procedentes dos Estados de Goiás e Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016.

Pág.51

Tabela 12: Dados morfométricos das formas evolutivas do gênero *Haemogregarina* em testudines de vida livre e cativeiro.

Pág.52

Tabela 13: Dados morfométricos das formas evolutivas do gênero *Haemogregarina* em testudines de vida livre e cativeiro.

Pág.52

Tabela 14: Características morfológicas das formas evolutivas de *Hepatozoon* sp. observadas por microscopia óptica nas extensões sanguíneas de crocodilianos de vida livre e cativeiro procedentes dos Estados de Mato Grosso e Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016.

Pág.55

Tabela 15: Dados morfométricos das formas evolutivas de *Hepatozoon* sp. em crocodilianos da espécie *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro.

Pág.56

Tabela 16: Dados morfométricos de gametócitos extraeritrocíticos *Hepatozoon* sp. em crocodilianos da espécie *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro.

Pág.56

Tabela 17: Características morfológicas das formas evolutivas de *Hepatozoon* spp. observadas por microscopia óptica nas extensões sanguíneas de serpentes de vida livre e cativeiro procedentes do Estado de Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016.

Pág.58

Tabela 18: Dados morfométricos de cinco variações morfológicas (M1, M2, M3, M4 e M5) de gametócitos intraeritrocíticos de *Hepatozoon* spp. em serpentes de vida livre e cativeiro.

Pág.59

Tabela 19: Positividade na PCR com utilização dos pares de *primers* HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900 para os três grupos de répteis analisados nesse estudo, nos anos 2015 e 2016.

Pág.61

Sumário

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
1. Répteis	8
2. Fatores Econômicos e Ecológicos	10
3. Parasitos em répteis	12
4. Parasitos do Filo Apicomplexa	13
5. Família Haemogregarinidae	14
6. Família Hepatozoidae	15
7. Patogenia e Sinais Clínicos de hemogregarinas em répteis	21
8. Critérios taxonômicos e de diagnóstico para hemogregarinas em répteis	21
Justificativa	24
Objetivos	26
1. Objetivo geral	27
2. Objetivos específicos	27
Metodologia	28
1. Comitê de Ética e Autorização	29
2. Área de Estudo	29
2.1 Estado de Minas Gerais	30
2.2 Estado de Goiás	31
2.3 Estado de Mato Grosso	32
3. População de estudo	33
3.1 Répteis de cativeiro	33
3.2 Répteis de vida livre	33
4. Contenção e identificação dos répteis	33
4.1 Testudines	34
4.2 Crocodilianos	34
4.3 Serpentes	34

5. Coleta de sangue e armazenamento das amostras	35
6. Extensão sanguínea, análise morfológica e morfométrica dos hemoparasitos.....	35
7. Análise Molecular.....	36
7.1 Extração DNA.....	36
7.2 Oligonucleotídeos e Condições de Amplificação.....	36
7.3 Eletroforese	40
7.4 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.....	40
7.5 Análise dos Dados e Alinhamento das Sequências.....	41
8. Análise Estatística	41
Resultados	43
1.Características gerais da população pesquisada	44
2. Positividade.....	46
3. Análise morfológica e morfométrica das hemogregarinas.....	48
4. Análise molecular.....	61
Discussão	65
1. Positividade.....	66
2. Análise morfológica e morfométrica das hemogregarinas.....	70
3. Análise molecular.....	74
Conclusão	80
Referências Bibliográficas	82
Anexo	103

Resumo

As hemogregarinas (Apicomplexa: Adeleina) são hemoparasitos observados em répteis, sendo os principais gêneros *Haemogregarina* e *Hepatozoon*. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares são essenciais, pois auxiliam na distinção entre gêneros e espécies desses protozoários. O presente estudo objetivou determinar a positividade e caracterizar morfologicamente, morfometricamente e molecularmente gênero/espécie de hemogregarinas em répteis de vida livre e cativeiro. Foram coletadas amostras dos répteis provenientes dos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. A amostra de sangue foi dividida em alíquotas para realizar extensões sanguíneas e executar a PCR. As análises morfológicas e morfométricas das formas evolutivas sanguíneas de hemogregarinas foram realizadas nas extensões. A PCR foi realizada com os *primers* HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900. De 222 amostras de répteis coletadas, 102 (45,94%) foram positivas para hemogregarinas, sendo 46,15% (36/78) testudines, 70,68% (41/58) crocodilianos e 29,06% (25/86) serpentes. Houve diferença significativa entre positividade e ambiente de vida (vida livre/cativeiro). Pela análise morfológica e morfométrica, em testudines, foram observadas formas evolutivas de trofozoítos, pré-merontes, micromerontes, macromerontes, duas morfologias de macrogametócitos e duas morfologias de microgametócitos de *Haemogregarina* sp. Em crocodilianos, foram observados gametócitos extraeritrocíticos e quatro estádios gametocíticos intraeritrocíticos (em dobramento, com cromatina nuclear dispersa, com vacúolos citoplasmáticos, maduros) os quais auxiliaram na identificação de *Hepatozoon caimani*. Em serpentes, cinco (M1, M2, M3, M4 e M5) diferentes morfologias e morfometrias de gametócitos intraeritrocíticos de *Hepatozoon* sp. foram observadas, sendo necessária a técnica molecular para identificação de espécies. Devido à escassez de dados moleculares sobre *Haemogregarina* sp. em testudines, não foi possível identificar espécie, as poucas sequências disponíveis no “GenBank” mostraram-se diferentes das do presente estudo. Com isso, as informações morfológicas, morfométricas e moleculares relatadas nesse trabalho infere possível descrição de uma nova espécie de *Haemogregarina*, entretanto mais estudos serão realizados para confirmar essa suspeita. Em crocodilianos, não há dados moleculares publicados de *caimani*, sendo o presente estudo o primeiro. Entretanto, em serpentes através da análise molecular foi possível identificar espécies de *Hepatozoon*, como *Hepatozoon musa* parasitando serpentes da espécie *Crotalus durissus* de vida livre e cativeiro e *Hepatozoon cevapii* parasitando serpentes da espécie *Boa constrictor* e *Bothrops* spp. A partir desse estudo, conclui-se a necessidade em empregar-se o conjunto diagnóstico morfológico, morfométrico e molecular para identificar gêneros e espécies de hemogregarinas em répteis

de vida livre e cativeiro, passo inicial para melhor compreensão dos efeitos fisiológicos, biológicos e comportamentais desses parasitos em répteis.

Palavra-chave: *Haemogregarina* sp.; *Hepatozoon* sp., epidemiologia, PCR.

Abstract

Hemogregarines (Apicomplexa: Adeleina) are hemoparasites commonly observed in reptiles, being the main genus *Haemogregarina* and *Hepatozoon*. Morphological, morphometric and molecular analyzes are essential to distinguish genus and species of these parasites, an initial step to better understand the physiological, biological and behavioral effects of these hemoparasites in reptiles. The present study aimed to determine the positivity and characterize morphometrically, morphometrically and molecularly genus/species of hemogregarinas in free - living and captive reptiles. Samples from reptiles from the states of Minas Gerais, Mato Grosso and Goiás were collected. Blood samples were divided in aliquots to perform blood extensions and as well as PCR. The morphological and morphometric analyzes of blood evolutionary forms were performed in the extensions. PCR was performed with the primers HEMO1/HEMO2 and HEPF300/HEP900. Of 222 samples of reptiles collected, hemogregarines were observed in 45.94% (102), being 46.15% (36/78) from testudines, 70.68% (41/58) from crocodilians and 29.06% (25/86) from snakes. There was a significant difference between positivity and living environment (free life / captivity). The morphological and morphometric analysis, in testudines, showed erythrocytic stages forms of trophozoites, premeronts, micromeronts, macromeronts, two morphologies of macrogametocytes and two morphologies of microgametocytes of *Haemogregarina* sp. In crocodilians, extraeritrocitic gametocytes and four intraeritrocitic gametocytic stages (in folding, with dispersed nuclear chromatin, cytoplasmic vacuoles and mature) were seen, which aided in the identification of *Hepatozoon caimani*. In snakes, five (M1, M2, M3, M4 and M5) different morphologies and morphometrics of intrateritocytic gametocytes of *Hepatozoon* sp. were being necessary the molecular technique for identification of species. Due to the scarcity of molecular data on *Haemogregarina* sp. in testudines, it was not possible to identify species, the few sequences available in GenBank were different from those of the present study. Thus, the morphological, morphometric and molecular information reported in this work infers a possible description of a new species of *Haemogregarina*, however further studies will be carried out to confirm this suspicion. In crocodilians, there aren't published molecular data of *Hepatozoon caimani*, being the present study the first one. However, in snakes through molecular analysis it was possible to identify species of *Hepatozoon*, such as *Hepatozoon musa* parasitizing *Crotalus durissus* of free living and captivity environment and *Hepatozoon cevapii* parasiting *Boa constrictor* and *Bothrops* spp. From this study, we conclude the need to use the morphological, morphometric and molecular diagnostics to identify genus and species of

hemogregarines in free-living and captivity reptiles, a initial step to know better the biological, physiological and behavioral effects of these parasites in these animals.

Keyword: *Haemogregarina* sp., *Hepatozoon* sp., Epidemiology, PCR.

Introdução

1. Répteis

Tradicionalmente denominam-se répteis o grupo de animais que possui em comum a ectotermia (capacidade de utilizar fontes externas de calor para regular a temperatura corporal) e a pele recoberta por escamas. Esse grupo inclui diversas linhagens (lagartos, serpentes, anfisbenídeos, testudines e crocodilianos), embora algumas não sejam próximas filogeneticamente, e habitam os mais diversos locais terrestres, exceto os pólos (PINCHEIRADANOSO et al., 2013).

De acordo com Pincheira-Danoso (2013), a Classe Reptilia possui 82 famílias, 1131 gêneros e 9546 espécies. Essa é subdividida em Ordem Squamata, a qual agrupa serpentes, lagartos e anfisbaenias; Ordem Crocodylia, jacarés, gaviais e crocodilos; Ordem Testudinata, cágados, tartarugas e jabutis e a Ordem Rincocéphalia, que possui uma única família, gênero e espécie, a tuatara.

Segundo levantamento coordenado pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2012), no território brasileiro há 641 espécies de répteis catalogadas, ocupando a terceira colocação em relação aos países com maior riqueza de espécies de répteis, somente atrás da Austrália e do México. O Brasil possui seis espécies de jacarés (26% da fauna mundial), 35 de testudines (11% da fauna mundial), 217 de lagartos (5% da fauna mundial), 326 de serpentes (11% da fauna mundial) e 57 (35% da fauna mundial) de anfisbaenias (cobras-de-duas cabeças).

Dentre os répteis, a Ordem Testudinata ou Chelonia, inclui animais terrestres, marinhos e de água doce e é reconhecida como a mais antiga de todas entre os répteis atuais, com características conservadas há mais de 200 milhões de anos (ERNST e BARBOUR, 1989; POUGH et al., 2003).

Diferente dos demais répteis, o corpo dos testudines está protegido por um casco, com configuração e tamanho que variam conforme os gêneros, espécies e subespécies, além de existirem diferenças entre os sexos (PRITCHARD e TREBBAU, 1984; POUGH et al., 2003).

Os hábitos alimentares variam entre as espécies herbívoras, carnívoras ou onívoras, e também de acordo com a faixa etária do animal (TERAN et al., 1995; MALVASIO et al., 2003). Na alimentação estão incluídos vegetais, pequenos invertebrados e vertebrados, como os peixes (PRITCHARD e TREBBAU, 1984; LGLER, 1993; POUGH et al., 2004; LUZ, 2005).

Existem duas Subordens entre os testudines Cryptodira e Pleurodira, 13 famílias e aproximadamente 300 espécies (POUGH et al., 2003), as quais correspondem a 12,5% da fauna mundial. Essas são constituídas, principalmente, por espécies de Chelidae e Podocnemidae que representam 37,3% e 62%, respectivamente, do total de espécies (SOUZA e MOLINA, 2007).

Em relação à Podocnemidae, são encontradas cinco espécies no Brasil: *Peltocephalus dumeriliana* (Schweigger, 1812), *Podonemis erythrocephala* (Spix, 1824), *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), *Podocnemis sextuberculata* (Cornalia, 1849) e *Podocnemis unifilis*, popularmente conhecida como tracajá (Troschell, 1848).

Na região da Bacia do Araguaia, Estado do Goiás, existem registros da ocorrência de quatro famílias e sete espécies de testudines: Kinosternidae (*Kinosternon scorpioides*), Testudinidae (*Geochelone carbonaria* e *Geochelone denticulata*), Chelidae (*Chelus fimbriatus* e *Phrynops geoffroanus*) e Podocnemidae (*Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*). *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* se destacam pela importância econômica, entretanto, não há muitos relatos na literatura de aspectos populacionais e biológicos destas espécies (MALVASIO, 2003 e 2005).

A Ordem Crocodylia possui 21 espécies e a maioria é encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Os crocodilianos são mais adaptados ao ambiente aquático do que terrestre, sendo considerados predadores generalistas e oportunistas, cuja dieta depende da diversidade de organismos presentes no ambiente (SANTOS et al., 1996; DA SILVEIRA e MAGNUSSUM, 1999). Podem se alimentar de animais vivos ou em decomposição, e até mesmo da mesma espécie, especialmente, quando as presas são filhotes e animais debilitados (MARCON et al., 2008; BORTEIRO et al., 2008).

No Brasil, ocorrem seis espécies, todas pertencentes à família Alligatoridae, popularmente chamadas de jacarés: *Paleosuchus trigonatus*, *Paleosuchus palpebrosus*, *Melanosuchus niger*, *Caiman crocodilus*, *Caiman latirostris* e *Caiman yacare*, popularmente conhecido como jacaré-tinga (KING e BURKE, 1989; DA SILVEIRA, 2002).

Caiman crocodilus pode ser encontrado praticamente em todos os ambientes de zonas úmidas e baixa altitude na Região Neotropical, sendo a espécie dentre os crocodilianos mais abundante e com maior distribuição na América Latina. A distribuição geográfica abrange do México até a Bacia Amazônica e a Bacia Tocantins-Araguaia, sendo sua extensão de ocorrência no território brasileiro de 5.006.412,4 km² (GOOMBRIDGE, 1987).

As serpentes ou ofídeos são animais popularmente conhecidos no Brasil como cobras. Cientificamente, estes se agrupam na subordem Serpentes, que juntamente a Sauria (lagartos e

lagartixas) e Amphisbaenia ('cobras de duas cabeças') formam a ordem Squamata. São encontradas em quase todo o mundo, mas habitam, principalmente, as regiões temperadas e tropicais (MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2003).

No mundo são conhecidas, atualmente, cerca de 2.900 espécies de serpentes, distribuídas entre 465 gêneros e 20 famílias. Na fauna brasileira, há representantes de 366 espécies, 75 gêneros e 10 famílias; sendo estas: Anomalepididae, Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Aniliidae, Tropidophiidae, Boidae, Colubridae, Dipsadidae, Elapidae e Viperidae (NICKERSON e HENDERSON, 1976; ARAÚJO e SANTOS, 1997; BERNARDE e ABE, 1997; MARQUES et al., 2001; FEIO e CARAMASCHI, 2002; ARAÚJO et al., 2003).

As maiores serpentes da América Neotropical são da família Boidae e são consideradas não peçonhentas, matando as presas por constrição (PUORTO e FRANÇA, 2009). Vivem em vários "habitats", podendo ser aquáticas, semi-arborícolas e arborícolas (PIZZATO, 2006). No Brasil, as serpentes da família Boidae são representadas por quatro gêneros: *Eunectes*, *Boa*, *Corallus* e *Epicrates* (NOONAN e CHIPPINDALE, 2006).

As serpentes peçonhentas possuem glândulas secretoras de peçonha recobertas por músculos compressores, conectadas por ductos às presas inoculadoras (BERNARDE, 2011). No país, tradicionalmente, considera-se como serpentes peçonhentas somente as espécies incluídas nas famílias Elapidae (corais verdadeiras) e Viperidae (cascavéis e jararacas). Algumas espécies incluídas nas famílias Colubridae, Aniliidae e Dipsadidae possuem peçonha, embora os acidentes com estas espécies sejam raros (ARAÚJO et al., 2003).

Dentre as Famílias que causam acidentes ofídicos no Brasil, a Família Viperidae possui o maior número de casos. Essas serpentes são conhecidas popularmente como jararacas (*Bothrops* sp.) e cascavéis (*Crotalus* sp.). Apresentam cerca de 170 espécies distribuídas pelo mundo e no Brasil essa família é constituída por 5 gêneros, 23 espécies e 39 subespécies (HOGUE e ROMANO, 1971; MELGAREJO-GIMÉNEZ, 2003).

2. Fatores Econômicos e Ecológicos.

A demanda de répteis como "pets" exóticos tem aumentado a cada dia. Esse comércio, muitas vezes ilegal, ocasiona problemas em relação à saúde do animal e possível transmissão de doenças. Além disso, o aumento de tráfico ilegal pode ocasionar possível extinção de espécies (KARESHI et al., 2005).

Outros fatores a serem considerados são o comércio alimentício da carne de testudines e crocodilianos, e o desenvolvimento de medicamentos e soros amplamente comercializados no Brasil e no mundo através de estudos sobre a peçonha de serpentes (PRITCHARD e TREBBAU, 1984).

Muitas espécies de testudines em diversas partes do mundo apresentam importância alimentícia e econômica, tendo os ovos, carne, vísceras, gordura e casco utilizados intensamente pelo homem (VAN DIJK et al., 2014). No Brasil, a exploração das espécies de testudines tem sido documentada por naturalistas, diversos pesquisadores e escritores desde a época colonial (VOGT, 2008).

As espécies Podocnemididae são mais consumidas devido ao tamanho, abundância e captura fácil, principalmente, nos locais de reprodução e alimentação (SMITH, 1979). Atualmente, a tracajá (*Podocnemis unifilis*) é considerada ameaçada de extinção no território brasileiro (ICMBIO, 2014). Devido a isso, criou-se portarias específicas (IBAMA) que normatizam a criação dessa espécie em cativeiro (Portaria nº 142, de 30 de dezembro de 1992) e a comercialização dos produtos e subprodutos (Portaria nº 70, de 23 de agosto de 1996).

Em relação aos crocodilianos, o risco de extinção de *C. crocodilus* foi avaliado de acordo com os critérios da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN 1998, 2001), com base nos dados disponíveis até 2011, e foi categorizada como Menos Preocupante (LC).

A criação de *C. crocodilus* em cativeiro possui potencial econômico (VILLELA, 2008) devido ao melhor aproveitamento da pele e diminuição da pressão sobre estoques nativos, com poucas informações referentes ao sistema de criação, nutrição, instalações e processamento de pele (MACIEL et al., 2003). No Brasil, existe somente uma fazenda de criação de jacarés-tinga, a qual se localiza no Estado do Amazonas. No entanto, a fazenda não produz jacarés há anos, o que é preocupante levando-se em consideração a crescente atividade de caça ilegal de jacarés desde a década de 90 (DA SILVEIRA, 2002).

Tendo em vista a legalização de criadouros de répteis brasileiros, estudos sobre manejo sanitário dos locais de criação destes animais são importantes para conservação e manejo de espécies. A prevenção de doenças é o procedimento mais lógico, econômico e duradouro, quando se considera a saúde animal. No cativeiro, porém, as condições ambientais favorecem os surtos, devido à concentração de organismos patogênicos, maior contato entre diferentes espécies e, os erros nutricionais e de manejo, aliados ao estresse. Essas condições acabam por enfraquecer a resistência orgânica e imunológica dos animais cativos (FRANCISCO, 1997).

A diversidade de parasitos que acometem répteis é grande os estudos desses patógenos têm ganhado destaque em diferentes áreas do conhecimento. Esses parasitos são amplamente utilizados como modelos ecológicos, com crescente constatação de que o parasitismo exerce papel fundamental na estrutura, dinâmica temporal e espacial de populações naturais com ação direta nos processos de competição e estabilidade de ecossistemas (HOLMES e PRICE, 1986).

Questões relacionadas à transmissão zoonótica têm ganhado destaque, principalmente por esses animais estarem cada vez mais em contato com o homem e com diversos animais domésticos. Isso tem ocorrido não somente pela criação desses animais como “pets” exóticos, mas também pela ação destruidora de “habitat” selvagens pelo homem, fazendo com que esses animais procurem ambientes urbanos. Esse contato estreito faz com que haja necessidade de se entender a diversidade parasitária nos animais silvestres, a distribuição espacial e evolução temporal em diferentes ecossistemas, e interação com diferentes hospedeiros (HARRUS e BENETH, 2005; KARESH et al., 2005).

3. Parasitos em répteis

A grande maioria dos répteis em todo o mundo são acometidos por algum agente patogênico, podendo ser endoparasitos, como protozoários, helmintos, bactérias ou vírus, à ectoparasitos, como sanguessugas, ácaros, dentre outros (NASIRI et al., 2014). Úrsula et al. (2014), na Alemanha, analisaram 410 répteis, incluindo serpentes, testudines e lagartos trazidos por 11 países para duas lojas de *petshop* e relatou positividade de parasitos sanguíneos em 117 (29%) animais. Os protozoários observados eram das famílias Haemogregarinidae, Hepatozoidae, Lankesterellidae, Plasmodiidae, Haemohorminiidae e Trypanosomatidae.

Outro estudo desenvolvido por Nasiri et al. (2014), abordou a diversidade de parasitos gastrointestinais e hemoparasitos em serpentes no Irã. Os autores observaram 64 (13,56%) serpentes infectadas com endoparasitos de 12 gêneros diferentes, sendo 41 (47,12%) serpentes positivas para parasitos gastrointestinais e 23 (26,43%) serpentes positivas para hemoparasitos.

Dentre os hemoparasitos, as hemogregarinas, os plasmodídeos e os trypanosomatídeos são os mais observados em répteis. Entretanto, há presença de outros grupos de hemoparasitos, como hemococcídios em lagartos, piroplasmorida, parasitos procariotos (infecção clamidial e por rickettsias) e microfilária (TELFORD, 2009; ÚRSULA et al., 2014).

4. Parasitos do Filo Apicomplexa

O Filo Apicomplexa (Levine, 1970) agrupa protozoários que apresentam estruturas conhecidas como “Complexo Apical” (LEVINE et al., 1980), composto por elementos do citoesqueleto e pelas organelas secretórias especializadas chamadas roprias, micronemas e grânulos densos (SIDDALL, 1995; ADL et al., 2005).

A caracterização desse Filo segue a revisão de Levine et al. (1980), o qual é subdividido em quatro grupos (gregarinas, coccídios, hemosporídios e piroplasmas). Os agrupamentos são baseados, principalmente, por características biológicas e do ciclo de vida, como os hospedeiros, os vetores e quais tecidos do hospedeiro parasitam (MORRISSON, 2008).

Os parasitos pertencentes a esse Filo possuem ciclo de vida complexos, podendo apresentar duas fases assexuadas, chamadas de merogonia e esporogonia, e uma sexuada, conhecida como gametogonia. São os únicos entre os eucariotos a apresentar ontogenia de reprodução cíclica (SIDDALL, 1995).

A Classe Sporozoea (Leukart, 1877) possui aproximadamente 6.000 espécies descritas e distribuídas em três Subclasses: Gregarina (Dufuor, 1828), Piroplasmia (Levine, 1961) e Coccidia (Leukart, 1879). A Subclasse Coccidia encontra-se dividida em três Ordens: Agamococcidiia Levine 1979, cujos parasitos apresentam somente esporogonia; Protococcidiida (Kheisin, 1956), o qual não possui no ciclo a merogonia; e Eucoccidiida (Léger e Duboscq, 1910), caracterizada por apresentar merogonia, esporogonia e gametogonia.

A Ordem Eucoccidiida agrupa-se em três Subordens, Eimeriina (Léger, 1991), Haemosporina (Danilewsky, 1885) e Adeleina (Léger, 1911). Dessas subordens a Adeleina é a que alberga hemoparasitos presentes em répteis.

Adeleina se caracteriza pela presença de sigízia, microgamontes produzindo 1-4 microgametas, esporozoítos envoltos por esporocisto dentro dos oocistos e as espécies podem ser monoxênicas ou heteroxênicas. É considerada Subordem heterogênea e polifilética (BARTA, 1989; SIDDALL e DESSER, 1991; SIDDALL, 1995), constituída por três Famílias (BARTA, 1989): Haemogregarinidae Neveu-Lemaire 1901, com os gêneros *Haemogregarina*, *Desseria* e *Cyrilia*; Karyolysidae Wenyon 1926, com os gêneros *Karyolysis* e *Hemolivia*; e Hepatozoidae Wenyon 1926 com o gênero *Hepatozoon* (Figura 1).

O termo hemogregarina é, geralmente, utilizado para parasitos vermiformes e largos encontrados dentro de leucócitos e eritrócitos (LEVINE et al., 1980; DAVIES, 2000). Historicamente, parasitos sanguíneos de anfíbios, répteis, aves e mamíferos foram incluídos no gênero *Haemogregarina*, devido à similaridade morfológica dos gametócitos entre os diferentes gêneros da Subordem Adeleina (DESSER et al., 1995; SMITH, 1996).

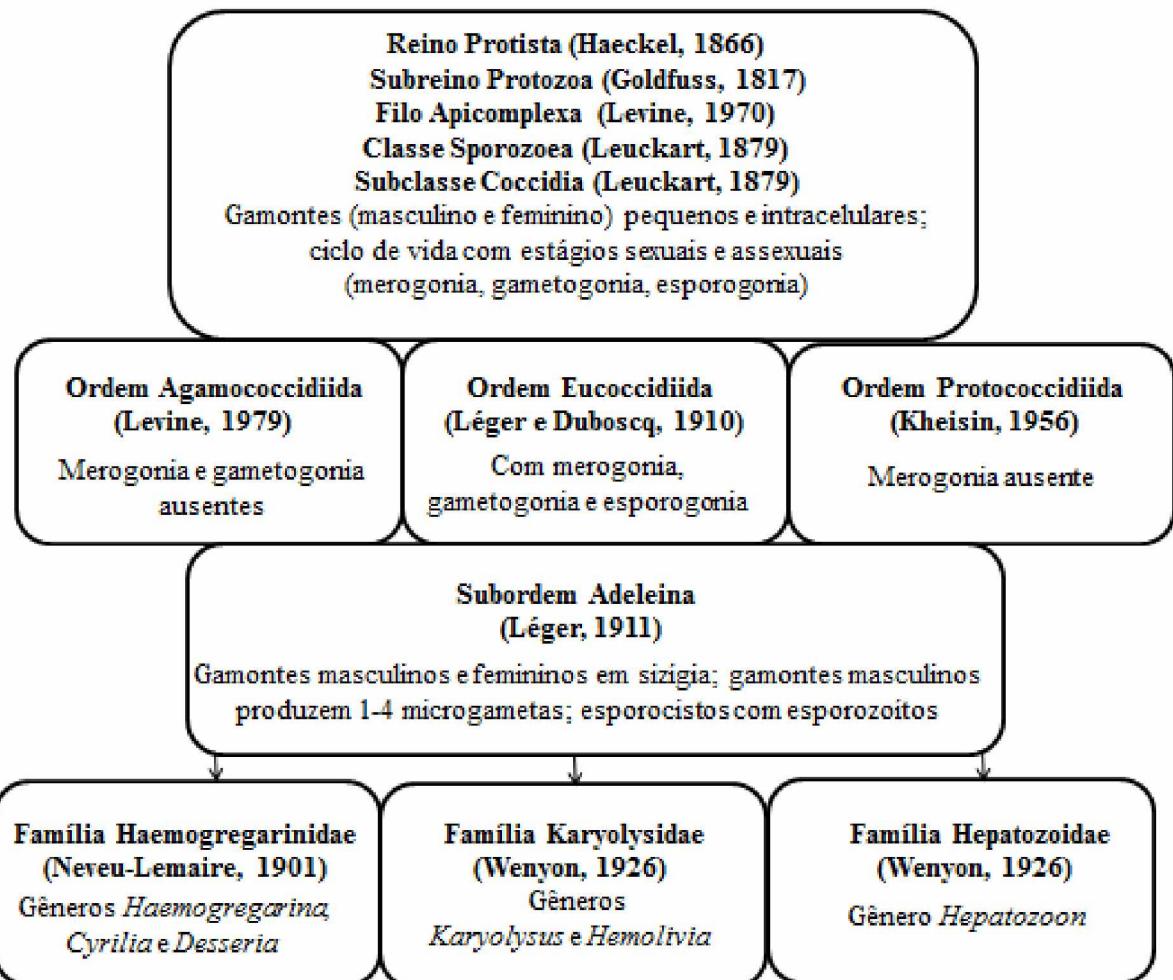


Figura 1: Esquema taxonômico do Filo Apicomplexa.

5. Família Haemogregarinidae.

Os gêneros *Haemogregarina*, *Cyrilia* e *Desseria* estão incluídos nessa família e possuem características exclusivas, como merogonia em células sanguíneas ou tecidos, oocistos relativamente pequenos (35 μ m de diâmetro), ausência de esporocistos e baixa quantidade relativa de esporozoítos produzidos (8-100) (DESSER, 1993; SIDDALL, 1995).

Cerca de 400 espécies foram descritas nessa Família e Levine (1988) revisando o grupo, considerou 300 espécies pertencentes ao gênero *Haemogregarina*, entretanto Sidall (1995) designou somente 19 com *Haemogregarina sensu stricto*. Este grupo possui ciclo de vida

heteroxênico com peixes e répteis considerados os hospedeiros vertebrados e, os isópodes gnatídeos e as sanguessugas (Famílias Glossiphonidae, Ozobranchidae e Psicolidae) como vetores (DESSER, 1993; SIDDALL, 1995; SIDDALL e DESSER, 2001; DAVIES et al., 2004).

A prevalência de parasitos do gênero *Haemogregarina* no mundo abrange as diferentes espécies de testudines. Estudos desenvolvidos com populações de diferentes regiões geográficas, como Estados Unidos (MCAULLIFE, 1977), Canadá (MCALLISTER e KING, 1980; SIDDALL e DESSER, 1992), Romênia (MIHALCA et al., 2002; MIHALCA et al., 2008), Austrália (PIERCE e ADLARD, 2002) e Costa Rica (ROSSOW et al., 2013) obtiveram 100% de positividade em testudines, como *Chelydra serpentina*, *Chrysemys scripta elegans*, *Emys orbicularis*, *Kinosternon scorpioides*, *K. leucostomum* e *Rhinoclemmys funerea*.

No Brasil, 36 espécies de testudines aquáticos foram catalogados (BÉRNILS e COSTA, 2012), entretanto, existem poucos relatos de hemoparasitos acometendo esses animais. Dos publicados, foi observado positividade de 28% (CAMPOS-BRITES e RATIN, 2003) e 98% (SOARES et al., 2014) em testudines aquáticos.

Nesses animais, a espécie de parasito relatado com ciclo de vida mais completo é *Haemogregarina balli*, a qual foi observada em *Chelydra serpentina* e na sanguessuga *Placobdella ornata* (SIDDALL e DESSER, 1991). A transmissão ocorre durante a hematofagia realizada pelos vetores, com inoculação de merozoítos. No hospedeiro vertebrado se alojam nos órgãos como pulmões, baço e fígado, formando merontes pré-eritrocíticos contendo merozoítos. Esses caem na corrente sanguínea, invadem eritrócito e se transformam em pré-merontes que se tornam merontes primários eritrocíticos, originando novos merozoítos. Estes rompem o eritrócito e podem invadir outros se diferenciando em gametócitos (macrogametócitos e microgametócitos) ou dar continuidade ao ciclo merogônico (SIDDALL e DESSER, 1991; SIDDALL e DESSER, 1992; DAVIES e JOHNSTON, 2000).

6. Família Hepatozoidae.

Siddall (1995) estudando espécies descritas em *Haemogregarina*, observou que algumas dessas espécies podiam pertencer a outros gêneros, fazendo nova revisão da Subordem Adeleina. O autor sugeriu a transferência dos parasitos de lagartos, serpentes e aves para o gênero *Hepatozoon*. Essa transferência foi baseada em estudos onde observou uma elevada quantidade de esporocistos formados nos oocistos da fase esporogônica. A partir

disso, os critérios morfológicos mais aceitos para diferenciação entre os gêneros *Haemogregarina* e *Hepatozoon* são: merogonia eritrocítica, exclusiva em *Haemogregarina* spp. e o desenvolvimento esporogônico nos vetores invertebrados. No gênero *Haemogregarina* os oocistos são menores e há produção de cerca de oito esporozoítos no interior, enquanto no *Hepatozoon*, os oocistos são maiores em tamanho e número de esporozoítos.

No ano seguinte, Smith (1996) realizou revisão do gênero *Hepatozoon* seguindo orientação de Siddall (1995), e transferiu as espécies de *Haemogregarina* de lagartos, serpentes e aves para *Hepatozoon*. O autor fez essa transferência mesmo ainda sendo desconhecida a esporogonia de muitas espécies de *Hepatozoon* nesses hospedeiros.

A Família Hepatozoidae é constituída por um único gênero, *Hepatozoon*, o qual apresenta características exclusivas como, merogonia restrita a tecidos, oocistos relativamente grandes (100µm de diâmetro), presença de esporocistos e de centenas de esporozoítos (SMITH, 1996).

O ciclo de vida das espécies de *Hepatozoon* é complexo, com mecanismos de transmissão variados e podendo o mesmo parasito infectar diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados. Landau et al. (1972) realizaram experimentos de transmissão cruzada de *Hepatozoon domerguei* entre diferentes espécies de serpentes e lagarto *Ophurus sabae*, com duas espécies de vetores, os mosquitos *Culex fatigans* e *Anopheles stephensi*. Em todos os experimentos foram observados gametócitos, merontes e cistos do parasito nos hospedeiros. Lembrando que as serpentes e a espécie de lagarto, utilizados nesses experimentos, ingeriram os vetores. Em seguida, o lagarto parasitado no experimento serviu de fonte alimentar para uma serpente livre de parasitos e a mesma, posteriormente, apresentou gametócitos na circulação sanguínea. Landau et al. (1972) conseguiram, portanto, comprovar transmissão através de predação de vertebrados com cistos com cistozoítos nas vísceras.

Os hospedeiros invertebrados (vetores) são, principalmente, os mosquitos (Culicidae) dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*. Esses podem transmitir a parasitose para as serpentes por hospedeiros paratênicos, que se alimentam naturalmente desses gêneros de mosquitos, infectando as serpentes que os ingerirem, ou através da ingestão direta desses mosquitos pelas serpentes (Ball et al., 1967). Os invertebrados artrópodes não fazem parte da alimentação normal de serpentes, entretanto, Ball et al. (1967) demonstraram ser possível essa transmissão pela ingestão accidental de vetores.

Flebotomíneos *Phlebotomus vexator*, também, podem atuar como hospedeiros invertebrados, havendo relato de oocisto na hemocele nesse vetor (AYALA, 1970). Outros

grupos de artrópodes são transmissores dessa parasitose, como os barbeiros e ácaros (metastigmatas e mesostigmatas), que podem manter a fase esporogônica (WOZNIAK e TELFORD, 1991).

Telford (1984) analisando registros de estudos anteriores, concluiu que as espécies de *Hepatozoon* que acometem répteis, apresentam baixa especificidade de hospedeiros, tanto para os hospedeiros vertebrados, quanto para os invertebrados. Um aspecto que deve ser levado em consideração é a alimentação desses indivíduos no ambiente natural. Serpentes que se alimentam de anfíbios, lagartos e outras serpentes, estão mais suscetíveis a adquirirem a parasitose (Telford, 1984).

A rota de transmissão congênita foi descrita por Lowick e Yaeger (1987). Esses pesquisadores relataram serpente *Nerodia fasciata confluens* com elevada parasitemia e seus filhotes estavam todos infectados pelo protozoário.

Em relação ao ciclo de vida, Ball et al. (1967), Ball et al. (1969), Bashtar et al. (1991) e Smith et al. (1994) mostraram que a fase esporogônica do parasito inicia-se com a ingestão de microgamontes e macrogamontes de *Hepatozoon* sp. durante repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado. Em seguida, os gamontes migram para a parede intestinal onde ocorre a gametogênese. Um microgamonte dá origem a quatro microgametas uniflagelados que, por singamia, fecundam os macrogametas, originados de macrogamontes, formando um zigoto. O zigoto cresce rapidamente e atravessa a parede intestinal, localizando-se na hemocele do vetor hematófago. Nesse local, forma um oocisto com múltiplos esporocistos com esporozoítos (estágio evolutivo infectante para o hospedeiro vertebrado). Quando o artrópode é ingerido, os esporozoítos são liberados e inicia-se a fase do ciclo no hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos podem seguir para os hepatócitos, formando um cistozoíto, ou iniciar o primeiro ciclo merogônico que ocorre na parede intestinal da serpente. Dois tipos de merontes são formados: um contendo macromerozoítos que, transportados via sangue ou linfa, invadem novos tecidos e outro, contendo micromerozoítos, que irão penetrar nos eritrócitos, sofrer gamontogonia e dar origem aos gamontes circulantes, infectivos para os vetores hematófagos (SMITH, 1996).

As serpentes são acometidas por mais de 120 espécies de *Hepatozoon*, com relatos na literatura de 200 espécies de serpentes, nas regiões temperadas a tropicais, acometidas por essa parasitose (LEVINE, 1988; SMITH et al., 1996).

As espécies de *Hepatozoon* descritas em serpentes brasileiras na literatura são: *H. juxtanuclearis*, *H. fusifex* e *H. terzii*, parasitando *Boa constrictor* (CARINI, 1947; BALL et al., 1969); *H. raulei*, *plimmeri* e *H. jararacuçu* em *Bothrops* (PHISALIX e LAVERAN, 1913;

PESSOA et al., 1971; DE BIASI et al., 1989); *H. luhei* em *Corallus* sp. (SAMBON, 1907; PESSOA et al., 1970); *H. romani*, *H. capsulata*, *H. cevapii*, *H. massardi* e *H. cuestensis* parasitando *Crotalus durissus terrificus* (PHISALIX, 1931; O'DWYER et al., 2013); *H. philodryasi* em *Philodryas patogenensis* (CARINI, 1910); *H. mingonei* e *H. cyclagrasi* em *Hydrodynastes gigas* (ARANTES, 1934; PESSOA et al., 1970), dentre outras espécies.

Existem poucos estudos sobre prevalência de *Hepatozoon* em serpentes. Hull e Camin (1960) analisaram 600 serpentes cativas no Zoológico dos Estados Unidos e observaram 30,8% de animais infectados por esse parasito. No Brasil, Pessoa et al. (1974), relataram 17,1% de serpentes positivas dentre 2128 analisadas, e O'Dwyer et al. (2003) relataram positividade de 16,38% em serpentes recém-capturadas.

Os crocodilianos apresentam poucas espécies de *Hepatozoon* descritas, com os primeiros relatos reportados por Simond (1901) na Índia, o qual descreveu *Haemogregarina hankini* em *Gavialis gangeticus* e *Crocodylus porosus*. Na Alemanha, Börner (1901) descreveu *Haemogregarina* sp. em *Crocodylus cutus* e *Alligator mississippiensis*. Thiroux (1910) descreveu nova espécie, *Haemogregarina petitii* em *Crocodylus niloticus*, que posteriormente foi relatada por outros autores como Cahton e Roubaud (1913) e Hoare (1932). Entretanto, essas espécies foram descritas baseadas somente nos gametócitos sanguíneos.

Posteriormente, em Uganda, o pesquisador Hoare (1932) estudando uma série de hematozoários em animais silvestres, em laboratório, observou moscas tsé-tsé (*Glossina palpalis*) realizando repasto sanguíneo em crocodilianos naturalmente infectados. Foram encontrados oocistos com centenas de esporocistos na cavidade destes dípteros, revelando o desenvolvimento esporogônico do parasito. Dessa forma, houve alteração do nome *Haemogregarina petitii* para *Hepatozoon petitii*.

No mundo estão descritas cinco espécies de *Hepatozoon* em crocodilianos. Dessas, duas são brasileiras, *Hepatozoon serrei* e *Hepatozoon caimani* (Tabela 1).

Tabela 1: Locais de ocorrência de *Hepatozoon* spp. e seus respectivos hospedeiros crocodilianos.

Espécies	Hospedeiros	Local	Referência
<i>Hepatozoon hankini</i>	<i>Gavialis gangeticus</i>	Ásia e Índia	Simond 1901
<i>Hepatozoon caimani</i>	<i>Caiman latirostris</i>	América do Sul	Carini 1909
	<i>Caiman yacare</i>		
	<i>Caiman crocodilus</i>		
<i>Hepatozoon serrei</i>	<i>Paleosuchus trigonatus</i>	América do Sul	Phisalix 1914
<i>Hepatozoon petiti</i>	<i>Crocodilus niloticus</i>	África	Hoare 1932
<i>Hepatozoon sheppardi</i>	<i>Crocodilus niloticus</i>	África	Santos Dias 1952

No Brasil, existem registros de duas espécies de hepatozoídeos em crocodilianos: *H. serrei*, em jacaré *P. trigonatus*; e *H. caimani*, em jacarés *C. crocodilus*, *C. yacare* e *C. latirostris*. Entretanto, acredita-se que o único critério de identificação e descrição dessas duas espécies de parasitos tenha sido o encontro em diferentes crocodilianos, sugerindo que ambos parasitos possuem mesma identidade (VIANA, 2010).

Há descrições de gametócitos intraeritrocitários em outra espécie de jacaré, *Melanosuchus niger*. Entretanto, não há dados sobre esporogonia destes parasitos no hospedeiro, não sendo possível caracterizar a espécie encontrada. Das seis espécies brasileiras de crocodilianos, somente não há registros de infecção, por espécies de *Hepatozoon* em *Paleosuchus palpebrosus* (VIANA, 2010).

Hepatozoon caimani foi descrito no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, por Carini (1909) como *Haemogregarina caimani*, pela observação de gametócitos nos eritrócitos de três indivíduos *Caiman latirostris* (do jacaré-de-papo-amarelo). Posteriormente, o pesquisador Migone (1916), também, observou gametócitos intraeritrocíticos em jacarés *Caiman crocodilus* na região do Paraguai, porém não o denominou (Migone, 1916).

Pessoa et al. (1972) desenvolveram os primeiros estudos sobre esporogonia de *Haemogregarina caimani*, assim denominada na época. Foram estudados a sanguessuga *Haementeria hutzi*, o triatomíneo *Triatoma infestans* e os mosquitos *Culex dolosus*. Foi observado desenvolvimento esporogônico somente em *C. dolosus*, com numerosos oocistos aderidos no estômago e na cavidade geral, e quando maduros, contendo 100 a 120 esporocistos dentro de cada oocisto, com esporozoítos medindo 160 a 200 µm. Com isso, foi possível a mudança do nome da espécie de parasito, de *Haemogregarina caimani* para *Hepatozoon caimani*.

Além desses relatos, Lainson (1977) observou esse protozoário nos jacarés *C. crocodilus* na região de Bragança, Pará. O pesquisador verificou o desenvolvimento

esporogônico, com formação de grande quantidade de esporocistos por oocisto, em mosquitos *Culex fatigans*, assim como observado por Pessoa et al. (1972).

Anos depois, os pesquisadores Lainson et al. conseguiram descrever pela primeira vez, no Estado do Pará, o ciclo de vida de *Hepatozoon caimani* em *C. crocodilus*. O mosquito *Culex fatigans* (vetor) fez repasto sanguíneo em *C. crocodilus* parasitado com *H. caimani*, em seguida, foi possível observar esporogonia com oocistos esporulados aderidos ao intestino do vetor. Com isso, esses mosquitos infectados foram fornecidos como alimento para anuros *Leptodactylus fuscus* e *Rana catesbeiana*, e apresentaram cistos contendo cistozoítos desenvolvidos nos órgãos, principalmente o fígado. Em seguida, esses anuros com o parasito serviram de alimento para crocodilianos limpos, os quais apresentaram gametócitos sanguíneos dias após infecção em órgãos como, fígado, baço, rins e pulmão. Já a merogonia foi observada somente no intestino delgado (Lainson et al., 2003).

Após descrições de anuros como transmissores de *H. caimani* em jacarés, Pereira et al. (2014) realizaram experimento com peixes como hospedeiros paratênicos, e usaram quatro espécies de mosquitos, *Aedes vexans*, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*; todos executaram repasto sanguíneo em dois *C. yacare* naturalmente infectados, entretanto, somente *C. quinquefasciatus* apresentaram oocistos. Em seguida, os peixes das espécies *Metynnis* sp. e *Astyanax* sp. foram individualmente alimentados com esses *C. quinquefasciatus* infectados. Nenhum parasito foi encontrado em *Astyanax* sp., mas todos *Metynnis* sp. apresentaram numerosos cistos, contendo cistozoítos. Os cistos estavam localizados próximos a vasos hepáticos. Além disso, gametócitos intraeritrocíticos foram observados em jacarés jovens que ingeriram os peixes infectados (PEREIRA et al., 2014).

Através de todas essas descobertas, Lainson et al. (2003), Viana et al. (2012) e Pereira et al. (2014) consideram anuros e peixes na dieta de jacarés em ambiente silvestre como vias naturais de transmissão de *H. caimani*. Todavia, a especificidade de hospedeiros desse parasito ainda é muito questionada (TELFORD et al., 2001).

Existem na literatura poucos relatos sobre prevalência de *H. caimani* em populações de jacarés brasileiros. Na região amazônica, Lainson (1977) observou 76,7% *Caiman crocodilus* parasitados; Marques e Viana (2005) relataram 71,4% de *C. yacare* positivos para esse parasito no Pantanal Mato-Grossense; nesse mesmo local, posteriormente, Viana et al. (2010) relataram 76% de *C. yacare* positivos para *H. caimani*.

7. Patogenia e Sinais Clínicos da infecção por hemogregarinas em répteis.

Não se sabe ao certo os efeitos fisiológicos e a severidade de infecções por hemogregarinas em testudines, crocodilianos e serpentes. No entanto, estes parasitos, inevitavelmente, competem por energia e nutrientes com o hospedeiro. Como consequência, o vertebrado investe energia na batalha imunológica contra esses protozoários e não em esforço reprodutivo (MOLLER, 1997).

Infecções parasitárias podem levar a alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais. Madsen et al. (2005) observaram que *Hepatozoon* sp. pode provocar redução no crescimento de serpentes, além de reduzir o rendimento reprodutivo das fêmeas infectadas. Os achados demonstram que o impacto dessa parasitose em serpentes pode não ser observado por meio de doença aparente, mas pode ser importante na ecologia das espécies (Madsen et al., 2005)

Caudell et al. (2002) observaram que hemoparasitos intraeritrocíticos, como *Haemogregarina* spp. e *Hepatozoon* spp. podem afetar os répteis, reduzindo a sua capacidade de transporte de oxigênio.

Em ambiente natural, os répteis parasitados normalmente são assintomáticos, mas em parasitemias altas podem levar o indivíduo à óbito (O'Dwyer et al., 2004).

Os danos ocasionados por esses hemoparasitos, normalmente, agravam-se em ambiente cativo, onde o animal sob estresse se torna imunossuprimido podendo apresentar quadros clínicos severos e possíveis infecções secundárias (MADSEN et al., 2005). Na literatura, há relatos de anemia hemolítica, apatia, perda de peso e modificação no padrão reprodutivo e de acasalamento (MOLLER, 1997; THRALL et al., 2007). Além disso, Wosniak et al. (1994) observaram merontes no cérebro de um exemplar de *C. durissus*, que apresentou problemas neurológicos em cativeiro.

Nos sistemas de cativeiro, devido à presença de vários indivíduos agrupados em um mesmo local, relatos de surtos patogênicos são comuns, pois este ambiente porciona condições ideais para proliferação de artrópodes vetores em potencial. Outro fator importante a se considerar é a existência de transmissão vertical em *Hepatozoon* spp. (DE BIASI et al., 1971; DE BIASI et al., 1972).

8. Critérios taxonômicos e de diagnóstico para hemogregarinas em répteis.

Durante um período relativamente longo, a descrição de novas espécies era baseada somente em critérios morfológicos dos gametócitos presentes nas células sanguíneas e/ou pelo

encontro de parasitos em nova espécie de hospedeiro e/ou em uma nova localidade (SIDDALL, 1995). Entretanto, experimentos realizados entre diferentes espécies de hospedeiros, com a mesma espécie de parasito, mostrou que a especificidade de hospedeiro pode ser baixa dependendo da espécie. Essa questão desencoraja a antiga prática de classificação de novas espécies e mostraram a necessidade de observação de outras fases do ciclo do parasito (BALL et al., 1967; LANDAU et al., 1972).

Desser (1993), estudando hemogregarinas, concluiu que *Haemogregarina* spp. não pode ser distinguido do *Hepatozoon* somente pela aparência dos gamontes intraeritrocíticos e merontes tissulares. Para a identificação, também é necessário análise do desenvolvimento esporogônico no vetor.

A distinção de espécies quando baseada em características somente morfológicas de oocistos e gamontes torna-se falha devido à semelhança das formas evolutivas (PESSOA e DE BIASI, 1973; O'DWYER et al., 2002).

Os primeiros trabalhos descritivos na literatura sobre espécies de hemogregarinas em répteis traziam somente informações sobre morfologia dos gamontes (formato, coloração, presença de cápsula). Posteriormente, os aspectos morfométricos começaram a ser abordados. Inicialmente, o comprimento e a largura eram avaliados, sendo introduzidos outras variáveis como medida de área e núcleo (WOZNIAK et al., 1994).

Os primeiros estudos moleculares para hemogregarinas foram realizados por Wozniak et al. (1994). Os autores conseguiram amplificar o rDNA de cinco diferentes isolados de *Hepatozoon*, utilizando oligonucleotídeos (18AP853 e 18AP1488) desenvolvidos a partir da sequência específica para o locus de DNA ribossomal de hemoparasitos do Filo Apicomplexa. Na *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi observado padrões específicos de bandas para cada isolado, demonstrando que estas espécies podem ser molecularmente diferenciadas pela sequência do locus de rDNA.

Entretanto, Perkins e Martin (1999) analisaram os pares de *primers* desenvolvidos por Wozniak et al. (1994) e observaram não ser específicos, amplificando também genes dos hospedeiros vertebrados, quando o DNA é extraído do sangue. Com isso, Perkins e Keller (2001) desenvolveram novos *primers* (HEMO1 e HEMO2). A sequência de oligonucleotídeos HEMO1 amplifica região conservada do grupo das hemogregarinas e HEMO2 região conservada de apicomplexos, sendo considerados genéricos.

Ujvari et al. (2004), desenharam outros oligonucleotídeos (HEPF300 e HEP900) específicos para *Hepatozoon* spp. Os autores utilizaram esses *primers* para diagnosticar

infecção em serpentes *L. fuscus*. Contudo, não foi possível nomear a espécie, pois os autores não possuíam outros dados biológicos do hemoparasito.

Os *primers* descritos por Perkins e Keller (2001) e os descritos por Ujvari et al. (2004) amplificam fragmentos de 900 pares de bases e 600 pares de bases, respectivamente. Esses fragmentos são adjacentes do gene 18S rRNA, sendo possível obter maior fragmento ao concatenar ambos. Com isso, Harris et al. (2011) caracterizaram molecularmente espécies de *Hepatozoon* em répteis presentes nas Ilhas Seychelles, África, sequenciando regiões do gene 18S rDNA, utilizando os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 (PERKINS e KELLER, 2001) e HepF300 e Hep900 (UJVARI et al., 2004), cuja análise filogenética indicou que as espécies de *Hepatozoon* presentes nessas ilhas formam uma linhagem monofilética. Em outro trabalho utilizando esses dois pares de *primers*, Maia et al. (2011) realizaram análise molecular sobre espécies de *Hepatozoon* de lagartos do Norte da África e encontraram múltiplas linhagens geneticamente distintas.

Recentemente, Borges-Nojosa et al. (2017) descreveram uma nova espécie, *Hepatozoon musa*, em serpente da espécie *Philodryas nattereri* no nordeste brasileiro, pela análise morfológica e morfométrica de gametócitos e caracterização molecular com auxílio dos *primers* HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900. Os autores mostraram a necessidade e a importância da análise molecular juntamente com a morfológica e morfométrica das formas evolutivas do parasito em répteis, para diagnóstico de espécies de hemogregarinas.

Justificativa

As análises morfológicas, morfométricas e moleculares são importantes e essenciais, pois auxiliam na distinção entre gêneros e possíveis espécies de hemoparasitos. Essa distinção é necessária para estudos posteriores sobre interação parasito-hospedeiro.

O estudo das interações entre parasitos e hospedeiros é de fundamental importância para compreensão de processos ecológicos, evolutivos e comportamentais desses indivíduos, incluindo seleção sexual, migração e capacidade competitiva.

Indivíduos parasitados podem tornar-se mais suscetíveis aos predadores e menos hábeis para estabelecer territórios. Portanto, o impacto de parasitos sobre a sobrevivência e reprodução de seus hospedeiros tem manifestações não somente na dinâmica populacional do hospedeiro, principalmente de vida livre, mas também, na abundância relativa, estrutura de comunidade, dispersão e diversidade genética.

Infecções por hemoparasitos em répteis cativos podem aumentar o poder de disseminação desses parasitos, caso não haja rígido controle parasitológico e manejo sanitário adequado. Sabe-se que répteis confinados são suscetíveis a estresse, perda de apetite, entre outros fatores responsáveis pela queda do sistema imunológico desse animal. Caso isso aconteça, se o mesmo estiver parasitado, pode gerar agravamento do quadro infeccioso.

Pesquisas hematológicas em répteis são escassas, poucos trabalhos podem ser citados, principalmente no território brasileiro. O número de publicações é menor quando se trata de indivíduos cativos. Além disso, com aumento comercial de répteis, considerados “pets” exóticos, há possibilidade de transmissão zoonótica desses patógenos sanguíneos.

Objetivos

1. Objetivo geral:

- ❖ Determinar a positividade e caracterizar morfologicamente, morfometricamente e molecularmente as hemogregarinas (Apicomplexa: Adeleina) presentes em répteis de vida livre e cativeiro.

2. Objetivos específicos:

- ❖ Determinar a positividade das hemogregarinas (Apicomplexa: Adeleina) pela técnica de extensão sanguínea em microscopia óptica convencional.
- ❖ Caracterizar morfologia e morfometria dos estágios evolutivos sanguíneos presentes nas extensões sanguíneas.
- ❖ Caracterizar molecularmente os gêneros/espécies de hemoparasitos através do sequenciamento.
- ❖ Verificar a existência de associação entre positividade, ambiente de vida (vida livre/ cativeiro, sexo e faixa etária).
- ❖ Verificar a existência de associação entre positividade e ser ou não peçonhenta em serpentes.

Metodologia

1. Comitê de Ética e Autorização

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização Animal (CEUA) sob protocolo: 032/16 e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob protocolo: 51398-1.

Foi realizada reunião com o Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos, responsável pelo Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), e com o biólogo Rômulo Antônio Righi de Toledo, chefe de Serviço de Animais Peçonhentas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), para explanar objetivos e procedimentos necessários para efetivação desse trabalho. Após as reuniões foi obtida permissão para realização da pesquisa com os répteis provenientes de cada local (Anexo 1 e 2).

2. Área de Estudo

O presente estudo foi desenvolvido em quatro locais distribuídos entre os Estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. Em todos esses locais o Bioma predominante é o Cerrado, entretanto há zonas de transição. No Estado de Goiás, a região na qual a coleta foi executada é considerada zona de transição do Bioma Cerrado com Bioma Amazônia.

2.1 Estado de Minas Gerais

O Estado de Minas Gerais localiza-se na porção Centro-Sul do território brasileiro ocupando área de 588.384 km². O Sul e o Leste do estado constituem regiões cujo clima varia de tropical úmido a tropical semiúmido. A porção central, Oeste e o triângulo mineiro apresentam clima tropical semiúmido típico, enquanto na região norte o clima é semiárido (VALADÃO, 1998; CARMO, 2010). Devido ao tamanho e a localização geográfica, o estado abrange parte dos biomas Cerrado (57% do território mineiro), Mata Atlântica (41%) e Caatinga (2%), além das zonas de transição (IBAMA, 2009; IBAMA, 2010).

Há registros de aproximadamente 1.781 vertebrados, representando ¼ das espécies conhecidas no país. Sendo 345 espécies de peixes, 200 de anfíbios, 770 de aves, 236 de mamíferos e 221 de répteis (SILVEIRA, 2009). Dentre os répteis, há registros de testudines, crocodilianos, lagartos e serpentes. No Cerrado, as espécies de serpentes mais prevalentes são as jibóias (*Boa constrictor*), as cascavéis (*Crotalus durissus*), e várias espécies de jararaca (*Bothrops* sp.) (COSTA e BÉRNILS, 2015).

Laboratório de Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS): Pertence à Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, Brasil, sendo coordenado pelo Professor Dr. André Luiz Quagliatto Santos (CRMV-MG

2401). Atende animais silvestres com problemas de saúde trazidos pelos responsáveis ou apreendidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e pela Polícia Militar Ambiental de Minas Gerais.

Os animais silvestres trazidos pelos responsáveis, ao chegarem no LAPAS são encaminhados ao ambulatório para receberem atendimento médico veterinário. Após o exame físico, em caso de necessidade, é realizada a prescrição da medicação e em seguida, devolvidos aos domicílios.

Em relação aos animais apreendidos pelo IBAMA e Polícia Militar Ambiental, os indivíduos saudáveis são vermifugados, mantidos em quarentena e em seguida encaminhados ao recinto. Neste local, os animais permanecem até o retorno do IBAMA, o qual promove a soltura em áreas de reserva florestal na região de Uberlândia. Os animais doentes recebem tratamento adequado, permanecendo no ambulatório tempo necessário para total recuperação.

Os animais provenientes do LAPAS foram considerados de vida livre ou de cativeiro dependendo do histórico e da origem. Àqueles nascidos no LAPAS ou que estavam no local por período maior ou igual a seis meses foram, neste estudo, considerados indivíduos cativeiros. Os indivíduos considerados de vida livre foram trazidos pelo IBAMA e/ou Polícia Ambiental e assim que chegaram foi efetivada coleta da amostra de sangue para o estudo, sem assistência médica prévia.

Em relação ao alimento fornecido para os répteis, os cágados e tartarugas são alimentados com ração para peixes. Para os filhotes e juvenis a ração fornecida é à base de cereais e farinha de peixe; os adultos recebem ração a base de farinha de peixe, ossos e carne. Para os jabutis, além da ração, são fornecidas, diariamente, frutas e verduras. Os crocodilianos se alimentam de fonte de proteína animal como, peixes, rãs (produzidas na Fazenda do Glória da UFU) e carnes bovina ou suína. As serpentes se alimentam de camundongos da espécie *Mus musculus* e ratos da espécie *Rattus norvegicus* procedentes do biotério da UFU.

Fundação Ezequiel Dias (FUNED): É especializada na produção e pesquisa de soros antipeçonhentos no Brasil. Oferece informações sobre serpentes, aranhas e escorpiões, bem como cuidados para a prevenção de acidentes com esses animais. O Serviço de Animais Peçonhentos é referência no assunto em Minas Gerais e no Brasil e tem como missão contribuir para o desenvolvimento biotecnológico da FUNED pelo fornecimento de venenos de origem animal, além de gerar e difundir o conhecimento sobre animais peçonhentos. É responsável também, pela manutenção dos animais em cativeiro, na extração e preparação de venenos para a produção de soros e pesquisa, e no atendimento ao público. O Serpentário

conta com uma exposição permanente, cuja coleção científica é utilizada para demonstrações em palestras.

A FUNED recebe semanalmente serpentes procedentes de captura pelo IBAMA ou comunidade local. Os animais recebem como alimento camundongos da espécie *Mus musculus* do Biotério da instituição.

Os indivíduos que nasceram ou que permaneceram no serpentário há mais de seis meses, foram considerados de cativeiro. Os indivíduos considerados de vida livre foram àqueles apreendidos pelo IBAMA ou trazidos pela comunidade local. Esses foram submetidos à coletadas de sangue assim que chegavam e medicados. Todos os procedimentos foram realizados por Biólogos e Médicos Veterinários com autorização e supervisão do chefe de Serviço De Animais Peçonhentos, Dr. Rômulo Antônio Righi de Toledo.

2.2 Estado de Goiás

O estado de Goiás está localizado na região Centro-Oeste do Brasil e os limites abrangem o estado de Tocantins (Norte), Minas Gerais (Sul e Leste), Mato Grosso (Oeste), Bahia (Nordeste), Mato Grosso do Sul (Sudoeste) e o Distrito Federal. A extensão territorial é de 340.086,698 Km², divididos em 246 municípios. A vegetação predominante é o Cerrado, porém, na região sul do estado há pequenas faixas de Mata Atlântica, principalmente nas margens dos rios, serras e na divisa com o estado do Mato Grosso (Oeste). O clima é tropical semiúmido, com temperatura média anual de 23°C. Os rios que cortam o estado pertencem a três Bacias-Hidrográficas: Bacia do São Francisco, Bacia do Araguaia-Tocantins e Bacia do Rio Paraná. A bacia Araguaia-Tocantins abrange 767.000km², 382.000km² ao Araguaia, seu principal afluente (CAVALCANTI e JOLI, 2002).

O local onde a coleta foi executada faz parte da Bacia Tocantins-Araguaia, e margeia o Rio Vermelho que desagua no Rio Araguaia, região localizada entre as cidades Aruanã e Britânia. A área foi escolhida por ser habitat natural de testudines, sendo utilizada para pesquisa pelo Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos. As coordenadas do local de coleta são 14°45'40,2" latitude Sul - 51° 32'40,82" de longitude Oeste . Bancos de Areia do Rio Vermelho, Sítio Duas Minas e proximidades (Figura 2).

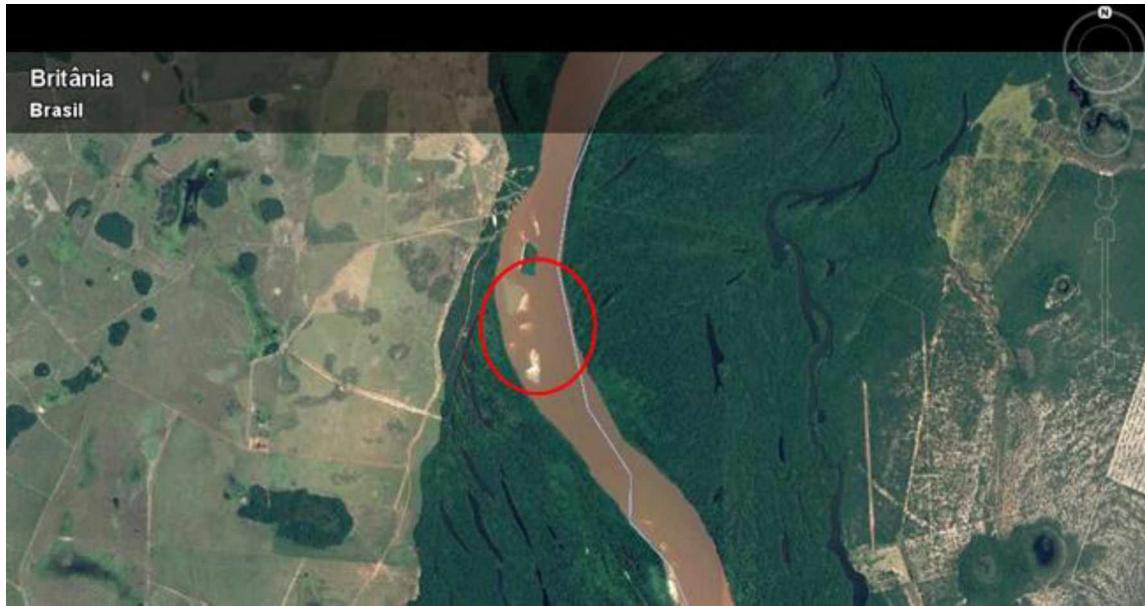


Figura 2: Local de coleta de testudines de vida livre no período de julho a setembro de 2015 e 2016.

2.3 Estado de Mato Grosso

O estado do Mato Grosso localiza-se no Centro-Oeste com 903.357,908 km² de extensão. O clima tropical semiúmido prevalece, com temperatura média anual elevada superior a 24°C, e alta pluviosidade (2000 mm anuais). O clima tropical é caracterizado por chuvas no verão e inverno seco com temperatura média anual de 23°C e pluviosidade média anual de 1500 mm. O estado é constituído por três biomas, o Pantanal Mato Grossense, a Amazônia e o Cerrado (PIAIA, 1997).

As coletas foram realizadas em região que se localiza na divisa com o Estado de Goiás (Leste), cujo Bioma predominante é o Cerrado e por ser “habitat” de crocodilianos. Assim como na região de Goiás, citada anteriormente, o Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos também a utiliza como local de pesquisa.

As coordenadas do local de coleta de sangue dos répteis de vida livre são 15°08'35,50" latitude Sul e 51°08'45,6" de longitude Oeste. Lago dos Jacarés, Fazenda Boa Esperança e proximidades (Figura 3).



Figura 3: Local de coleta de crocodilianos de vida livre no período de julho a agosto de 2015 e 2016.

3. População de estudo

Foram coletadas amostras de sangue de três grupos de répteis, sendo esses testudines, crocodilianos e serpentes, procedentes de ambiente de vida livre e ambiente cativo.

3.1 Répteis de cativeiro

Dentre os répteis de cativeiro, foram coletadas amostras de sangue de crocodilianos, serpentes e testudines provenientes do LAPAS no período de junho a setembro de 2015, e serpentes procedentes da FUNED no período de dezembro de 2015 a janeiro de 2016.

3.2 Répteis de vida livre

Dentre os répteis de vida livre, foram coletadas amostras sanguíneas de crocodilianos procedentes do Lago dos Jacarés, Fazenda Boa Esperança e proximidades, Mato Grosso; de serpentes procedentes do LAPAS e FUNED; e de testudines procedentes dos Bancos de Areia do Rio Vermelho e proximidades, Goiás.

As amostras procedentes de testudines e crocodilianos de vida livre foram coletados em dois anos consecutivos, no período de julho a agosto de 2015 e julho a agosto de 2016.

4. Contenção e identificação dos répteis

Para a coleta do sangue os animais foram submetidos à contenção física com equipamentos apropriados, seguindo normas semiológicas para cada grupo de répteis (crocodilianos, testudines, serpentes). Todos os animais foram inspecionados visualmente para presença de ectoparasitos, como sanguessugas, carapatos, dentre outros.

4.1 Testudines

Os testudines de vida livre foram capturados por pesca com anzóis (PORTELINHA et al., 2013) e foram marcados por perfuração carapacial (MALVASIO et al., 2002). Os animais de cativeiro foram capturados manualmente pela carapaça e imobilizados por contenção física (PICELLI et al., 2015).

Durante contenção para coleta das amostras, houve observação do sexo, por meio do dimorfismo sexual, e identificação da faixa etária segundo Vogt (2008). A determinação da faixa etária (adulto/jovem/filhote) dos testudines foi executada de acordo com Brasil (2008).

4.2 Crocodilianos

Os jacarés foram capturados pela busca ativa utilizando às mãos ou varas de pesca com corda de aço. A contenção foi realizada vedando os olhos e a boca com fita adesiva transparente e amarrando as patas com cordas (VIANA et al. 2010) (Figura 4).



Figura 4: Método de captura (A) e imobilização (B) de crocodilianos.

Antes da coleta de sangue, os animais foram submetidos a sexagem, medidos e pesados para classificação da faixa etária dos crocodilianos, segundo Velasco et al. (2009). Foram subdivididos em filhote (comprimento $\leq 25\text{cm}$), jovem (25-50cm), jovem-adulto (51-80cm) e adulto ($\geq 80\text{cm}$) (Anexo 5).

4.3 Serpentes

As serpentes não peçonhentas foram capturadas utilizando ganchos apropriados e imobilizadas pela contenção física com auxílio de mais de uma pessoa nas serpentes adultas. As serpentes peçonhentas foram capturadas com ganchos apropriados e contidas de duas maneiras: manualmente com as presas imobilizadas com blocos de isopor ou inseridas em

tubos de plástico transparentes. Durante contenção para coleta das amostras houve observação do sexo por meio de dimorfismo sexual ou exposição do falo e determinação da faixa etária (adulto/jovem/filhote) (ZIPPEL et al., 2001).

5. Coleta de sangue e armazenamento das amostras

Aproximadamente 2mL de sangue foram coletados, com seringas de 3mL e agulhas descartáveis (22/19), por punção do seio venoso paravertebral cervical (ZIPPEL et al., 2001) em todos os grupos de répteis (Figura 5).



Figura 5: Coleta de sangue pelo seio venoso paravertebral cervical em *Crotalus durissus* (A), *Python* sp. (B), *Caiman crocodilus* (C) e *Chelonoids* sp. (D).

Imediatamente após a coleta de sangue foram colocadas em lâminas limpas para confecção das extensões sanguíneas. O restante da amostra foi colocada em tubo de poliestireno contendo EDTA (anticoagulante) e armazenada a -20° C até utilização para execução da PCR

6. Extensão sanguínea, análise morfológica e morfométrica dos hemoparasitos.

Foram confeccionadas duas a cinco extensões sanguíneas. Posteriormente, as lâminas foram encaminhadas para o Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU. No laboratório, foram fixadas com

metanol absoluto e coradas com Giemsa 10% (EISEN e SCHALL, 2000). A análise foi executada em microscopia óptica com auxílio de óleo de imersão em objetiva 100x por diferentes pessoas treinadas para minimizar possíveis falsos positivos e negativos.

A análise morfológica das formas evolutivas sanguíneas observadas nas extensões foi realizada baseada em autores, como Telford (2009), Dvoráková et al. (2013), McAllister (2014), Soares et al. (2014), Devoráková et al. (2015) e Picelli et al. (2015) para *Haemogregarina* spp. As formas evolutivas de *Hepatozoon* spp. em serpentes foram identificadas de acordo com Telford (2009), Cook (2012), Moço et al. (2012), Haklová et al. (2013), O'Dwyer et al. (2013) e Cook et al. (2014). Em crocodilianos, as formas evolutivas do gênero *Hepatozoon* foram analisadas baseadas em artigos de como Lainson et al. (2003), Viana e Marques (2005), Telford (2009), Viana et al. (2010), Santos (2014).

No cálculo morfométrico, foram consideradas as medidas de comprimento, largura e área do corpo e núcleo do hemoparasito. Essas medições foram executadas para todas as formas evolutivas sanguíneas observadas para auxílio na identificação do gênero de hemoparasito analisado.

7. Análise Molecular.

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada para confirmar a positividade das extensões positivas pela análise em microscopia óptica convencional. Além disso, com essa técnica foi possível identificar espécies.

7.1 Extração DNA.

O DNA foi extraído empregando-se o “Kit IlustraTM blood genomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare®), utilizando-se 50µl de sangue por amostra, seguindo as instruções do fabricante. Após extração, as amostras foram acondicionadas em freezer -20°C até a realização da PCR. As extrações foram realizadas no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos, Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

7.2 Oligonucleotídeos e Condições de Amplificação.

Os *primers* utilizados para amplificação estão inseridos na Tabela 2.

As amostras de DNA extraídas do sangue foram quantificadas em equipamento NanoDrop 2000/spectrophotometer (Thermo Scientific) e submetidas à análise molecular para amplificação dos fragmentos dos genes desejados. As reações de amplificação das sequências de nucleotídeos relatadas anteriormente na literatura, foram testadas, primeiramente, de

acordo com as metodologias propostas pelos artigos em termociclador “My CyclerTM thermal cycler” (BioRad®). Posteriormente, se necessário, foram testadas outras concentrações e perfis de ciclos, na tentativa de padronização das reações da PCR.

Foram realizados testes e houve padronização em volume final de 25 µl com 10ng de DNA extraído (3µL para testudines e crocodilianos com *primers* HEMO1/HEMO2 e 5 µL para crocodilianos e serpentes com *primers* HEPF300/HEP900), 12,5 µl de 2X Go Taq Green Master mix (Promega) e o restante completado com H₂O *nucleasse free* (Qiagen). Cada reação foi checada para contaminação pelo uso de controles negativos utilizando todos os reagentes exceto o DNA. Os ciclos de amplificação utilizados, para cada par de oligonucleotídeos, constam na Tabela 3. Temperatura de *melting* (Tm) ótima para o anelamento de cada um deles foi determinada por gradiente de temperatura em termociclador “My CyclerTM thermal cycler” (BioRad®). Os produtos foram mantidos a 4°C até a realização da eletroforese.

Para *Haemogregarina* spp. em testudines, foi realizada a PCR utilizando o par de *primers* HEMO1/HEMO2 em 35 das 36 amostras positivas em microscopia óptica, pois em uma (1) amostra de vida livre só foi possível coletar sangue para extensão.

Para *Hepatozoon* spp. em crocodilianos, a técnica molecular foi executada com utilização de *primers* genéricos HEMO1/HEMO2 (900pb) e HEPF300/HEP900 (600pb). Estes *primers* amplificam dois fragmentos adjacentes do gene 18S rRNA, sendo possível obter um fragmento maior ao concatenar ambos, o que foi executado nesse caso. Essa junção foi executada pelo Prof Dr João Pedro Maia (Centro de Pesquisa em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Instituto de Biologia, Universidade do Porto, Portugal).

Das 41 amostras positivas em crocodilianos, a PCR foi executada em 39, pois em duas (2) amostras de vida livre só foi possível coletar sangue para extensão.

Por último, para *Hepatozoon* spp. em serpentes, foi possível executar a PCR com auxílio do par de *primers* HEPF300/HEP900 em todas as amostras previamente analisadas por microscopia óptica.

O controle positivo (amostra de sangue positiva para o gênero *Haemogregarina* em testudine da espécie *Podocnemis unifilis*) foi fornecido pelo Prof Dr Lúcio André Viana Dias, Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amapá, Macapá, Amapá. O controle positivo (amostra de sangue positiva para *Hepatozoon* em serpente *Crotalus durissus terrificus*) foi fornecido pela Profª Drª Lúcia Helena O'Dwyer de Oliveira do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, São Paulo.

Essa etapa de diagnóstico molecular foi realizada no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos (ICBIM-UFU) de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Tabela 2: Informações sobre as sequencias de oligonucleotídeos utilizadas na PCR para hemoparasitos do grupo das hemogregarinas em, répteis.

Hemoparasito/Reação	Primer	Gene	Sequencia de oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon	Referência
					Bibliográfica
<i>Hepatozoon</i> sp.	HepF300	18S rRNA	ATACATGAGCAAAATCTCAAC CTTATTATTCCATGCTGCAG	600pb	Ujvari et al. (2004)
PCR	Hep900				
Hemogregarinas	HEMO1	18S rRNA	TATTGGTTTAAGAACTAATTATGATTG CTTCTCCTCCTTAAGTGATAAGGTTCAC	900pb	Perkins and Keller (2001)
PCR	HEMO2				

Tabela 3: Condições do ciclo para cada par de oligonucleotídeo testado pela técnica da PCR.

Oligonucleotídeos	Ciclo Inicial (<i>Hot Start</i>)	Nº de Ciclos	Anelamento e Extensão	Extensão Final
HEPF300/HEP900	94 °C/3 min	35	94 °C/45 s, 56 °C/60 s e 72 °C/60 s	72 °C/7 min
HEMO1/HEMO2	94 °C/5 min	35	94°C/1min, 48 °C/1min, 72 °C/5min	72 °C/5 min

7.3 Eletroforese

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Pronadisa®) em tampão TBE 1X para presença de produtos amplificados utilizando-se 8 µL de cada produto da reação misturados a 2 µL de tampão de amostra. Os géis de agarose foram corridos em cuba horizontal “Hoefer HE 33” (GE Healthcare®). Fragmentos foram visualizados por coloração com “GelRed™” (Biotium®) e separados por 50 minutos a 100 volts sendo visualizados em Fotodocumentador “Major Science UVDI®”. Os fragmentos amplificados foram comparados com um marcador de tamanho molecular de 1000 pares de base (“GeneRulerTM 1kb DNA Ladder”, Fermentas®). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos de amplificação aproximados dos descritos na literatura (Tabela 2). O restante dos produtos de PCR foi utilizado para o sequenciamento genético.

Essa etapa da molecular foi executada no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos (ICBIM-UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

7.4 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.

A purificação e o sequenciamento foram executados no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) em Botucatu, São Paulo, Brasil, com auxílio da doutoranda Maria Regina Lucas da Silva e sob supervisão da Profª Drª Lúcia Helena O’Dwyer de Oliveira.

Após separação dos produtos da PCR em gel de agarose a 1,5%, as amostras positivas foram purificadas adicionando-se a enzima “Ilustra ExoProStar 1-Step” (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK) de acordo com as recomendações do fabricante e a seguir, foram submetidas ao sequenciamento.

Em seguida, foi executado sequenciamento de alguns produtos da PCR. O critério utilizado para escolha dessas amostras foi o hemoparasito, a espécie de hospedeiro, ambiente de vida (vida livre/cativeiro) e a morfologia das formas evolutivas observadas nas extensões sanguíneas.

As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador capilar “3500 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems®) utilizando-se o Kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com as recomendações do frabicante.

7.5 Análise dos Dados e Alinhamento das Sequências

Os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse*, gerados automaticamente, foram submetidos ao alinhamento consenso com auxílio do programa Bioedit (HALL, 1999), e as sequências obtidas foram comparadas com outras disponíveis no GenBank e identificadas utilizando o BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para a realização da análise filogenética, as sequências obtidas nesse estudo e as sequências disponíveis no GenBank foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE utilizando o software GENEIOUS v. 7.1.3 (Biomatters, <http://www.geneious.com>). A árvore filogenética foi enferida pelo método de “Neighbor-Joining Tree” usando MEGA 6.0 com “Bootstrap” de 1000 réplicas, constando somente na árvore os resultados acima de 50%.

8. Análise Estatística

Por trabalhar com indivíduos de vida livre não foi possível determinar previamente o n amostral. Entretanto, o número de amostras adquiridas no presente estudo é semelhante ao de artigos como o de Soares et al. (2014) para crocodilianos, Santos et al. (2014) e Picelli et al. (2015) para testudines e Mota (2011) para serpentes, sendo o nível de confiança de 95% e erro padrão de 5%. Valores considerados estatisticamente significativos igual $p<0,05$.

Para análise morfométrica, as medições de área, comprimento e largura do núcleo do hemoparasito e do corpo do hemoparasito foram executadas com auxílio do Programa “ImageJ”. Em seguida, essas medições foram descarregadas no software “Excel” para cálculo da média e desvio padrão. As variáveis registradas para os gamontes observados em cada indivíduo positivo foram estudadas empregando-se a Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey (Teste Pos-Hoc) foi utilizado para detectar diferenças de acordo com a distribuição de dados. Valores considerados estatisticamente significativos igual $p<0,05$.

O teste binomial de duas proporções (χ^2) foi utilizado para associação entre positividade para hemoparasitos e ambiente de vida (vida livre/cativeiro) dos répteis, sexo (macho/fêmea) dos répteis, serpentes (peçonhenta/não peçonhenta).

Para associação entre positividade e faixa etária (adulto/adulto-jovem/jovem/filhote) dos crocodilianos e positividade e faixa etária (adulto/jovem/filhote) dos demais répteis foi utilizado o teste de comparações múltiplas e simultâneo para parâmetros bonomiais de populações independentes (BIASE e FERREIRA, 2009). Valores considerados estatisticamente significativos igual $p<0,05$.

As análises estatísticas foram executadas com auxílio do Prof. Dr. Rogério Melo Costa Pinto, Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Resultados

1. Características gerais da população pesquisada.

Foram analisados 222 répteis, sendo 78 (35,13%) testudines, 58 (26,12%) crocodilianos e 86 (38,73%) serpentes. Desse total, 116 (52,25%) procedentes de vida livre e 106 (47,74%) de cativeiro. Do total (n=222) foram coletadas 21 espécies, sendo sete de testudines, três de crocodilianos e 11 serpentes (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Espécies de testudines, crocodilianos e serpentes cativas presentes no LAPAS nos meses de junho a setembro de 2015 e espécies de serpentes cativas procedentes da FUNED nos meses de dezembro de 2015 a janeiro de 2016.

Grupos	Espécie	Nome popular	Nº	Local
Crocodilianos	<i>Caiman yacare</i>	Jacaré-tinga	11	MG- LAPAS
	<i>Caiman latirostris</i>	Jacaré do papo amarelo	1	MG- LAPAS
	<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	Jacaré-coroa	6	MG- LAPAS
Testudines	<i>Phrynpops geoffroanus</i>	Cágado de barbicha	5	MG- LAPAS
	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	7	MG- LAPAS
	<i>Trachemys dorbigni</i>	Tigre d'água	23	MG- LAPAS
	<i>Trachemys elegans</i>	Tartaruga da orelha vermelha	5	MG- LAPAS
	<i>Chelonoidis</i> sp.	Jabuti	4	MG- LAPAS
	<i>Kinostemon scorpioides</i>	Muçuã	2	MG- LAPAS
Serpentes	<i>Epicrates crassus</i>	Cobra arco-íris	5	MG- LAPAS
	<i>Boa constrictor</i>	Jiboia	13	MG- LAPAS
	<i>Bothrops alternatus</i>	Urutu	5	MG – FUNED
	<i>Bothrops moojeni</i>	Caiçaca	5	MG – FUNED
	<i>Bothrops jararacuçu</i>	Jararacuçu	7	MG – FUNED
	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	5	MG – FUNED
	<i>Echis murinus</i>	Sucuri	1	MG- LAPAS
	<i>Python</i> sp.	Pítón	1	MG- LAPAS

Tabela 5: Espécies de testudines, crocodilianos e serpentes de vida livre procedentes dos estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso, cujas amostras foram colhidas nos anos de 2015 e 2016.

Grupos	Espécie	Nome popular	Nº	Local
Testudines	<i>Caiman yacare</i>	Jacaré-tinga	40	MT
	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	31	GO
	<i>Podocnemis expansa</i>	Tartaruga da Amazônia	1	GO
	<i>Oxyrhopus</i> sp.	Falsa coral	3	FUNED -MG
Serpentes	<i>Philodryas</i> sp.	Cobra-cipó	2	FUNED -MG
	<i>Xenodon moojeni</i>	Boipeva	2	FUNED -MG
	<i>Bothrops alternatus</i>	Urutu	1	FUNED -MG
	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	36	FUNED -MG

Dentre os testudines, 32 (41,02%) eram procedentes de vida livre e 46 (53,84%) de ambiente cativo; nos crocodilianos, 40 (68,96%) de vida livre e 18 (31,03%) de cativeiro; nas serpentes, 44 (51,16%) de ambiente de vida livre e 42 (48,83%) de cativeiro.

Dos 222 répteis, 101 (45,49%) eram machos, 103 (46,39%) eram fêmeas e em 18 não foi possível identificar o sexo. Do total de machos analisados, 56 (55,44%) eram de vida livre e 45 (44,55%) de cativeiro. As fêmeas analisadas foram 41 (39,80%) de vida livre e 61 (59,22%) de cativeiro. Nos testudines observou-se 40 (51,28%) machos e 38 (48,71%) fêmeas; nos crocodilianos foram identificados 31 (53,44%) machos e 16 (27,58%) fêmeas; e nas serpentes 30 (34,88%) machos e 49 (56,97%) fêmeas.

No que tange à faixa etária, foi determinado que 42 (53,84%) testudines eram adultos, 8 (10,25%) jovens, 12 (15,38%) filhotes. Em 16 não foi possível estabelecer a faixa etária. Dentre os crocodilianos, 35 (60,34%) eram adultos, 10 (17,24%) adultos-jovens e 13 (22,41%) jovens. Todas as serpentes analisadas foram adultas.

Em outro critério, as serpentes foram divididas em peçonhentas (64, 41%) e não peçonhentas (22, 58%). Dentre as peçonhentas, 42 (65,62%) de vida livre e 22 (34,37%) de cativeiro. As não peçonhentas eram 2 (9,09%) de vida livre e 20 (90,90 %) de cativeiro.

2. Positividade.

Do total (n=222) de répteis analisados, 102 (45,94%) foram positivos para hemogregarinas. Em testudines, o gênero *Haemogregarina* foi observado em 36 (46,15%) animais, sendo 35 (44,87%) das espécies *Podocnemis unifilis* e um (1,28%) de *Podocnemis expansa*. Nos crocodilianos, o gênero *Hepatozoon* foi observado em 41 (70,68%) animais, todos da espécie *Caiman crocodilus*. Em serpentes, o gênero *Hepatozoon* foi observado em 25 (29,06%) amostras das espécies *Crotalus durissus*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni* e *Boa constrictor*.

Em relação ao ambiente de vida, 82 (70,62%) répteis de vida livre e 20 (18,86%) de cativeiro foram positivos para as hemogregarinas. Em testudines, 31 (96,87%) animais de vida livre e 5 (10,86%) animais de cativeiro foram positivos; em crocodilianos, 31 (77,5%) animais de vida livre e 10 (55,55%) animais de cativeiro foram positivos; em serpentes, 20 (45,45%) animais de vida livre e 5 (11,90%) animais de cativeiro foram positivos. As análises estatísticas entre ambiente de vida e positividade foram significativas para cada grupo de répteis analisados ($p<0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Relação entre positividade para hemogregarinas e ambiente de vida (vida livre/cativeiro) dos répteis analisados no presente estudo, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Grupo	*Nº	Positivos (%)	Negativos (%)	**p
Testudines				
Vida livre	32	31 (96,87%)	1 (3,13%)	$p = 0,0001$
Cativeiro	46	5 (10,86%)	41 (89,15%)	
Crocodilianos				
Vida livre	40	31 (77,5%)	9 (22,5%)	$p = 0,00894$
Cativeiro	18	10 (55,55%)	8 (44,5%)	
Serpentes				
Vida livre	44	20 (45,45%)	22 (54,55%)	$p = 0,0006$
Cativeiro	42	5 (11,90%)	37 (88,1%)	

*Número de amostras. ** $p<0,05$.

A positividade em relação ao sexo foi de 54 (53,46%) machos e 44 (42,7%) fêmeas. Nos testudines, observou-se 19 (47,5%) machos e 17 (44,73%) fêmeas; dentre os crocodilianos, 27 (87,09%) machos e 10 (62,5%) fêmeas; e nas serpentes, 8 (26,66%) machos e 17 (34,69%) fêmeas (Tabela 8). A associação entre sexo e positividade não foi significativa ($p<0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7: Associação entre positividade e sexo de cada grupo de répteis analisados no presente estudo, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Grupos		*Nº	Macho	Fêmea	**p
Testudines	Total	78	40 (51,28%)	38 (48,71%)	
	Positivas	36	19 (52,77%)	17 (47,22%)	p = 0,2316
Crocodilianos	Total	58	31 (53,44%)	16 (27,58%)	
	Positivas	41	27 (65,85%)	10(24,39%)	p = 0,7162
Serpentes	Total	86	30 (34,88%)	49 (56,97%)	
	Positivas	25	8 (32%)	17 (68%)	p = 0,652

*número de amostras. ** p>0,05.

Dentre os machos analisados, foram positivos 46 (82,14%) de vida livre e 8 (17,77%) de cativeiro. Nas fêmeas analisadas, 32 (78,04%) de vida livre e 12 (19,67%) de cativeiro foram positivas. Na Tabela 8, encontram-se os resultados da positividade da faixa etária dentre os testudines, na qual 26 (61,90%) eram adultos, 7 (87,5%) jovens e 3 (20,00%) filhotes. A análise estatística entre faixa etária e positividade para testudines não foi significativa.

Tabela 8: Positividade para hemogregarinas entre as faixas etárias (adulto, jovem e filhote) de testudines, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Testudines	*Nº	Adulto	Jovem	Filhote	**p
Positividade	36 (46,15%)	26 (61,90%)	7 (87,5%)	3 (20,0%)	
Negatividade	42 (%)	16 (38,09%)	1 (12,5%)	12 (80%)	p>0,05
Total	78	42 (53,84%)	8 (10,25%)	15 (19,23%)	

*Número de amostras. ** Análise estatística significativa quando p>0,05.

Como pode ser observado na tabela 9, 28 (80%) adultos crocodilianos, 7 (70%) adultos-jovens e 6 (46,15%) jovens foram positivos. A análise estatística entre faixa etária e positividade para os crocodilianos foi significativa somente entre adulto e jovem (p = 0,0192).

Tabela 9: Positividade para hemogregarinas entre as faixas etárias (adulto, adulto-jovem e jovem) para os crocodilianos, nos anos de 2015 e 2016, no Bioma Cerrado.

Crocodilianos	Nº	Adulto	Adulto-jovem	Jovem
Positividade (%)	41	28 (80%) ^{A,a}	7 (70%) ^a	6 (46,15%) ^{A,a}
Negatividade (%)	17	7 (20%)	3 (30%)	7 (53,84%)
Total	58	35 (60,34%)	10 (17,24%)	13 (22,41%)

Nº (Número de amostras). Letras maiúsculas representam significância estatística ($p<0,05$). Letras minúsculas representam resultados não significativos ($p>0,05$).

Nas serpentes, todas as 25 (29,06%) positivas foram adultas, das quais 24 (37,5%) eram peçonhentas e 1 (4,54%) não peçonhenta. Foi observada significância entre ser ou não ser peçonhenta ($p = 0,033$) (Tabela 10).

Tabela 10: Positividade para hemogregarinas nas espécies de serpentes peçonhentas e não peçonhentas procedentes da FUNED, cujas amostras sanguíneas foram coletadas no período de dezembro de 2015 a janeiro de 2016.

	Espécies	Nº	P (%)	N (%)	*p
Peçonhenta	<i>Crotalus durissus</i>	41	21 (51,2%)	20 (48,78%)	$p = 0,0033$
	<i>Bothrops alternatus</i>	6	1 (16,6%)	5 (83,33%)	
	<i>Bothrops moojeni</i>	5	2 (40%)	3 (60%)	
	<i>Bothrops jararacuçu</i>	7	0	7 (100%)	
	<i>Philodryas otfersi</i>	2	0	2 (100%)	
	<i>Oxyrhopus</i> sp.	3	0	3 (100%)	
	Total	64	24 (37,5%)	40 (62,5%)	
Não	<i>Xenodon</i> sp.	2	0	2 (100%)	
Peçonhenta	<i>Boa constrictor</i>	13	1 (7,6%)	12 (92,30%)	
	<i>Epicrates</i> sp.	5	0	5 (100%)	
	<i>Euclistes murinus</i>	1	0	1 (100%)	
	<i>Python</i> sp.	1	0	1 (100%)	
	Total	20	1 (5%)	19 (95%)	

Nº (Número de amostras). P (Positividade). N (Negatividade). * $p<0,05$.

3. Análise morfológica e morfométrica das hemogregarinas.

❖ *Haemogregarina* sp. em testudines.

Foram encontradas nas extensões sanguíneas de *P. unifilis* formas evolutivas de trofozoítos, pré-merontes, merontes primários eritrocíticos (micromerontes), merontes secundários eritrocíticos (macromerontes), microgametócitos e macrogametócitos. Dentre

essas, as mais observadas foram macrogametócitos e microgametócitos. Em *P. expansa* foram observados somente macrogametócitos e microgametócitos.

No que tange os merontes eritrocíticos secundários (macromerontes), observou-se formas morfológicas iniciais (9-15 núcleos) e formas morfológicas com intensa divisão da cromatina nuclear (>50 núcleos) (Figura 6).

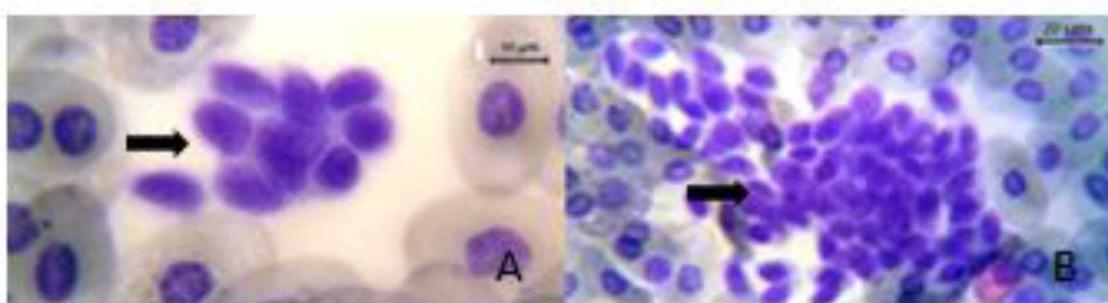


Figura 6) Macromerontes observados em extensões sanguíneas de testudines. (A): formação incial com 9-15 núcleos. (B) intensa divisão da cromatina nuclear (>50 núcleos). Parasitos indicados por setas. Escala: (A) 10 μ m; (B) 20 μ m.

Observou-se microgametócitos parasitando individualmente ou, com até três formas em um único eritrócito. Foram encontradas duas morfologias de microgametócitos (Micro1 e Micro2) e duas de macrogametócitos (Macro1 e Macro2) (Figura 7 e Tabela 11).

Os dados morfométricos foram obtidos para todas as formas evolutivas observadas. Entretanto, em algumas formas evolutivas, não foi possível apresentar os cálculos morfométricos do núcleo do parasito (área, comprimento e largura), devido a ausência de cromatina nuclear definida (Tabela 12 e Tabela 13).

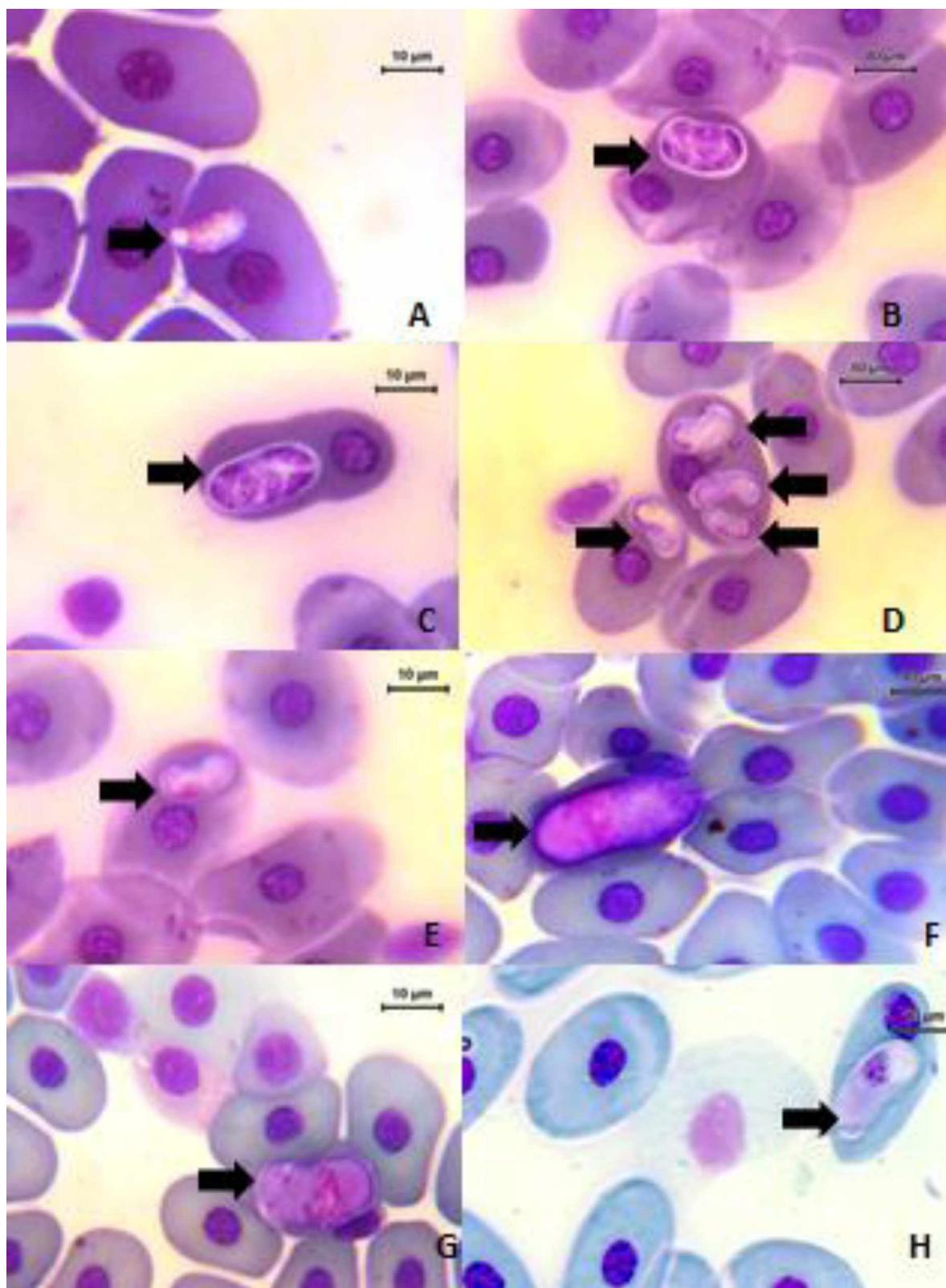


Figura 7: Estágios evolutivos de *Haemogregarina* sp. no sangue de *Podocnemis unifilis* (indicados por setas): A) trofozoíto; B) pré-merontes; C) merontes primários eritrocíticos; D) Microgametócitos (Micro1); E) Microgametócitos (Micro2) F-G) Macrogametócitos (Macro1); H) Macrogametócitos (Macro2). Escala: 10μm.

Tabela 11: Características morfológicas das formas evolutivas de *Haemogregarina* sp. observadas por microscopia óptica nas extensões sanguíneas de testudines de vida livre e cativeiro procedentes dos Estados de Goiás e Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016.

Características morfológicas	
Trofozoítos	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenos e alongados; • Núcleo não evidenciado; • Presença de vacúolo citoplasmático em uma de suas extremidades.
Pré-merontes	<ul style="list-style-type: none"> • Formato arredondado e levemente recurvado; • Cromatina nuclear dispersa por todo citoplasma (divisão nuclear); • Presença de envoltório parasitóforo (cápsula)
Merontes eritrocíticos primários (micromerontes)	<ul style="list-style-type: none"> • Robustos com suave curvatura; • Divisão nuclear evidenciada, núcleos pequenos e retangulares; • Presença de envoltório parasitóforo; • Foram observados nas extensões sanguíneas somente cinco micromerontes (4-7 núcleos)
Microgametócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Recurvados (formato de foice) • Presença de vacuolo parasitóforo; • Apresentam duas formas morfológicas: Micro1 (Ausência de cromatina nuclear com formato definido, Fig. 6D) e Micro2 (núcleo com disposição mediana, Fig. 6E).
Macrogametócitos	<ul style="list-style-type: none"> • Deformações no eritrócito e deslocamento do núcleo celular para as laterais; • Presença de vacúolo parasitóforo (envoltório); • Apresentam duas morfologias: Macro 1 (Comprimento do parasito igual ou superior ao eritrócito, com núcleo localizado centralmente e da mesma largura do hemoparasito; Fig.6 F-G); Macro 2 (comprimento do parasito menor que do eritrócito com núcleo menor que a largura do hemoparasito, Fg.6 H).
Merontes eritrocíticos secundários (Macromerontes)	<ul style="list-style-type: none"> • Maiores que os micromerontes e com intensa divisão nuclear; • Núcleos largos, redondos e de cromatina densa; • Deformação intensa e/ou ruptura do eritrócito; • Foram observados seis macromerontes com 9 núcleos, 13 núcleos, 15 núcleos e três com mais de 50 núcleos.

Tabela 12: Dados morfométricos das formas evolutivas do gênero *Haemogregarina* em testudines de vida livre e cativeiro.

Trofozoíto			Pré-meronte			Merentes eritrocíticos primários			
	C.P	L.P	A.P	C.P	L.P	A.P	C.P	L.P	A.P
M	8,78	4,06	23,19	11,03	7,93	30,04	16,43	8,74	48,0
DP	2,5	0,66	2,097	1,94	1,65	1,32	1,83	0,84	1,67
MIN	7,15	3,34	21,08	9,66	6,37	28,50	15,06	8,2	47,12
MÁX	12,68	4,65	24,33	12,41	8,44	31,46	18,890	10,42	49,89

CP (comprimento do corpo do parasito), LP (largura do corpo do parasito), AP (área do parasito), M (média), DP (desvio padrão), MIN (mínima), MÁX (máxima). Medidas lineares em μm e medidas das áreas em μm^2 .

Tabela 13: Dados morfométricos das formas evolutivas do gênero *Haemogregarina* em testudines de vida livre e cativeiro.

Macrogametócito (Macro1)						Macrogametócito (Macro2)						Microgametócito (Micro1)						Microgametócito (Micro2)						
	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N
M	20,5	8,12	44,6	7,94	4,3	24,6	18,8	5,6	39,5	4,0	3,6	14,1	8,66	4,3	15,1	----	----	----	11,4	4,1	23,3	4,96	0,43	2,4
DP	0,82	0,76	6,01	0,76	0,0	0,9	1,3	0,8	2,9	0,6	0,3	1,74	1,58	1,5	2,4	----	----	----	3,29	0,6	2,4	1,9	0,46	1,39
MIN	19,8	6,79	30,9	6,48	3,18	19,2	17,4	4,3	37,5	3,1	2,99	11,5	4,71	2,5	9,4	----	----	----	9,45	3,5	10,7	2,13	0,03	0,85
MÁX	20,9	10,0	58,3	9,31	5,29	30,0	19,2	6,9	40,9	4,86	3,99	15,8	13,8	11	20,8	----	----	----	14,1	5,2	27,5	7,94	0,69	3,55

CP (comprimento do corpo do parasito), LP (largura do corpo do parasito), AP (área do parasito), CN (comprimento do núcleo do parasito), LN (largura do núcleo do parasito), NA (área do núcleo do parasito), M (média), DP (desvio padrão), MIN (mínima), MÁX (máxima). Medidas lineares em μm e medidas das áreas em μm^2 .

❖ *Hepatozoon* em crocodilianos

Foi possível identificar gametócitos extraeritrocíticos e intraeritrocíticos. Nas extensões sanguíneas estavam presentes até duas formas por eritrócito, denominadas por Jovani (2002) de *double gametocyte* (Figura 8 e Tabela 14).

Os dados morfométricos foram obtidos dos gametócitos extraeritrocíticos e intraeritrocíticos. Nos gametócitos intraeritrocíticos observou-se quatro variações nas características morfológicas: a) dobramento, b) cromatina nuclear dispersa, c) presença de vacúolos citoplasmáticos e d) gametócitos maduros. Na variação morfológica b, não foi possível obter cálculos morfométricos do núcleo do parasito (área, comprimento e largura) (Tabela 15 e Tabela 16).

Pela análise morfológica e morfometria dos gametócitos intraeritrocíticos e extraeritrocíticos e por ser de amostra sanguínea de crocodilianos, pode-se conjecturar tratar-se de *Hepatozoon caimani*.

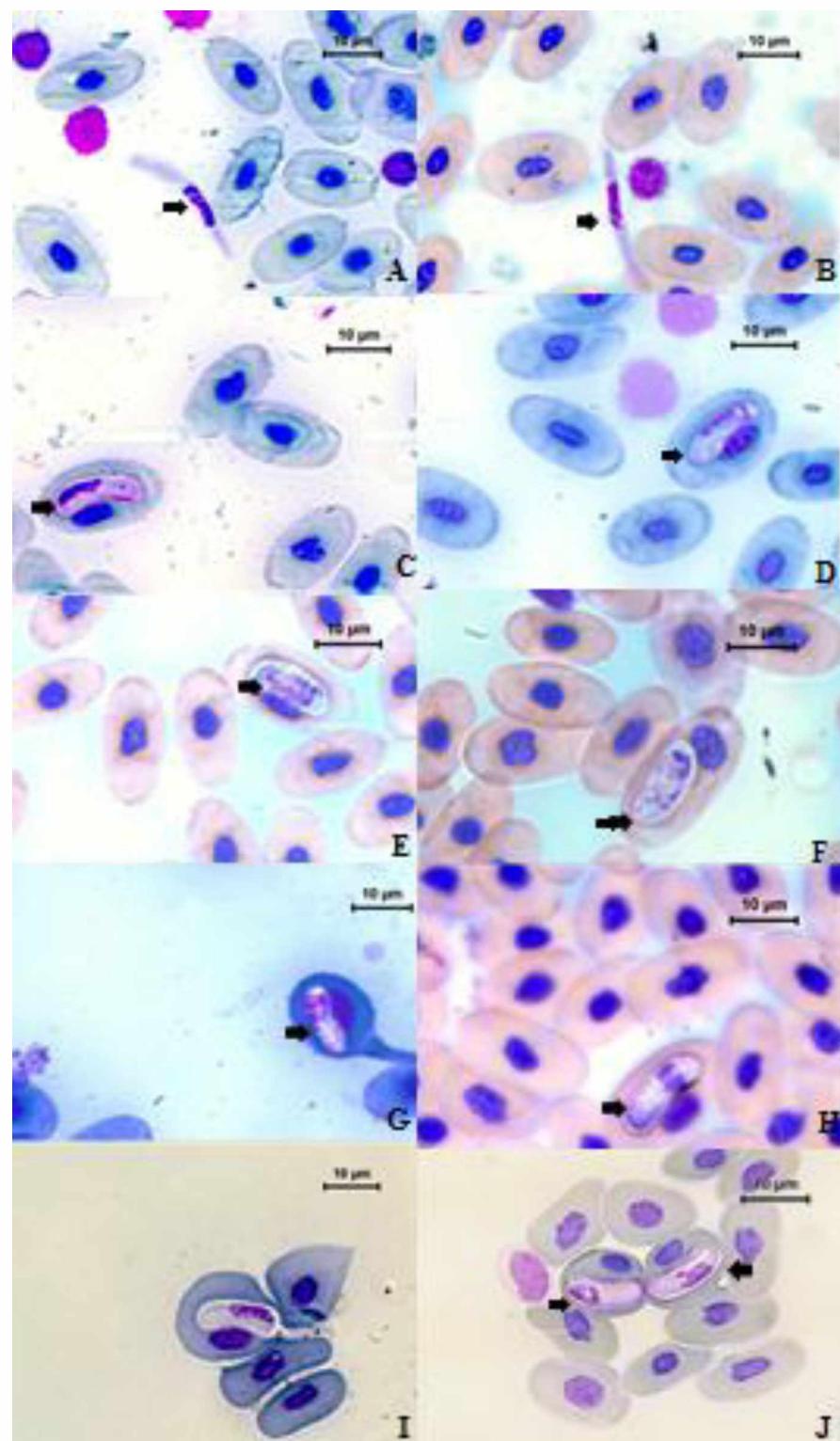


Figura 8: Gametócitos extraeritrocíticos e intraeritrocíticos de *Hepatozoon* em *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro. A-B) Gametócitos extraeritrocíticos, ou formas livres. C-J) Gametócitos intraeritrocíticos. Escala: 10 μ m.

Tabela 14: Características morfológicas das formas evolutivas de *Hepatozoon* sp. observadas por microscopia óptica nas extensões sanguíneas de crocodilianos de vida livre e cativeiro procedentes dos Estados de Mato Grosso e Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016.

Formas evolutivas sanguíneas		Morfologia
Gametócito Extraeritrocítico (A,B)	Núcleo	<ul style="list-style-type: none"> Disposição de mediana e cromatina nuclear densa.
	Citoplasma	<ul style="list-style-type: none"> Uniforme, sem granulações e sem vacúolo citoplasmático.
	Forma	<ul style="list-style-type: none"> Alongada e fina.
Gametócito Intraeritrocítico	Núcleo	<ul style="list-style-type: none"> Dispersa por todo o citoplasma (Fig. 7 E-F) Densa e concentrada (Fig. 7 G-J) Localização: Centro-lateral ocupando até dois quartos do parasito.
	Citoplasma	<ul style="list-style-type: none"> Presença (Fig. 7 G-H) ou ausência (Fig. 7 I-J) de vacúolos citoplasmáticos.
	Forma	<ul style="list-style-type: none"> Forma em dobramento (após penetrar no eritrócito) (Fig. 7 C-D). Alongada, robusta e não recurvada (Fig. 7 E-F) Alongada, robusta e com suave curvatura (Fig. 7 G-J). Extremidades iguais (abauladas) (Fig. 7 E-J) Presença ou ausência de envoltório parasitóforo (cápsula).
	Deformações eritrócito	<ul style="list-style-type: none"> Alterações hipertróficas. Deslocamento do núcleo celular para as laterais.

Tabela 15: Dados morfométricos das formas evolutivas de *Hepatozoon* sp. em *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro.

Gamontes intraeritrocíticos																								
Em dobramento					Cromatina nuclear dispersa					Com vacúolos citoplasmáticos					Maduros									
	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N
M	20,0	2,9	39,48	5,76	2,0	8,83	11,81	3,61	39,85	12,25	4,68	51,27	7,0	2,1	7,9	12,1	3,18	29,0	6,94	2,15	12,68
DP	4,44	0,74	3,77	0,68	0,17	0,0	1,52	0,92	5,84	1,53	0,47	3,56	2,8	1,9	0,5	1,36	0,8	11,3	2,22	0,64	4,3
MIN	10,38	2,1	36,32	5,28	1,9	8,84	9,1	1,56	36,0	10,3	4,0	48,8	13,8	1,3	7,1	9,53	1,24	22,8	3,15	1,0	6,4
MÁX	24,8	4,23	40,57	6,25	2,16	8,82	14,51	4,84	42,75	15,54	5,3	54,6	5,2	2,9	15,5	24,1	8,73	51,3	15,77	3,4	24,4

CP (comprimento do corpo do parasito), LP (largura do corpo do parasito), AP (área do parasito), CN (comprimento do núcleo do parasito), LN (largura do núcleo do parasito), NA (área do núcleo do parasito), M (média), DP (desvio padrão), MIN (mínima), MÁX (máxima). Medidas lineares em μm e medidas das áreas em μm^2 .

Tabela 16: Dados morfométricos de gametócitos extraeritrocíticos *Hepatozoon* em *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro.

Gamontes extraeritrocíticos						
	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N
M	21,57	3,64	52,01	8,85	3,05	24,95
DP	2,79	1,97	4,65	2,24	1,60	6,76
MIN	14,76	1,80	49,75	6,12	1,07	18,1
MÁX	29,22	5,48	55,31	13,59	9,45	38,7

CP (comprim. do parasito), LP (largura do parasito), AP (área do parasito), CN (comprim. do núcleo), LN (largura do núcleo), NA (área do núcleo), M (média), DP (desvio padrão), MIN (mínima), MÁX (máxima). Medidas lineares em μm e medidas das áreas em μm^2 .

❖ *Hepatozoon* sp. em serpentes.

Nos eritrócitos das serpentes foram observados até dois gametócitos de *Hepatozoon* sp. (*double gametocyte*) em cada eritrócito. Esses gametócitos estavam presentes em serpentes peçonhentas e não peçonhentas tanto de vida livre como de cativeiro (Figura 9).

Nos gametócitos intraeritrocíticos, observou-se cinco variações nas características morfológicas, denominadas M1, M2, M3, M4 e M5 (Tabela 17).

Todas as variações das características morfológicas foram submetidas a morfometria. Na M4 não foi possível obter o cálculo morfométrico do núcleo do parasito (área, comprimento e largura) devido ao pelo formato indefinido do mesmo (Tabela 18).

Das cinco variações nas características morfológicas observadas nas extensões sanguíneas, os cálculos resultaram em três variáveis significativas. Embora M3 e M4 apresentam morfologias diferentes, apresentaram mesmas variáveis relacionadas ao parasito. Também em M1, M2 e M5, essas três morfologias apresentaram mesmas variáveis relacionadas ao parasito. Em relação às medidas do núcleo do parasito, M1 e M2 apresentaram mesma variáveis, entretanto, as médias da área e do comprimento do núcleo do parasito diferiram com as de M5, este apresentou medidas um pouco menor às médias obtidas em M1 e M2. (Tabela 18).

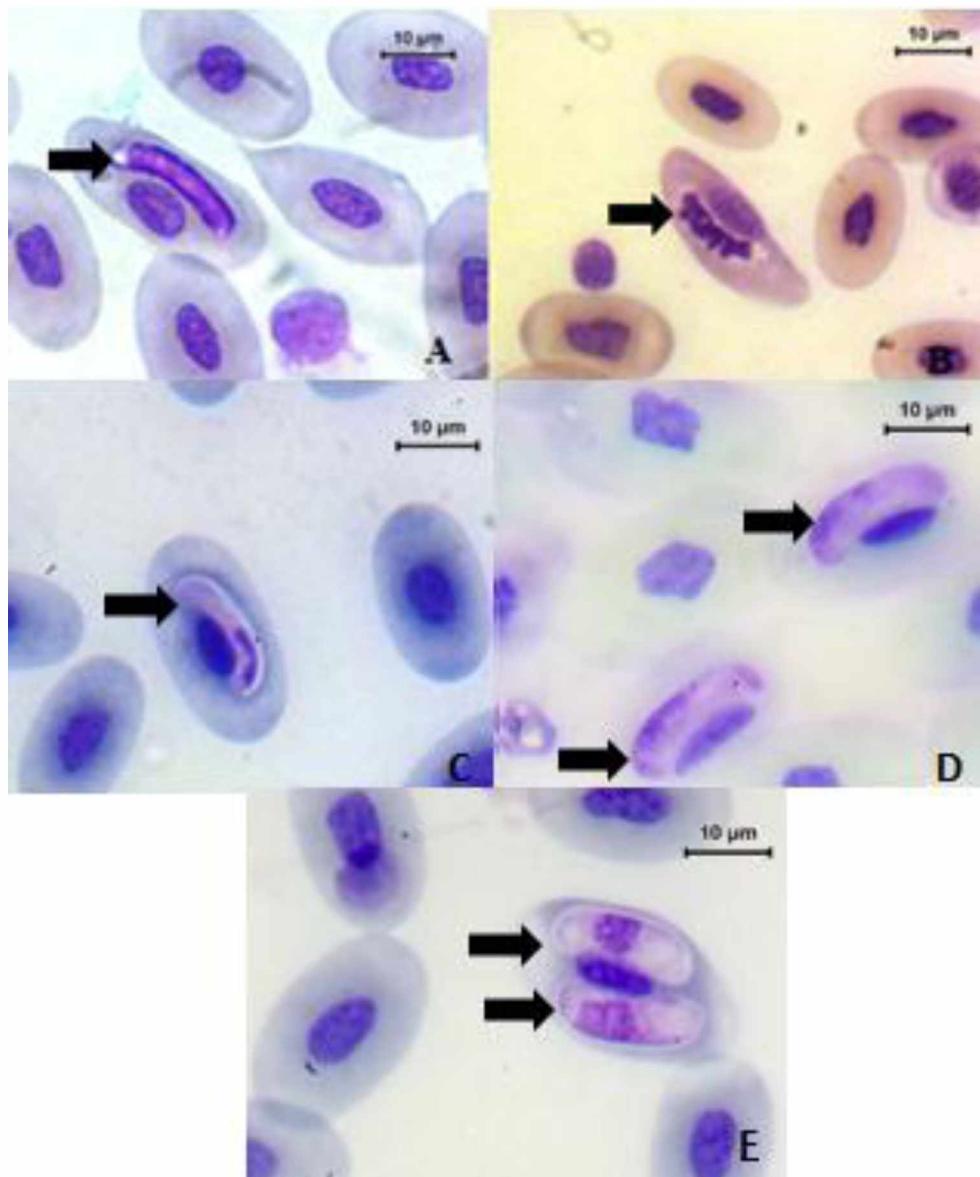


Figura 9: Variações nas características morfológicas de gametócitos intraeritrocíticos do gênero *Hepatozoon* em serpentes de vida livre e de cativeiro. A) M1: *Crotalus durissus* de vida livre; B) M2: *Crotalus durissus* de vida livre; C) M3: *Bothrops moojeni* de cativeiro; D) M4: *Boa constrictor* de cativeiro; E) M5: *Crotalus durissus* de cativeiro. Escala: 10μm.

Tabela 17: Características morfológicas das formas evolutivas de *Hepatozoon* spp. observadas por microscopia óptica nas extensões sanguíneas de serpentes de vida livre e cativeiro procedentes do Estado de Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016

Gametócitos intraeritrocíticos					
	M1	M2	M3	M4	M5
Núcleo	Alongado, ocupando quase todo hemoparásito, cromatina nuclear densa e compacta.	Alongado, ocupando quase todo o parasito, cromatina nuclear em forma de zigue-zague	Alongado, margeando o corpo do parasito, cromatina nuclear densa.	Formato, disposição e cromatina incertos. Visível ou não em microscopia óptica convencional.	Largo, ovalado, disposição mediana, cromatina nuclear menos densa e ocupando quase a mesma largura que o parasito.
Citoplasma	Uniforme e sem granulações	Com vacúolos citoplasmáticos.	Uniforme e sem granulações	Uniforme e sem granulações	Uniforme e sem granulações
Forma	Comprida e fina.	Menor e mais larga que a M1; com suave curvatura e ambas laterais abauladas.	Alongada, sendo uma extremidade arqueada (forma de foice) e a outra extremidade linear, ambas abauladas.	Comprida e robusta, sem curvatura, com ambas laterais abauladas.	Comprida e robusta, com leve curvatura e ambas laterais abauladas ou uma lateral abaulada e outra afilada.
	<ul style="list-style-type: none"> Envoltório parasitóforo (cápsula) presente ou ausente. 				
Deformação eritrocítica	<ul style="list-style-type: none"> Alterações hipertróficas. Deslocamento do núcleo celular para as laterais. 				

Tabela 18: Dados morfométricos de cinco variações morfológicas (M1, M2, M3, M4 e M5) de gametócitos intraeritrocíticos de *Hepatozoon* spp. em serpentes de vida livre e cativeiro.

Gamontes intareritrocíticos																											
	(M1)						(M2)						(M3)						(M4)				(M5)				
	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N	C.P	L.P	A.P	C.P	L.P	A.P	C.N	L.N	A.N
M	19.0	3.25	70.3	18.1	2.3	24.84	17.9	3.55	68.9	15.52	1.9	23.85	14.7	2.39	41.07	4.21	0.79	6.41	14.3	2.5	39.9	19.1	4.8	71.0	7.56	1.79	17.83
DP	2.04	1.25	2.51	3.1	0.8	2.28	1.29	1.57	2.32	2.6	0.7	2.26	2.87	1.1	1.62	0.35	0.46	1.97	2.02	0.9	3.7	3.5	1.1	1.9	0.51	0.46	1.97
MIN	18.7	1.1	68.1	16.55	1.1	20.38	16.6	2.22	67.6	15.85	1.4	20.01	12.6	2.1	39.7	3.80	0.50	5.23	13.2	2.2	26.2	17.3	3.9	70.4	6.52	1.03	15.23
MÁX	23.3	5.4	73.6	20.8	3.5	26.3	19.6	4.4	70.2	17.24	2.8	24.7	15.03	4.7	42.4	4.52	1.25	7.24	16.9	3.2	40.6	22.9	6.76	73.0	7.84	2.55	18.24
Média ± Desvio Padrão (M ± SD)																											
	(M1)						(M2)						(M3)						(M4)				(M5)				
C.P	19.0±2.04 ^a						17.9±1.29 ^a						14.7±2.87 ^c						14.3±3.02 ^c				19.1±3.5 ^a				
L.P	3.25±1.25 ^a						3.55±1.57 ^a						2.39±1.1 ^c						2.5±0.9 ^c				4.8±1.1 ^a				
A.P	70.3±2.51 ^a						68.9±2.32 ^a						41.07±1.62 ^c						39.9±3.7 ^c				71.0±1.9 ^a				
C.N	18.1±3.1 ^a						16.52±2.6 ^a						4.21±0.35 ^c						-----				7.56±0.51 ^b				
L.N	2.3±0.8 ^a						1.9±0.7 ^a						0.79±0.461 ^c						-----				1.79±0.461 ^a				
A.N	24.84±2.28 ^a						23.58±2.26 ^a						6.41±1.97 ^c						-----				17.83±1.97 ^b				

CP (comprimento do corpo do parasito), LP (largura do corpo do parasito), AP (área do parasito), CN (comprimento do núcleo do parasito), LN (largura do núcleo do parasito), NA (área do núcleo do parasito), M (média), DP (desvio padrão), MIN (mínima), MÁX (máxima). Medidas lineares em μm e medidas das áreas em μm^2 . As medidas de comprimento, largura e área do parasito estão representadas por média ± desvio padrão (SD). As medidas com mesma letra na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey.

4. Análise molecular.

Para *Haemogregarina* em testudines, do total de 35 amostras positivas pela microscopia óptica, houve amplificação de DNA em 19 (63,3%). Ressalta-se que a PCR foi positiva para amostras de *Podocnemis unifilis*, a única amostra positiva pela análise morfológica e morfométrica de *P. expansa* foi negativa na PCR. Em *Hepatozoon* em crocodilianos, do total de 39 amostras previamente diagnosticadas positivas, houve amplificação em 31 (79%) com auxílio dos primers HEMO1/HEMO2 e em 34 (87%) com auxílio dos primers HEPF300/HEP900; para *Hepatozoon* em serpentes, do total de 25 amostras positivas pela análise morfológica e morfométrica, houve amplificação 24 (96%) amostras (Tabela 19; Figura 10 e 11).

Tabela 19: Positividade da PCR com utilização dos pares de primers HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900 para os três grupos de répteis analisados nesse estudo, nos anos 2015 e 2016.

	HEMO1/HEMO2			HEPF300/HEP900		
	N amostral	P (%)	N (%)	N amostral	P (%)	N (%)
Testudines	35	23 (65,7%)	12 (34,3%)	-----	-----	-----
Crocodilianos	39	31 (79%)	8 (21%)	39	34 (97%)	5 (13%)
Serpentes	-----	-----	-----	25	24 (96%)	1 (4%)

P (Positividade), N (Negatividade).

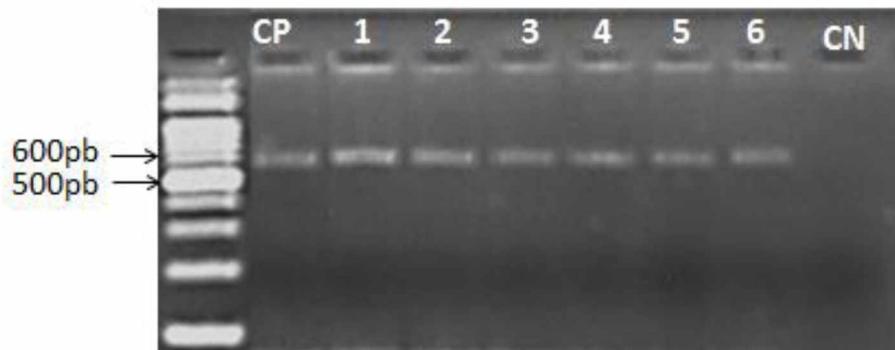


Figura 10: Visualização em gel de agarose (1,5%) dos produtos da PCR do gene 18S rDNA de *Hepatozoon* sp. amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos HepF300/Hep900. CP: Controle positivo; 1: Amostra de sangue de crocodiliano de vida livre (coleta em 2015); 2: crocodiliano de vida livre (coleta em 2016); 3: crocodiliano de cativeiro; 4: serpentes de vida livre; 5: serpente de cativeiro LAPAS; 6: serpente de cativeiro FUNED; CN: Controle negativo.

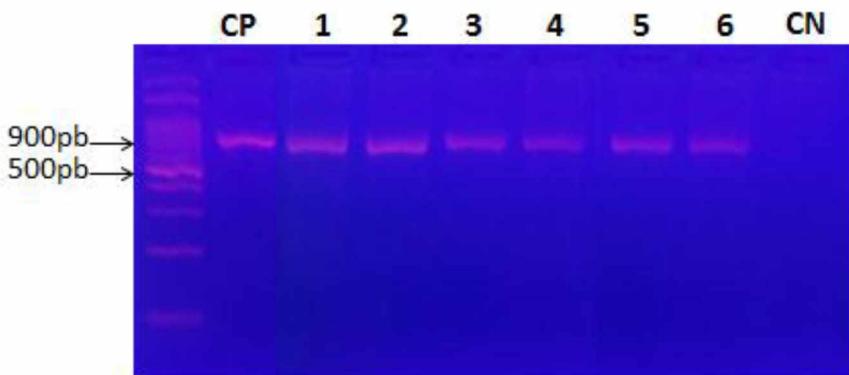


Figura 11: Visualização em gel de agarose (1,5%) dos produtos da PCR do gene 18S rDNA de hemogregarina amplificados utilizando-se o par de oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2. CP: Controle positivo, 1: Amostra de sangue de testudine de cativeiro; 2: testudine de vida livre (coleta 2015); 3: testudine de vida livre (coleta 2016); 4: crocodiliano de cativeiro; 5: crocodiliano de vida livre (coleta em 2015); 6: crocodiliano de vida livre (coleta em 2016); CN: Controle negativo.

As amostras sequenciadas para *Haemogregarina* em testudines foram duas, uma de *P. unifilis* de vida livre (Trac3) e uma amostra de *P. unifilis* de cativeiro (T33b). Para *Hepatozoon* em crocodilianos, foram sequenciados dois produtos de PCR com *primers* HEMO1/HEMO2 provenientes de *Caiman crocodilus* de vida livre (JT01) e *Caiman crocodilus* de cativeiro (T16a), e dois produtos de PCR com os *primers* HEPF300/HEP900, provenientes dos mesmos crocodilianos de vida livre e cativeiro. Por último, foram sequenciadas cinco amostras de *Hepatozoon* em serpentes, uma para cada morfologia observada. A amostra sequenciada VL24 refere-se às serpentes que apresentaram gametócitos com a morfologia 1 (M1), todas *Crotalus durissus* vida livre; a amostra VL31 enquadra-se na morfologia 2 (M2), todas *Crotalus durissus* de vida livre também; a amostra Ca11, refere-se a morfologia 3 (M3), cujas serpentes são *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* de cativeiro; a amostra S16 refere-se à morfologia 4 (M4) que são todas *Boa constrictor* cativas; e a amostra Ca6 apresenta gametócitos com características da morfologia 5 (M5), referentes a *Crotalus durissus* cativas.

As duas amostras de testudines sequenciadas se mostraram idênticas pelo alinhamento no “Blastn” foi observado similaridade de 95% com *Haemogregarina sacaliae* (KM887507) com 28 oligonucleotídeos diferentes.

Em relação aos crocodilianos, as sequências obtidas (JT01 e T16a) mostraram-se idênticas e apresentaram similaridade de 99% com *Hepatozoon* sp. em *Caiman crocodilus*

(KJ413113). As sequências e o isolado KJ413113 apresentaram identidade gênica com 17 oligonucleotídeos diferentes.

Das cinco sequências de serpentes obtidas, três (VL24, VL31 e Ca6) mostraram-se idênticas entre si e homólogas à espécie *Hepatozoon musa* (KX880079); uma (Ca11) mostrou ser homóloga à espécie *Hepatozoon cevapii*, disponível no “GenBank” com número de acesso KC342525; e a quinta (S16) também apresentou similaridade com *Hepatozoon cevapii*, cuja identidade gênica é de 99,82%, diferindo em apenas um (1) oligonucleotídeo na posição 391, sendo oligonucleotídeo A no isolado KC342525 e G na sequência do presente estudo.

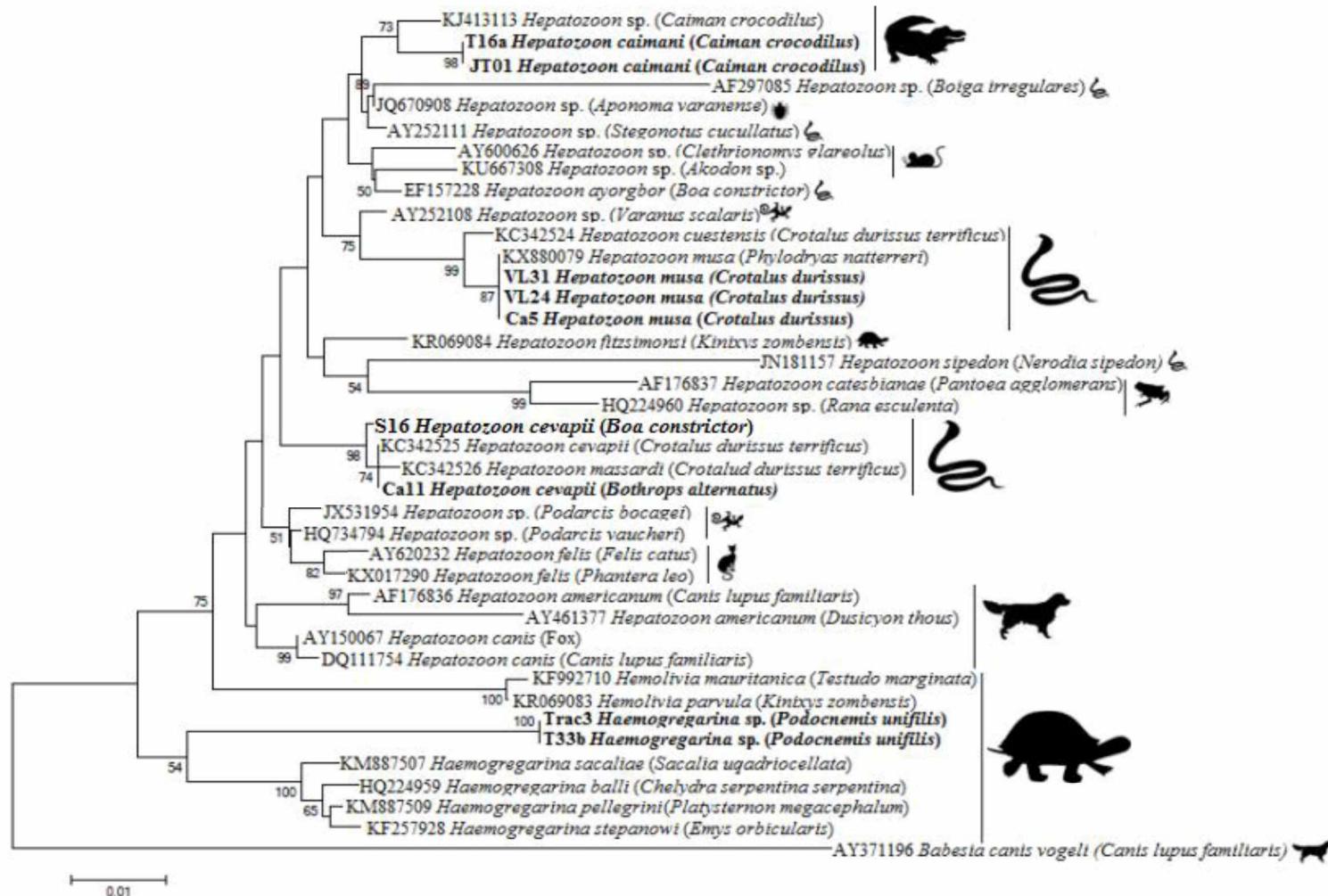


Figura 12: Árvore filogenética baseada no gene 18S rRNA (500pb), demonstrando as relações entre as sequências de *Haemogregarina* em testudines e *Hepatozoon* em serpentes e crocodilianos obtidos neste estudo com sequências disponíveis no “GenBank” através do teste de “Neighbor-Joining”. *Babesia canis vogeli* foi usada como “outgroup”. Números nos nós indicam “Bootstrap” para 1000 réplicas. Valores inferiores a 50 não foram demonstrados. Escala indica a distância evolucionária 0,01 nucleotídeos por posição na sequência. Sequências obtidas nesse estudo estão destacadas em negrito.

Discussão

1. Positividade.

Relatos de parasitos em répteis são comuns na literatura, havendo vasta diversidade de agentes patogênicos. Bactérias, helmintos e protozoários foram descritos em testudines, crocodilianos e serpentes, os quais podem levar a quadros mórbidos ou à morte (PESSOA et al., 1974; LADDS e SIMS, 1990; CATTO, 1991; LADDS et al., 1995; VIANA e MARQUES, 2005; TELFORD, 2009; VIOLA et al., 2009; RODRIGUES, 2011; SOUZA, 2014; FLOSI et al., 2014; SATO et al., 2015).

Nas últimas décadas, o estudo de infecção por protozoários nesses animais tem ganhado destaque em diferentes áreas do conhecimento. Esses parasitos são amplamente utilizados como modelos ecológicos, com crescente constatação de que o parasitismo exerce papel fundamental na estrutura, dinâmica temporal e espacial de populações naturais com ação direta nos processos de competição e estabilidade de ecossistemas (HOLMES e PRICE, 1986; MOLLER e NIELSEN, 2007).

Nesse trabalho, observou-se a presença de hemoparasitos em todas as regiões estudadas. A presença de parasitos sanguíneos em répteis foi descrita por vários autores em diferentes localidades do mundo. A positividade encontrada foi superior às observadas por Nasiri et al. (2014) e Ursula et al. (2014); entretanto, inferior à observada por Viola et al. (2008). Ressalta-se que a maioria dos trabalhos apresentam estudos voltados para somente um grupo de répteis ou um hemoparasito específico.

De acordo com Garcia-Navarro e Pachally (1994), as hemogregarinas são os hemoparasitos mais observados em répteis, sendo os relatos desses autores semelhantes aos desse trabalho, no qual foram observados os gêneros *Haemogregarina* sp. e *Hepatozoon* spp. O gênero *Haemogregarina* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) é comumente observado em testudines aquáticos e tem sido descrito em vários países. Em relação ao gênero *Hepatozoon* em crocodilianos, há trabalhos como de Lainson et al. (1977), Viana e Marques (2005) e Viana et al. (2010) abordando esse parasito em jacarés silvestres.

Nas serpentes analisadas no presente estudo, espécies de *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) foram observadas, sendo esse gênero de hemoparasito relatado na literatura mundial como o hemoparzoário mais comumente observado nesse grupo de répteis. Autores como, Smith (1996), Mathew et al. (2000), Ujvari et al. (2004), Telford (2009), Motta et al. (2011), Moço et al. (2012), O'Dwyer et al. (2013), também observaram esse parasito em serpentes.

Estudos sobre a influência do ambiente de vida em répteis e hemogregarinas vêm sendo relatados por diversos pesquisadores, como Pessoa et al. (1967), Smith (1996), Siroky et al. (2004), Santos et al. (2005), Lopes et al. (2010) e Harris et al. (2015). Animais de vida livre possuem trânsito facilitado em diferentes ambientes, possibilitando o contato frequente com vetores e patógenos. Quando um indivíduo encontra-se parasitado, há imediatamente ação do sistema imunológico para tentar combater esse invasor, na maioria das vezes sem sucesso, pois esses hemoparasitos possuem métodos de evasão imunológica eficientes. Para combater o patógeno, o hospedeiro gasta energia e essa perda energética influencia no comportamento desse animal na natureza, como a caça, a motilidade, o acasalamento, a ovipostura, entre outros, dependendo do grupo pertencente (MOLLER, 1997; THRALL et al., 2007; AMO et al., 2004).

Animais em ambiente cativo podem ser facilmente controlados, não somente em mobilidade, mas em relação ao manejo e as condições de saúde, apresentando, dessa forma, positividade baixa ou nula entre esses animais. Machado (2005) descreve que a manutenção desses animais em cativeiro deve ser considerada como fator importante para a presença ou não de parasito, pois algumas medidas preventivas adotadas podem não ser adequadas. O animal nesse ambiente pode estar sob estresse, promovendo alterações imunológicas e fisiológicas, deixando-o enfraquecido e sem capacidade de controlar e tentar eliminar uma possível parasitose (MADSEN et al., 2005). Devido a isso quadros clínicos podem se agravar e com possibilidade de óbito animal. Portanto, cabe ao estabelecimento e funcionários realizarem exames em todos os animais que chegam ao local, e se necessário, submetê-los a vacinações e medicamentos para combater patógenos (CAMPBELL 1996, MADSEN et al., 2005).

Em relação à positividade em testudines de vida livre, o resultado do presente estudo corrobora com o observado por Jakes et al. (2001), Mihalca et al. (2002) e Davis e Sterrett (2011), os quais relataram 100%, 100% e 88,9% de positividade respectivamente, em várias espécies desse grupo.

Os testudines de vida livre, analisados nesse trabalho, são pertencentes às espécies *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis*. Na literatura mundial, existem seis relatos de *Haemogregarina* spp. nessas espécies de hospedeiros. No Brasil, Picelli et al. (2015) relataram 66% de *Haemogregarina* spp. em *P. expansa*, inferior ao observado no presente estudo (100%); e Soares et al. (2014) relataram 98% de positividade em *P. unifilis*, semelhante ao observado nesse trabalho (96,77%).

Estudos em testudines cativos são escassos e no Brasil existe somente dois relatos na literatura. Pessoa et al. (2016) observaram positividade de 11,11% na Fundação Zoológico de Brasília, semelhante ao encontrado nesse estudo. Picelli et al. (2015) verificaram positividade de 100% em animais procedentes de criatório comercial e nenhuma positividade em criatório indígena, todos no estado de Tocantins.

A relação entre positividade de *Haemogregarina* spp. e o tipo de ambiente de vida foi significativa, sendo os resultados em testudines cativos inferiores aos observados nos de vida livre. Ressalta-se que o período de coleta ocorreu nos meses de julho a agosto dos anos de 2015 e 2016, época de estiagem/seca na região. Esse é o momento de ovipostura das fêmeas nos bancos de areia expostos pela diminuição no volume dos rios, fator que ocasiona aglomeração de indivíduos em locais específicos, possibilitando maior e mais rápida propagação da parasitose nesses indivíduos devido à permuta de hospedeiros pelos vetores (WOZNIAK et al., 1994; OPPLINGER et al., 1996; COUTINHO, 2000; SANDLAND e MINCHELLA, 2003; FACHINI-TERAN et al., 2006). Em testudines cativos, a infecção por *Haemogregarina* sp. pode ser explicada pelo histórico de nascimento e tempo de permanência no local. Alguns nasceram no LAPAS, porém a maioria foi levada para lá. A capacidade que esses parasitos possuem de se manter no hospedeiro por meses a anos encaixa-se nessa situação (SIROKY et al., 2004).

A positividade de 70,68% de *Hepatozoon* sp. em *C. crocodilus* de vida livre, dessa pesquisa, é semelhante aos resultados observados por Viana et al. (2010) e Viana e Marques (2005) no pantanal, e por Lainson (1977) na região amazônica brasileira. Animais de vida livre têm maior área de circulação, estando em contato direto com possíveis vetores e com outros animais, fatores que auxiliam na transmissão dessa parasitose. Vale ressaltar que o período de coleta executado nos meses de julho a agosto de 2015 e de 2016 é conhecido como período de estiagem no Pantanal, o que leva à diminuição gradual das coleções de águas temporária no campo, tais como lagoas e charcos. Com o ambiente aquático reduzido, a tendência são os animais se aglomerarem facilitando o processo de transmissão de patógenos. Além disso, é época de menor disponibilidade de alimento ocasionando, perda de massa corporal e consequente perda de resistência imunológica, tornando-os mais suscetíveis. Todos esses fatores auxiliam na maior e mais rápida propagação da parasitose nesses indivíduos suscetíveis (OPPLINGER et al., 1998; SANDLAND e MINCHELLA, 2003; COUTINHO e CAMPOS, 1996; COUTINHO, 2000).

Em relação à *Hepatozoon* em crocodilianos brasileiros, não existem relatos na literatura para indivíduos cativos com esse parasito, sendo este o primeiro estudo. A positividade

encontrada pode estar relacionada ao histórico dos indivíduos, pois esses crocodilianos não nasceram em ambiente cativo, podendo estar parasitados quando chegaram ao ambiente cativo. Outra possível explicação pode estar associada à alimentação fornecida, pois as rãs poderiam estar previamente infectadas.

As serpentes são os répteis mais estudados por ser grupo difundido em centros de pesquisa, criadouros conservacionistas e zoológicos. Estudos como o de Nasiri et al. (2014) verificaram em serpentes do Irã vasta diversidade parasitária composta por 12 gêneros de parasitos intestinais, cinco gêneros de protozoários intestinais e um gênero de hemoparasito (*Hepatozoon* sp.). Os autores relataram positividade em 23 (26,43%) serpentes para *Hepatozoon* spp., sendo este resultado semelhante ao observado no presente estudo.

Em relação às serpentes cativas, tanto no LAPAS quanto na FUNED, a maioria dos animais foram trazidos para esses locais e neles permaneceram. A presença da infecção por *Hepatozoon* spp. nesses indivíduos pode ser explicada pelos animais estarem parasitados antes de adentrarem em ambiente cativo ou terem se infectado por hospedeiros paratênicos ou artrópodes presentes nesses locais. O cativeiro, por vezes, proporciona condições ideais para transmissão e perpetuação do ciclo dos hemoparasitos. As serpentes cativas do presente estudo recebem como fonte alimentar ratos e camundongos, sendo esses animais considerados na literatura como hospedeiros paratênicos. A transmissão de *Hepatozoon americanum* por esses hospedeiros paratênicos foi comprovada em cães por Johnston et al. (2009). Os autores alimentaram cães com roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* infectados e observaram a existência dessa rota de transmissão, entretanto no Brasil isso não foi comprovado.

Assim como para os outros grupos de répteis, as serpentes de vida livre também apresentaram maior positividade do que as cativas.

Ao se comparar positividade entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas, observou-se, nesse estudo, as peçonhentas foram mais positivas ($p=0,033$). As serpentes podem ser generalistas, alimentando-se de diversos animais como moluscos, anelídeos, artrópodes, anfíbios, répteis e mamíferos ou especialistas (alimentando-se de presas específicas) (MARTINS e OLIVEIRA, 1998).

Não é possível caracterizar ou identificar padrão comportamental que explique a diferença de prevalência observada entre serpentes peçonhentas e não peçonhentas, pois há diversidade comportamental, de “habitat” e alimentar dentro desses grupos. Entretanto, ao analisar as espécies positivas para cada grupo (peçonhento ou não peçonhento) do presente estudo, é possível inferir relações. Dentre as 20 espécies de serpentes não peçonhentas, apenas

uma, *Boa constrictor* (jibóia) de cativeiro, apresentou-se positiva. Esse animal se alimenta de roedores procedentes do biotério da Universidade o qual possui ambiente e saúde dos animais controlados. Uma possível explicação pode estar associada à presença de ectoparasitos, que pode ser fator determinante para infecção de hemogregarinas nessa serpente. A acomodação em cativeiro pode favorecer a reprodução e prevalência dos ectoparasitos, aumentando as chances de infecção (MARTINS e OLIVEIRA, 1998). Entretanto, alguns autores citam que a transmissão de hemogregarinas por vetores invertebrados seja limitada. Outra possibilidade seria a transmissão vertical (SMITH, 1996).

Em relação à influência do sexo na prevalência de hemoparasito, os achados do presente estudo não observou relação. Entretanto, estudos feitos por McCoy et al. (2007) e Readel et al. (2008) mostraram, em testudines, maior positividade em fêmeas adultas. Os autores sugerem que isso ocorre, pois as fêmeas são maiores, em tamanho, do que os machos, possuindo dessa forma maior superfície de contato para aderência e alimentação dos vetores (sanguessugas).

A análise estatística entre positividade e faixa etária dos répteis somente foi significativa para os crocodilianos. O presente estudo observou, também, aumento gradativo da positividade, ou seja, a positividade é diretamente proporcional à faixa etária. Viana et al. (2010) comprovaram que os crocodilianos maiores apresentaram maiores prevalências de hemoparasito. Isso pode estar relacionado à fonte alimentar. Os crocodilianos, diferentemente dos outros répteis, têm vasta diversidade de fonte alimentar que se modifica ao decorrer da vida. A alimentação do filhote é constituída por invertebrados (como insetos e crustáceos), nos jovens a adultos é constituída por peixes, anfíbios e outros répteis (MAGNUSSON et al., 1987; VIANA Eet al., 2012; PREIRA et al., 2014). Com essas informações, sugere-se que a predação de hospedeiros paratênicos, como os anuros e peixes, têm papel importante na transmissão dessa parasitose (VIANA et al., 2010).

2. Análise morfológica e morfométrica das hemogregarinas.

❖ *Haemogregarina* sp. em testudines

Na análise morfológica das amostras sanguíneas de testudines, foram observadas trofozoítos, pré-merontes, merontes primários eritrocíticos, merontes secundários eritrocíticos, microgametócitos e macrogametócitos. A presença de formas evolutivas em diferentes estágios pode estar associada à persistência da infecção nos hospedeiros. Siroky et al. (2004)

relataram positividade de *Hemolivia mauritanica* em *Testudo marginata* por período de 1-8 anos e associaram a persistência da infecção à merogonia cíclica, contínua e duradoura.

Atualmente na literatura existem 27 espécies descritas de *Haemogregarina*, sendo todas em testudines de outros países. No Brasil, poucos relatos e todos, identificaram somente o gênero baseados, principalmente, nas formas evolutivas sanguíneas em testudines. Dentre esses estudos, o desenvolvido por Soares et al. (2014) que executaram caracterização morfológica e morfométrica das formas evolutivas sanguíneas. Entretanto, os autores observaram somente microgametócitos, macrogametócitos e merontes.

Nessa pesquisa observou-se que os trofozoítos de *Haemogregarina* apresentaram 1 único vacúolo citoplasmático em uma das extremidades, diferente do que apresentado por Devoráková et al. (2013), os quais relataram vários vacúolos em um único trofozoíto. Complementar a isso, Telford et al. (2009) relatam presença de núcleo evidenciado, enquanto que Devoráková et al. (2013) observaram em *Haemogregarina stepanowi* núcleo não evidenciado, igual o presente estudo.

As médias morfométricas de comprimento e largura dessa forma nessa pesquisa condizem com das outras espécies de *Haemogregarina* descritas na literatura. Devoráková et al. (2013) relataram essas formas evolutivas de *Haemogregarina stepanowi* em testudines recém-capturados no Marrocos com medidas morfométricas de $9,6 \pm 1,3 \times 5,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$. Em outro trabalho, Devoráková et al. (2015) também em testudines, relataram medidas morfométricas de $7,5 \pm 0,9 \times 2,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ para *Haemogregarina sacaliae*.

Os pré-merontes identificados nesse estudo diferem na morfologia dos citados na literatura. A morfometria foi similar em comprimento, mas diferente em largura dos registros feitos por Dvoráková et al. (2013).

Soares et al. (2014) analisaram a morfologia e a morfometria de merontes eritrocíticos primários (micromerontes) em *P. unifilis* (mesmo testudine analisado nesse estudo) e concluíram presença de 5-10 núcleos, com comprimento e largura de $28,34 \pm 2,28 \times 14,5 \pm 1,0 \mu\text{m}$, respectivamente. Os micromerontes do presente estudo apresentaram medidas morfométricas inferiores, além de possuir 4-7 núcleos.

As análises dos microgametócitos e macrogametócitos foram similares aos de Soares et al. (2014), os quais relataram duas características morfológicas de microgametócitos e duas características morfológicas de macrogametócitos. Deve-se ressaltar, que no presente estudo não se realizou cálculos das medidas do núcleo de uma das formas morfológicas de microgametócio (Micro1), devido à forma indefinida do mesmo.

A partir dessas semelhanças morfológicas e morfométricas observadas entre o presente estudo e o de Soares et al. (2014), pode-se inferir pertencer a mesma espécie de *Haemogregarina*, entretanto os autores só descreveram o gênero.

Merontes eritrocíticos secundários, ou macromerontes, desse trabalho foram semelhantes ao observado por Telford et al. (2009) em testudines aquáticos nos Estados Unidos, havendo pequena diferença no número de núcleos. Assim como observado pelos autores, a principal diferenciação dessas estruturas para os micromerontes é a quantidade de núcleos. Conforme ocorre divisão da cromatina nuclear, pode ser observado até 150 núcleos ou mais, no presente estudo igual ou superior a 50. Neste caso, pode ocorrer ruptura da membrana celular do eritrócito. Entretanto, características morfológicas e morfométricas das outras formas evolutivas relatadas pelos autores, não condizem entre esses dois estudos.

Na literatura há somente dois relatos de macromerontes no sangue de testudines, descritos por Telford et al. (2009) e Koidzumi (1910). Esses autores inferem que a possível explicação para ocorrência dessas estruturas com intensa divisão da cromatina nuclear seja o não sequestro/alojamento dos micromerontes nos órgãos como o fígado e baço, por exemplo, para o início da merogonia; ou a inexistência de merogonia tissular.

Uma possível explicação para presença dessa estrutura (macromerontes) no sangue de testudines do presente estudo pode ser a falha no sequestro de merontes ou a não ocorrência nessa espécie de *Haemogregarina*.

Deve-se ressaltar que o conjunto morfológico e morfométrico das formas evolutivas de *Hemogregarina* em testudines nesse estudo, não foram citadas na literatura.

❖ *Hepatozoon* sp. em crocodilianos

Foi possível observar quatro características morfológicas de gametócitos intraeritrocíticos, em uma mesma amostra (hospedeiro). Segundo Hull e Camin (1960), essas variações morfológicas de gametócitos podem ser uma única espécie com estádios evolutivos distintos, até chegarem à fase madura.

Pelas análises morfológicas e morfométricas dos gametócitos intraeritrocíticos e extraeritrocíticos do presente estudo, comparando-os com os dados de outros autores, juntamente com informações epidemiológicas e foi possível identificar a espécie *Hepatozoon caimani*.

Os gametócitos intraeritrocíticos de *Hepatozoon caimani* observados são semelhantes aos encontrados por Lainson et al. (2003), Viana e Marques (2005), Telford (2009) e Santos (2014).

Em relação aos gametócitos extracelulares, Laison et al. (2003), estudando o desenvolvimento de *Hepatozoon caimani* em *Caiman crocodilus crocodilus* observou morfologia e morfometrias semelhantes ao presente estudo.

Laison et al. (2003) e Santos (2014) relataram dados morfométricos e morfológicos para gametócitos maduros de *Hepatozoon caimani*. Nesses trabalhos, foram relatadas presença de envoltório parasítóforo (cápsula), assim como, deslocamento do núcleo celular para a extremidade do eritrócito. Entretanto, os autores não mencionaram as diferentes características morfológicas existentes nos gametócitos (como presença de vacúolos citoplasmáticos e cromatina nuclear dispersa), calculando a morfometria de forma geral.

Laison et al. (2003) observaram somente uma forma morfológica de gametócito, semelhante aos gametócitos maduros observados nesse estudo, cujas medidas de comprimento e largura para o corpo do hemoparasito formam de 12.15×4.3 (10×3.75 - 13.75×3.75) μm , semelhante ao calculado no presente estudo.

Gametócitos em dobramento, gametócitos com cromatina nuclear dispersa pelo citoplasma e gametócitos com presença de vacúolos citoplasmáticos foram relatados por Lima e Silva (2004), Viana e Marques (2005) e Santos (2014), respectivamente.

Não há registros na literatura de cálculos morfométricos separados por características morfológicas dos gametócitos intraeritrocíticos de *Hepatozoon caimani*, como observado nesse estudo.

❖ *Hepatozoon* spp. em serpentes

Das cinco características morfológicas observadas, a M1 e a M2 estavam presentes em serpentes de vida livre de *C. durissus*. A M2 apresentou vacúolos citoplasmáticos e núcleo com formato e dimensões menores que a M1. Todas as medidas morfométricas de M1 foram superiores às de M2, mas pelos cálculos estatísticos das medidas, não foram observadas diferença significante. Com base nos resultados, existe a probabilidade dos achados da pesquisa serem a mesma espécie, mas com estádios de desenvolvimento gametocítico diferentes. Não há registros dessas morfologias na literatura, bem como as medidas morfométricas dos núcleos.

Os cálculos estatísticos das variações entre M1, M2 e M5 não foram significantes, mesmo M5 apresentando todas as medidas morfométricas do corpo do parasito superiores à M2 e todas as medidas morfométricas do núcleo do parasito inferiores à M1. Vale ressaltar que assim como M1 e M2, as serpentes parasitadas com M5 são da mesma espécie (*Crotalus durissus*), mas cativas. Nesse caso, uma possível explicação seria a ocorrência de modificações morfológicas nos gametócitos de uma mesma espécie de *Hepatozoon* para

melhor adaptação às condições ambientais (vida livre/cativeiro) do hospedeiro (BALL et al., 1970).

A morfologia e medidas morfométricas da M5 condizem com as relatadas por Borges-Najasa et al. (2017), os autores descreveram nova espécie, *Hepatozoon musa*, parasitando serpente brasileira serpente brasileira *Philodryas nattereri* e observaram gametócitos grandes e levemente curvados com núcleos situados na porção mediada. Em relação às medidas do comprimento foram $18,94 \pm 0,95 \mu\text{m}$ ($16,568$ - $20,90 \mu\text{m}$), da largura foram $3,76 \pm 0,33 \mu\text{m}$ ($3,09$ - $4,41 \mu\text{m}$) e da área foram $77,56 \pm 8,55 \mu\text{m}^2$ ($59,71$ - $94,9 \mu\text{m}^2$). Esse achado pode estar relacionado com argumentos de SMITH et al., (1996), onde os autores inferem baixa especificidade de hospedeiros por espécies de *Hepatozoon* em serpentes.

As características morfológicas observadas em M3 e M4 divergem, principalmente, do núcleo: presença de núcleo com formato definido (M3) e núcleo com formato não definido (M4). Entretanto, as medidas morfométricas do corpo do parasito foram semelhantes e não houve diferença significativa entre as variações nas medições. Além disso, as amostras observadas são de serpentes do gênero *Bothrops* (M3) cativas na FUNED e *Boa constrictor* (M4) cativas no LAPAS. Essa semelhança morfometrica e divergência morfológica pode ser explicada por Sloboda et al. (2007), os quais relataram que gametócitos de uma mesma espécie de *Hepatozoon* podem sofrer pequenas mudanças na morfologia para adaptar-se a vários hospedeiros. Outra explicação para esses resultados observados pode ser a mesma espécie, mas com estádios gametocíticos distintos (HULL e CAMIN, 1960).

Moço et al. (2002) havia hipotetizado que através de análises morfológicas e morfométricas era possível diferenciar espécies de *Hepatozoon* em serpentes. Entretanto, isso não foi observado nessa pesquisa, mesmo com informações sobre hospedeiro, ambiente de vida, e características morfológicas e morfométricas dos gametócitos. O'Dwyer et al. (2013) relataram vasta diversidade morfológica e morfométrica de gametócitos desse gênero de hemoparasito em um mesmo indivíduo, com até 5 formas morfológicas distintas, sendo assim, os autores mostram a necessidade de dados moleculares para descrição de espécies de *Hepatozoon* em serpentes.

3. Análise molecular.

No presente estudo, a microscopia óptica convencional, considerada padrão ouro para identificação de hemoparasitos em répteis, foi mais positiva do que a técnica molecular. A reação da PCR constitui instrumento valioso utilizado no diagnóstico de doenças infecciosas

graves, devido à capacidade em detectar as espécies de agentes infecciosos (BRAZ, 2006). Entretanto, os protocolos de execução dependem não apenas das características epidemiológicas das populações estudadas, mas também do volume de sangue coletado, do método para extração de DNA, da escolha das sequências de DNA-alvo e iniciadores, dos reagentes e condições de ciclagem térmica (GILBER, 2007). Todos esses fatores têm impacto direto na eficiência das reações podendo ocasionar essa diferença observada de positividade entre as técnicas.

Os dois pares de oligonucleotídeos utilizados no presente estudo amplificam regiões adjacentes do gene 18S rDNA, o qual é constituído de regiões menos e mais conservadas alternadamente. Consequentemente, a menor variabilidade genotípica em sua estrutura acarreta em menor taxa de substituição de nucleotídeos minimizando erros de ligação com os *primers* na execução da PCR, inferindo maior facilidade e sucesso de amplificação por essa técnica. Na literatura, esse gene foi utilizado para inferir relações filogenéticas, caracterizar gêneros e espécies e redesignar espécies (HERNÁNDEZ et al., 1990; TELFORD et al., 2004 e 2005, MAIA et al., 2011; COOK et al., 2014).

No presente estudo, os *primers* amplificaram, com sucesso, o DNA de hemogregarinas em répteis, sendo possível identificar gêneros e espécies. A eficiência desses *primers* e dessa região gênica vem sendo descrita na literatura por diversos autores, como O'Dwyer et al. (2013). Os pesquisadores compararam os *primers* que amplificam o gene 18S e *primers* que amplificam outros genes (como o ITS-1, 5.8S e ITS-2), todos da região ribossomal, com a finalidade de identificar e caracterizar as espécies de *Hepatozoon* em serpentes e os resultados obtidos apontaram os pares de oligonucleotídeos HepF300/Hep900 e HEMO1/HEMO2 como eficientes.

Telford et al. (2004, 2005), utilizando esses oligonucleotídeos, estabeleceram relações filogenéticas de isolados de hemogregarinas de serpentes da Flórida e descreveram uma nova espécie de *Hepatozoon* parasito de *Cohuber constrictor priapus* e *Thamnophis sauritus sackenii*.

Harris et al. (2011) e Maia et al. (2011) obtiveram sucesso utilizando os *primers* HEPF300/HEP900 e HEMO1/HEMO2 para inferir relações filogenéticas entre *Hepatozoon* spp. em serpentes. Assim como, os pesquisadores Cook et al. (2014) utilizaram esses dois *primers* para redesignar a espécie *Haemogregarina fitzsimonsi* (Diaz, 1953) para *Hepatozoon fitzsimonsi* em tartarugas Sul Africanas.

Embora, na literatura haja somente um relato molecular de *Haemogregarina* em testudines com os *primers* HEMO1/HEMO2, a escolha desses oligonucleotídeos foi devido à

ampla utilização por pesquisadores, ao redor do mundo, no diagnóstico de gêneros de hemogregarinas em outros grupos de répteis, como serpentes e lagartos. A única pesquisa em testudines foi desenvolvida por Pessoa et al. (2016), os quais observaram positividade de 15,15% (15/99) nesses animais do zoológico de Brasília, Distrito Federal. Entretanto, somente executaram a PCR e observaram a positividade para o gênero, sem realizar o sequenciamento.

Não existem sequências depositadas no “GenBank” de espécies de *Haemogregarina* em testudines brasileiros. Há somente quatro disponíveis, *Haemogregarina stepanowi* (DEVORÁKOVÁ et al., 2013), *Haemogregarina pellegrini* (DEVORÁKOVÁ et al., 2015), *Haemogregarina balli* (BARTA et al., 2012) e *Haemogregarina sacaliae* (DEVORÁKOVA et al., 2015), todas descritas em animais de outros países. Sendo assim, essas sequências foram utilizadas na confecção da árvore filogenética e se agruparam no mesmo clado, mas em ramos diferentes das do presente estudo.

Ressalta-se que essas quatro espécies de *Haemogregarina* são procentes do Norte da África, Oriente Médio e Sudeste Asiático, enquanto os isolados do presente estudo são do Estado de Goiás, Brasil. Essas regiões geográficas apresentam condições ambientais e diversidade de fauna diferentes entre si, inferindo em possível evolução por parte do parasito para adaptar-se e expandir-se aos mais diversos “habitat” e hospedeiros. Essas diferenças intragenotípicas podem ser resultantes desse processo de evolução.

A escassez de informações, quando se utiliza somente diagnóstico molecular, torna improvável a identificação de espécies, pois não há parâmetros de achados brasileiros. Sendo assim, mais estudos serão desenvolvidos, como a utilização de *primers* que amplificam sequências maiores do gene 18S, bem como de outros genes de regiões variáveis (mitocondriais, por exemplo) para validação das informações encontradas e para servir de referência em estudos futuros. Complementar a isso, as características morfológicas e morfométricas observadas no presente estudo não foram idênticas àquelas descritas por Barta et al. (2012) e Devoráková et al. (2013/2015), diferindo, principalmente, na morfologia. A partir desses resultados, sugere-se que as sequências desse trabalho pertencem a uma nova espécie do gênero *Haemogregarina*.

No que tange os crocodilianos, existem 28 sequências disponíveis do gênero *Hepatozoon* nesses animais, sendo todas de um único artigo não publicado. Embora não haja descrição molecular de *Hepatozoon caimani*, sabe-se que ela é a única encontrada em crocodilianos brasileiros e o presente estudo a identificou anteriormente através da análise morfológica e morfométrica dos gametócitos. Portanto, a escolha de execução da PCR com os dois pares de *primers*, HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900, foi devido à possibilidade de

uni-los para conseguir uma sequência maior (1400 pares) de um gene conservado (18S rDNA) amplamente utilizado em pesquisas, podendo-se aprofundar estudos mais fidedignos sobre a composição gênica dessa espécie de parasito.

A identidade gênica entre o isolado utilizado na árvore e as sequências do presente estudo foi de 99,25%, além de agruparem-se em um mesmo clado na árvore, o que confirma tratar-se da mesma espécie. O isolado KJ413113 é procedente de *C. crocodilus* de vida livre, localizado no Pantanal Mato-Grossense e os isolados do presente estudo são procedentes de *C. crocodilus* do Bioma Cerrado. Esses dois Biomas apresentam condições ambientais, bem como diversidade faunística diferentes, inferindo possível evolução por parte do parasito para adaptar-se e expandir-se aos mais diversos “habitats” e hospedeiros. Essas diferenças intragenotípicas podem ser ocasionadas como parte desse processo de evolução podendo apresentar semelhança fenotípica, mas diferindo em sua estrutura gênica.

Os principais relatos na literatura sobre técnica molecular (PCR) em répteis são em amostras de lagartos e serpentes para o gênero *Hepatozoon* (PERKINS e KELLER, 2001; MOÇO et al. 2012; O'DWYER et al. 2013; HAKLOVÁ et al., 2013; MAIA et al., 2014, BORGES-NAJASA et al., 2017).

Em serpentes, foi possível identificar duas espécies de *Hepatozoon* depositadas no “GenBank”. As sequências VL31, VL24 e CA6 foram identificadas como *H. musa* (Borges-Najasa et al., 2017), a qual foi descrita em serpentes *P. nattereri*, localizada em Fortaleza (Ceará). A distribuição geográfica dessa serpente abrange regiões áridas e semiáridas como a Caatinga no Nordeste Brasileiro e o Cerrado na região Sudeste Brasileira, como Minas Gerais (UETZ e HOSEK, 2015), sendo esta a mesma região onde ocorre a espécie *C. durissus*. *P. nattereri* se alimenta, principalmente, de pequenos roedores, anfíbios e lagartos (VITT, 1980; MESQUITA et al., 2011), assim como as cascavéis (SWAYA et al., 2003). Essas similaridades de localização na natureza e fonte alimentar podem ter sido os fatores primordiais para a infecção pela mesma espécie de *Hepatozoon*. Além disso, a baixa especificidade de hospedeiro presente nesse gênero de hemoparasito, relatado anteriormente por outros autores, se aplica nessa situação (SMITH, 2009; TELFORD, 2009).

De acordo com as informações disponibilizadas nos resultados, o parasito observado na amostra de serpente Ca11 pertence à espécie *H. cevapii*. Esta foi descrita por O'Dwyer et al. (2013) em *C. durissus* recém-capturadas no estado de São Paulo. Complementar a isso, as sequências Ca11 e S16 agruparam-se em um mesmo clado em posições adjacentes e apresentaram somente um (1) oligonucleotídeo diferente, reforçando tratar-se da mesma espécie, *Hepatozoon cevapii* (O'Dwyer et al., 2013). Essas serpentes do presente estudo são

de espécies e procedencia diferentes, *Bothrops alternatus* e *B. moojeni* cativas na FUNED em Belo Horizonte e *Boa constrictor* cativas no LAPAS em Uberlândia. A transmissão dessa parasitose pode ter ocorrido por diferentes vias, como a ingestão de roedores positivos. Ambos os estabelecimentos fornecem a mesma espécie de camundongo, *Mus musculus*, como alimento para essas serpentes. Outra via de transmissão plausível é por artrópodes infectados aderidos aos roedores (WOZNIAK, 1991).

Em relação à árvore filogenética, foi possível observar agrupamentos de isolados de acordo com regiões geográficas. Em um clado observou-se *H. cevapii* e *H. massardi*, espécies descritas em serpentes brasileiras. Em outro clado, observou-se *H. musa* e *H. cuestensis*, também espécies descritas em serpentes brasileiras. Enquanto que *H. sipedon* (JN181157), espécie descrita no Canadá ficou localizada em um ramo diferente dessas brasileiras, por exemplo. Resultado coerente com a diversidade de vetores e presas disponíveis em cada ambiente, sendo os principais transmissores para cada espécie de *Hepatozoon*, prevalentes em uma região geográfica específica.

Ressalta-se a observação de isolados de diferentes espécies de *Hepatozoon* parasitando hospedeiros semelhantes, localizados em mesmo clado. Como observado em serpentes, onde *Hepatozoon cevapii* e *Hepatozoon massardi* localizaram-se em um mesmo ramo na árvore. Resultado semelhante foi observado entre duas espécies, *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum*, ambas parasitos de canídeos. Esses achados moleculares inferem possível convergência evolutiva na adaptação a um mesmo grupo animal, consequentemente, mesmos padrões fisiológicos e biológicos apresentados por eles.

Os achados morfológicos, morfométricos e moleculares de *Hepatozoon* em serpentes no presente estudo, sugerem que *H. musa* e *H. cevapii* apresentam baixa especificidade de hospedeiros vertebrados e plasticidade morfológica de seus gametócitos. Essa plasticidade morfológica pode ser ocasionada por adaptação aos mais diversos hospedeiros, condições biológicas e ambientais.

A descrição de espécies de hemogregarinas, antigamente, era baseada somente pelo hospedeiro, localização geográfica e morfologia das formas evolutivas sanguíneas. Portanto, durante anos, centenas de espécies foram descritas erroneamente na literatura em todo o mundo. Ainda não se conhece a diversidade das espécies de hemogregarinas que acometem répteis. Achados de novas espécies e estudos do comportamento dessas, frente ao hospedeiro e ao ambiente são importantes, não somente para entender a ação direta dos patógenos sobre o indivíduo, mas também devido à possibilidade de serem importantes na saúde pública. A utilização conjunta de investigações epidemiológicas e de técnicas de diagnóstico

morfológicos, morfométricos e moleculares devem ser introduzidas como ferramenta fundamental desse entendimento.

Conclusão

- Dentre as hemogregarinas, foram observados os gêneros *Haemogregarina* em testudines e *Hepatozoon* em crocodilianos e serpentes;
- Pela análise morfológica e morfométrica, das formas evolutivas sanguíneas em testudines, foi possível descrever nova espécie de *Haemogregarina*.
- A análise pelas técnicas morfológicas e morfométricas, dos gametócitos intraeritrocíticos e extraeritrocíticos, foi eficiente em identificar a espécie *Hepatozoon caimani* em crocodilianos.
- Verificou-se diversidade morfológica e morfométrica de gametócitos de *Hepatozoon* spp. em serpentes.
- As espécies *Hepatozoon cevapii* e *Hepatozoon musa* foram identificadas em serpentes através da PCR.
- Animais em ambiente de vida livre são mais acometidos por hemoparasitos que animais cativos;
- O sexo dos répteis não influenciou na parasitose, entretanto a faixa etária em crocodilianos está relacionada com a positividade para esses parasitos;
- Ser peçonhenta influenciou na positividade em serpentes;
- A utilização conjunta das técnicas morfológicas, morfométricas e moleculares mostraram-se eficientes no diagnóstico de hemogregarinas em répteis.

Referências Bibliográficas

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON O. R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W.; TAYLOR, M. F. The new higher level classification of Eucaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v.52, n.5, p.399-451, 2005.

ALBUQUERQUE, N. R.; GALATTI, U.; DI-BERNARDO, M. Diet and feeding behaviour of the Neotropical parrot snake (*Leptophis ahaetulla*) in northern Brazil. **Journal of Natural History**, v.41, n.17, p. 1237-1243, 2007.

ALTIZER, S. M., OBERHAUSER, K. S., BROWER, L. P. Associations between host migration and the prevalence of a protozoan parasite in natural populations of adult monarch butterflies. **Ecological Entomology**, v.25, [n.?], p.125-139, 2000.

AMO, L.; LOPES, P.; MARTIN, J. Prevalence and intensity of hemogregarinid blood parasites in a population of the Iberian rock lizard, *Lacerda monticola*. **Parasitology Research**, v.94, [n?], p.290-293, 2004.

ANDERSON, R. C.; BENNETT, G. F.; OKIA, N. O.; ASHFORD, R.W., CAMPBELL, A.G. Avian Haemoproteidae. II. *Haemoproteus emuculator* sp. n. from the Kingfisher, *Ispidina picta* (Boddaert). **Journal of Parasitology**, v.58, n.6, p.1143-1147, 1972.

ANDERSON, R. M., MAY R. M. Population biology of infectious diseases. **Nature**, v.280, n.5721, p.361-367, 1979.

ARANTES, J. B. *Haemogregarina cyclagrasi* n. sp. parasita de serpente *Cyclagras gigas* (Duméril e Bibron, 1854). **Revista de Biologia e Hygiene**, v.5, p.9, 1934.

ARAÚJO, M. E.; SANTOS, A. C. M. C. A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.6, p.517-519, 1997.

ARAÚJO, T.; MORO, L.; LÚCIA, M.; GOLLOUBEFF, B.; VASCONCÉLOS, A. C. Ocorrência de alguns endo e ectoparasitos no serpentário da UNIFENA- Universidade de Alfenas-MG. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.36 n.1, p. 1413-9596, 1999.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTA LÚCIA, M; CABRAL, R. F. Epidemiology of accidents by venomous animals. In: Cardoso, J.L.C.; França O.S.F.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad

Jr, V. (Orgs). Venomous animals in Brazil: biology, clinical and therapeutic of accidents. Sarvier, p. 6-12. 2003.

AYALA, S. C.; LEE, D. Saurian malária: development of sporozoites in two species of phlebotomine sandflies. *Science*, v.167, n.3919, p.891-892, 1970

BALL, H. G. Some Blood Sporozoans from East African Reptiles. *Journal of protozoology*, v.14, n.2, p.198-210, 1967.

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

BALL, H. G. Haemogregarine life cycles. *Journal of Parasitology*, v.56, p.17, 1970.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Portaria nº 142/N/92 - **Controle das transações comerciais das espécies: Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) e Tracajá (*Podocnemis unifilis*)**. 30 de dezembro de 1992.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Introdução Normativa nº169 de 20 de fevereiro de 2008. **Categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro**. 2008.

BASHAR, A. R.; ABDEL-GHAFFAR, F. A.; SHAZLY, M. A. Life cycle of *Hepatozoon mehlhorni* sp. nov. in the viper *Echis carinatus* and the mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, v.77, n.5, p.402-410. 1991.

BERNARDE, P. S.; ABE, A. S. A snake community at Espigão do Oeste, Rondônia, Southwestern Amazon, Brazil. *South American Journal of Herpetology*, v.1, n.2, p.102-13, 2006.

BERNARDE, P. S. **Anfíbios e Répteis - Introdução ao estudo da herpetofauna brasileira**. Curitiba: Anolis Books, 2012.

BÉRNILS, R. S.; H. C. COSTA (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies**. Versão 2012.1. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 28 jan. 2017.

BIASI, N. G.; FERREIRA, D. F. Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de K populações independentes. **Revista Brasileira de Biometria**, v.27, n.3, p.301-323, 2009.

BOER, P.; HOOGENBOOM, J. O.; GIEPMANS, B. N. G. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! **Nature methods**, v.12, n.6, p.503-511, 2015.

BORGES-NOJOSA, D. M.; BORGES-LEITE, M. J.; MAIA, J. P.; ZANCHI-SILVA, D.; BRAGA, R. R.; HARRIS, D. J. A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindacher (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. **Systematic Parasitology**, v.94, n.4, p.65-72.2017.

BORNER, C. Untersuchungen über Hemosporidien I. Ein Beitrag zur Kenntniss des Genus Haemogregarina Danilewsky. **Zeitschrift für wissenschaftliche**, v.69, [n?], p.398-416. 1910.

BORTEIRO, C.; GUTIÉRREZ, F.; TEDROS, M.; KOLENC, F. Food habits of the Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae), in northwestern Uruguay. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.44, n.1, p.31-36, 2009.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology. In: MADER D.R. (Ed.), **Reptile Medicine and Surgery**, p. 248-257, 1996.

CAMPOS-BRITES, V.; TANTIN, F. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of Uberabinha River. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.96, n.1-3, p.273-281, 2004.

CARINI, A. Sur une *Haemogregarine* du *Caiman latirostris* Daud. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v.2, [n?], p.471-472. 1909.

CARINI, A. Sobre uma hemogregarina da *Phylodrias schotti* Schleg. **Revista de Medicina de São Paulo**, v.23, p.339-340, 1910.

CARINI, A. Contribuição ao estudo de hemogregarinas de serpentes da família boideos. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v.279, 1947.

CARMO, F. F. **Importância Ambiental e Estado de Conservação dos Ecossistemas de Cangas no Quadrilátero Ferrífero e Proposta de áreas-alvo para a Investigação e Proteção da Biodiversidade em Minas Gerais**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ecologia).

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

CATTO, J. B. **Taxonomia e ecologia dos helmintos parasitos de Caiman crocodilus yacare (Crocodylia: Alligatoridae) no Pantanal Mato-Grossense**. 2001. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

CAUDELL, J.N.; WHITTIER, J.; CONOVER, M.R. The effects of haemogregarine- like parasites on brown tree snakes (*Boiga irregularis*) and slatey-grey snakes (*Stegonotus cucullatus*) in Queensland, Australia. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.49, p. 113-9, 2002.

CAVALCANTI, R. B; JOLY, C. A. Biodiversity and Conservation Priorities in the Cerrado Region. In: Oliveira, P. S.; Marquis, R. J. (Ed.). The Cerrados of Brazil. Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna. **Columbia University Press**, p.351-367, 2002.

CHATTON, E. P. L.; ROUBAUD, E. Sporogonie dune hémogregarine chez une tsetse (*Glossina palpalis* R. Desv.) **Bullerin de la Société de pathologie exotique**, v.6, p.226-233. 1913.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. **Lista brasileira de répteis**. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2015. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/index.php/repteis>. Acesso em: 23 jan.2017.

COOK, C. A. **Conservation of South African Tortoises with emphasis on their apicomplexan haematozoans, as well as biological and metal-fingerprinting of captive individual**. Ph.D Dissertation, Faculty of Science, University of Johannesburg, 2012.

COOK, C. A.; LAWTON, S. P.; DAVIES, A. J.; SMIT, N. J. Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasites morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. **Parasitology**, v.141, [n?], p.1611-1620, 2014.

COUTINHO, M. E.; CAMPOS, Z. Effect of habitat and seasonality on the densities of caiman in Southern Pantanal, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v.12, n.5, p.741-747, 1996.

COUTINHO, M. E. **Population ecology and the conservation and management of Caiman yacare in the Pantanal, Brazil**. Ph.D Dissertation, University of Queensland, Brisbane, Australia, p.222, 2000.

DANILEWSKII, V.I. Recherches sur la parasitologie du sang. Les Hematozoaires des lézards (avec 2 planches). **Archives slaves de Biologie**, v. 1, p.364-396, 1886.

DA SILVEIRA R.; MAGNUSSON, W. E.; CAMPOS, Z. Monitoring distribution, abundance and breeding areas of *Caiman crocodilus crocodilus* and *Melanosuchus niger* in the Anavilhas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. **Journal of Herpetology**, v. 31, n.4, p. 514-520, 1997.

DA SILVEIRA, R. Conservação e manejo de jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) na Amazônia brasileira. 61-78 In: Verdade, L. M.; Larriera, A. (Ed.). Conservação e manejo de jacarés e crocodilianos da América Latina. Piracicaba: Editora C. N., 2002.

DAVIES, A. J.; JOHNSTON, M. R. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibian and reptiles. **Advances in Parasitology**, v.45, [n?], p.1-107, 2000.

DAVIES, A. J.; SMITH, N. J.; HAYES, P. M.; SEDDON, A. M.; WERTHEIM, D. *Haemogregarina bigemina* (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) – past, presente and future. **Folia Parasitologica**, v.51, n.2-3, p.99-108, 2004.

DAVIS, A. K.; STERRETT, S. Prevalence of haemogregarine parasites in three freshwater turtles species in a population of northeast Georgia, Florida, USA. **International Journal of Zoology Research**, v.7, n.2, p.156-163, 2011.

DE BIASI, P. et al. Presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) –Coccidia, Haemogregarinidae-em exemplar de *Bothrops jararaca* (Wied, 1984)-Serpentes, Viperidae, Crotalinae-mantido em cativeiro. **Memórias do Instituto Butantan**, v.55, p.1-107, 1989.

DE BIASI, P.; PESSOA, S. B.; BELLUOMINI, H. E. Nota sobre a transmissão congênita de hemogregarinas em duas espécies de serpentes peçonhentas vivíparas. **Altas da Sociedade Brasileira de Biologia do Rio de Janeiro**, v.15, p.27-28, 1971.

DE BIASI, P.; PESSÔA, S. B.; BELLUOMINI, H. E. Novas observações sobre transmissão congênita de hemoprotzoários de serpentes peçonhentas vivíparas. **Memórias do Instituto Butantan**, v.36, p.245-249, 1972.

DESSER, S. S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: Parasitic Protozoa, v.4, Levine (Ed.) Academic Press, p.247-272, 1993.

DEVORÁKOVÁ, N.; KVÍCEROVÁ, J. PAPOUSEK, I.; JAVANV-BAKHT, H.; TIAR, G.; KAMI, H.; SIROKÝ, O. Haemomogregarines from western Palearctic fresh turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are coespecific with *Haemogregarina stepanowi* Denilewsky, 1885. **Parasitology**, v.141, n.4, p.522-530, 2013.

DEVORÁKOVÁ, N.; KVÍCEROVÁ, J.; HOSTOVSKÝ, M.; SIOKÝ, P. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. **Parasitology**, v.142, n.6, 816-826, 2015.

EISEN, R. J.; SCHALL, J. J. Life history of malaria parasite (*Plasmodium mexicanum*): independent traits and basis variation. **Proceedings of The Royal Society Biological Sciences**, v.267, n.1445, p.793-799, 2000.

ERNEST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989.

FACHIN-TERAN, A.; VOGT, R. C.; THORBJARNARSON, J. Seasonal movements of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines: Podocnemidae) in the Mamirauá Sustainable Development Reserve, Amazonas, Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v.5, n.1, p.18-24, 2006

FALLON, S. M.; RICKLEFS, R. E.; SWASON, B. L.; BERMINGHAM, E. Detecting Avian Malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. **Journal of Parasitology**, v.89, n.5, p.1044-1047, 2003.

FRANCISCO, L. R. **Répteis no Brasil: Manutenção em Cativeiro**. São José dos Pinhais: Editora Amaro, 1997.

FEIO, R. N.; CARAMASCHI, U. Contribuição ao conhecimento da herpetofauna do nordeste do estado de Minas Gerais, Brasil. **Phyllomedusa**, v.1, n.2, p.105-111, 2002.

FERMINO, B.R.; VIOLA, L. B.; PAIVA, F.; GARCIA, H.A.; DEPAULA, C. D; BOTERO-ARIAS, R.; TAKATA, C.S.; CAMPANER, M.; HAMILTON, P. B.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. **Parasites and vectors**, v.6, n.303, p.1-14, 2013.

FLOSI, F. M.; GARCIA, J. M.; PUGLIESE, C.; SANCHEZ, A. A.; KLAIB, A. Management and disease of brazilian chelonians in urban captivity. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária**, v.4, N.2, p.65-72, 2001.

GARCIA-NAVARRO, C. E.; PACHALY, J. R. (Eds). **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, p.169, 1994.

GLASER, V.; BONI, A. P.; ALBUQUERQUE. Ocorrência de *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes do gênero *Bothrops* de cativeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1288-1290, 2008.

GREGO, K. F.; ALVES, J. A. S.; RAMEH DE ALBUQUERQUE, L. C.; FERNANDES, W. Referências hematológicas de para jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém-capturadas na natureza. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58 n.6, 2006.

GOOMBRIDGE, B. The distribution and status of world's crocodilians. In: Wildlife management: Crocodiles and alligators. WEEB, G., J., W.; MANOLIS, S. C.; WHITEGEAD, P. J (Eds.) Austrália: Surrey Beatty and Sons Pty, 1987.

GONDIM, P. M.; BORGES-NOJOSA, D. M.; BORGES-LEITE, M. J.; ALBANO, C. G. *Boa constrictor* diet. **Herpetology Review**, v.43, n.4, p. 654-655, 2012.

HAKLOVÁ, B; MAJLÁTHOVÁ, V.; MAJÁTH, I.; HARRIS, D. J.; PETRILLA, V. LITSCHKA-KOEN, T.; OROS, M.; PETKO, B. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* blood parasites found in snakes from Africa, America and Asia. **Parasitology**, v.141, n.3, p.389-398, 2013.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, [n?], p. 95-98, 1999.

HARRIS, D. J.; MAIA, J. P. M. C.; PEREIRA, A. Molecular Characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. **Journal of Parasitology**, v.97, n.1, p.106-110.2011.

HARRIS, D. J.; BORGES-NOJOSA, D. M.; MAIA, J. P. Prevalence and Diversity of *Hepatozoon* in native and exotic geckos from Brazil, **Journal of Parasitology**. v.101, n.1, p.80-85, 2015.

HERNANDEZ, L. M.; BALLOU, L.; BALLOU, C. E. Separation of yeast asparagine-linked oligosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography. **Carbohydrate Research**, v.203, n.1, p.1-11, 1990.

HOARE, C. A. On protozoal blood parasites collected in Uganda. With an account of the life cycle of the crocodile haemogregarine. **Parasitology**, v.24, n.2, p.210-224. 1932.

HOGUE, A. R.; ROMANO, S. A. R. W. L. Neotropical pit vipers, sea snake, and coral snakes. In: BUCHERI, W.; BUCKLEY, E. (Eds.) *Venomous Animals and their Venoms*. New York: New York Academic Press, v.2, 1971.

HOLMES, J. C.; PRICE P. Communities of parasites 187-213. In: ANDERSON, D. J., KIKKAWA, J. (Eds.). Community ecology: patterns and processes. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.

HULL, R. W.; CAMIN, J. H. Haemogregarines in snakes: the incidence and identity of the erythrocytic stages. **Journal of Parasitology**, v.46, n.4, p.515-523, 1960.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Monitoramento do desmatamento no Bioma Cerrado, 2002-2008: Dados Revisados. Acordo de Cooperação Técnica MMA/IBAMA/NUD. Centro de Sensoriamento Remoto-CSR/IBAMA. Brasília. 2009. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/arquivos/relatorio_tecnico_monitoramento_desmate_bioma_pampa_72.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rDNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v.106, n.3, p.256-271, 2002.

JAKES, K. A.; O'DONOOGHUE, P. J.; WHITTHIER, J. Ultrastructure of *Hepatozoon boigae* (Mackerras, 1961) nov. comb. From brown tree snakes, *Boiga irregularis*, from northern Australia. **Parasitology Research**, v. 90, n.3, p. 225-231, 2003.

JOHNSON, E. M.; PANCIERA, R. J.; SHEETS, M. E.; BEAL, J. D.; EWING, S. A.; LITTLE, S. E. Alternative pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the Epidemiologic Importance of Predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.6, p.1315-1318, 2009.

KARESHI, W. B.; COOK, R. A.; BENNETT, E. L.; NEWCOMB, J. Wildfile trade and global disease emergence. **Emerging Infectious Disease Journal**. v.11, n.7, p.1000-1002, 2005.

KHAN, R. A.; FORRESTER, D. J.; GOODWI, T. M.; ROSS, C. A. A haemogregarine from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). **Journal of Parasitology**, v.66, n.2, p.324-328, 1980.

KING, F., W.; BURKE, R. L. **Crocodilian, Tuatara and Turtle Species of the World: A taxonomic and Geographic Reference**. Washigton: Association of Systematics Collections, 216 p.1989.

KOIDZUMI, M. On the development of Haemogregarina sp. parasitic in common Japonese tortoise, *Clemmys japonica*. **Archiv fur Protistenkunde**, v.18, p.260-274, 1910.

LADDS, P. W.; SIMS, L. D. Diseases of young captive crocodiles in Papua New Guinea. **Australian Veterinary Journal**, v.67, n.1, p.323-330, 1990.

LADDS, P. W.; MANGUNEIRJO, H.; SEBAYANG, D.; DANIELS, P. W. Diseases in young farmed crocodiles in Irian Jaya. **The Veterinary Record**, v.136, n.5, p.121-124, 1995.

LAFERTY, K.D., MORRIS, K. Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final hosts. **Ecology**, v.77, n.5, p.1390-1397, 1996.

LANDAU , I.; MICHEL, J. C.; CHABAUD, A. G., BRYGOO, E. R. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de coccidie. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.38, [n?], p.250-270. 1972.

LAINSON, R. *Trypanosoma cecili* n. sp., a parasite of the South American cayman *Caiman crocodilus crocodilus* (Linnaeus, 1758) (Crocodilia: Alligatoridae). In: Canning, E.U. Protozoology. Clunbury Cottrell Press, v.3, p. 87-93, 1977.

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

LEVINE, N. D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1988.

LAVERAN, C. L. A.; PETTIT, A. Contribution À l'étude des Hémogregarines de *Lacerta ocellata* Daub. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v.2, p.295-298, 1909.

LOPES, F. C.; AZEVEDO, S. S.; DANTAS, L. A. B.; FREITAS, C. I. A.; BATISTA, C. S. A.; AZEVEDO, A. S. Ocorrência de *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes captive *Boa constrictor* mantidas em cativeiro no semi-árido do estado de Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1285-1287, 2010.

LOWICK, A.; YAEGER, R. G. Ecological aspects of snake heogregarine infections from two habitats in Southeastern Louisiana. **Journal of Parasitology**, v.73, n.3, p.1109-1115. 1987, 2011.

LUZ, M. A.; MENESES, A. M. C.; MORAES, C. G. M.; SEIXAS, L.; LIMA, D. J. S.; RIFFEIL, A. A. S.; CASTRO, P. H. G.; COSTA, A. M. Determinação de hemogregarina em *Boa constrictor constrictor* mantidos em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.8, p. 2-5, 2012.

MACIEL, F. R.; LOGATO, P. V. R., FILHO, E. T.; ALEIXO, V; M. Coeficiente de digestibilidade aparente de cinco fontes energéticas para o jacaré do pantanal (*Caiman yacare*, Daulin, 1802). **Ciência Agrotécnica**, v. 27, n.3, p.675-680, 2003.

MADSEN, T.; UJVARI, B.; OLSSON, M. Old phytos stay fit: effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. **Oecologia**, v.142, p.407-712. 2005.

MAGNUSSON, W. E.; SILVA, E. V.; LIMA, A. P. Diets of amazonian crocodilians. **Journal of Herpetology**, v.21, n.2, p.85-95, 1987.

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

MAKSIMOWICH, D. S., MATHIS, A. Parasitized salamanders are inferior competitors for territories and food resources. **Ethology**, v.106, n.4, p.319-329, 2000.

MALVASIO, A. M.; MOLINA, F. B.; SAMPAIO, F. A. Comportamento e preferência alimentar em *Podocnemis expansa* (Schweigger), *P. unifilis* (Troschel) e *P. sextuberculata* (Cornalia) em cativeiro (Testudines, Pelomedusidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 1995, p. 161-168, 2003.

MALVASIO, A.; MOLINA, F. B.; SAMPAIO, F. A. Influência da manipulação dos ovos no sucesso das eclosões e no padrão normal de escutelações dos cascos em *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) e *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Pelomedusidae). **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil**, v. 8, n.9, p. 39-52, 2005.

MANGOLD, K. A.; MANSON, U.; KOAY, E. S. C.; STEPHEN, M.; THOMSON, R. B.; PETERSON, L. R.; KAUL, K. L. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 5, p.2435-2440, 2005.

MARCON, J. L.; SILVA, M. G.; BATISTA, G. S. Fisiologia e bioquímica de quelônios e suas implicações para o manejo e criação em cativeiro. In: ANDRADE, P. C. M. (Ed.). Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas. Manaus: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, p. 193-221, 2008.

MARQUES, O. A. V., ETEROVIC, A.; SAZIMA, I. **Serpentes da Mata Atlântica. Guia ilustrado para a Serra do Mar.** Ribeirão Preto: Holos, 2001.

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

MARTINS, M.; OLIVEIRA, M. E. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. **Herpetological Natural History**, v.6, n.2, p.1-89, 1998

MCALLISTER, C. T.; KING, A. W. Hemogregarines in the red-eared slider. *Chrysemys scripta elegans* (Wied) from Arkansas. **Procariotic Arkansas Academy of Science**, v.34, p.124, 1980.

MCCALLUM, H., DOBSON, A., 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. **Tree**, v.10, n.5, p.190-194.

MCAULIFFE, JR. Na hipótese explicando variações de haemogregarine parasitemia em diferentes espécies de tartarugas aquáticas. **The Journal of Parasitology**, v.63, n.3, p.580-581, 1977.

MCCOT, J. C.; FAILEY, E. L.; PRICE, S. J.; DORCAS, M. E. An assessment of leech parasitism on semi-aquatic turtles in the western piedmont of North Carolina. **Southeastern Naturalist**, v.6, n.2, p.191–202, 2007.

MELLO, E. M. **Endo e ectoparasitos de serpentes *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758 (Viperidae) de algumas localidades de Minas Gerais**. 2003. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo, 2003.

MESQUITA, P. C. M. D.; BORGES-NOJOSA, D. M.; PASSOS, D. C.; BEZERRA, C. H. Ecology of *Philodryas nattereri* (Serpentes: Dipsadidae) in the Brazilian semi-arid region. **Herpetological Journal**, v.21, n.8, p.193-198. 2011.

MIHALCA, A. D.; ACHELARITEI, D.; POPESCU, P. Hemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Dragasani, Vâlcea country, Romania. **Science of Parasitology**, v.2, n.2, p.22-27, 2002.

MIHALCA, A. D.; TACKA, K.; GHERMAN, C.; LONESCU, D. T. Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles Romania. **Parasitology Research**, v.102, n.5, p.1081-1083. 2008.

MOÇO, T. C.; O'DWYER, L. H.; BARRELLA, T. H.; TROMBETA, A. M.; CAMPAGNER, M.; GARZZESI, B.; TITTON, JR, B.; LEAL, D. D. M. Prevalência de infecção por *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes brasileiras recém capturadas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLÓGICOS DO BRASIL, 31. CONGRESSO DA

ASSOCIAÇÃO LATINO AMERICANA DE PARQUES ZOOLÓGICOS E AQUÁRIOS, 14., ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS DE ANIMAIS SELVAGENS, 16, 2007, São Paulo. **Anais...**São Paulo: São Paulo, 2007.

MOÇO, T. C.; SILVA, R. J.; MADEIRA, N. G.; PADUAN, K. S.; RUBINI, A. S.; MENEZES, D. D.; LEAL, D. D. M.; O'DWYER, L. H. Morphological, morphometric, and molecular characterization of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisona durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitology Research**, v.110, n.4, p.1393-1401, 2012.

MOLLER, A.P . Parasitism and the evolution of host life history. In: Clayton D.H., Moore J. (eds) Host-parasite evolution: general principles and avian models. Oxford University Press, p.105–127, 1997.

MOLLER, A. P., NIELSEN, J. T. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. **Ecology**, v.88, n.4, p.871-81, 2007.

MOLNAR, R. E. Biogeography and Phylogeny of Crocodylia. In: ROSS, G. C.; BEESLEY, G. J. B. (Eds). Fauna of Australia Amphibia and Reptilia. Canberra: Australian Government Publishing Service, p. 1-11, 1993.

MOTTA, R. C. O.; CUNHA, L. M.; LEITE, R. C.; SILVA, I. J.; PINTO, C. A.; BRAGA, E. M.; CUNHA, A. P.; OLIVEIRA, P. R. *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) infection and selected hematological values of the neotropical rattlesnakes, *Crotalus durissus collilineatus* (Linneaus, 1758) (Serpentes: Viperidae), from Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.42, n.3, p.399-407, 2011.

NASIRI, V.; MOBEDI, I.; DALIMI, A.; MIRAKABADI, A. Z.; GHAFFARIFAR, F.; TEYMURZADEH, S; KARIMI, G.; ABDOLI, A.; PAYKARI, H. A description of parasites from Iranian snakes. **Experimental Parasitology**, v.147, p.7-15, 2014.

NICKERSON, M. A.; HENDERSON, R. W. A case of envenomation by South American colubrid, *Philodryas olfersii*. **Herpetologica**, v. 32, n.4, p.197-198, 1976.

NOONAN, B. P.; CHIPPINDALE, P. T. Dispersal and vicariance: The complex evolutionary history of boid snakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.40, n.2, p.347-358, 2006.

O'DWYER, L. H.; MOÇO, T. C.; BARRELLA, T. H.; VILELA, F. C.; SILVA, R. J. Prevalência de *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes recém-capturadas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, 2003.

O'DWYER, L. H; MOÇO, T. C.; SILVA, R. J. Description of the gamonts of a small species of the *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Viperidae). **Parasitology Research**, v.92, n.2, p.111-112, 2004.

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

O'DWYER, L. H.; MOÇO, T. C.; PADUAN, K. S.; SPENASSATTO, C.; SILVA, R. J.; RIBOLLA, P. E. M. Description of three new species of Hepatozoon (Apicomplexa: Hepatozoidae), from Rattlesnakes (*Crotallus durrissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. **Experimental Parasitology**, v.135, p.200-207. 2013.

OLSSON, M.; WAPSTRA, E.; MADSEN, T.; UJVARI, B.; RUGFELT, C. Costly parasite resistance: a genotype-dependent handicap in sand lizards? **Biology Letters**, v.1, p.375-377, 2005.

OPPLINGER A.; CÉLERIER, M. L.; CLOBERT, J. Physiological and behavior changes in common lizards parasitized by haemogregarines. **Parasitology**, v.113, n.5, p.433-438, 1996.

OPPLINGER, A.; CLOBERT, J.; LECOMTE, J.; LORENZON, P.; BOUDJEMADI, K.; JOHN-ALDER, H. B. Environmental stress increases the prevalence and intensity of blood patasite infection in the commom lizard *Lacerta vivipara*. **Ecology Letters**, v.1, n.6, p.129-138, 1998.

PATERSON, W. B.; DESSER, S. S. Observations of *Haemogregarina balli* sp. n. from the common snapping turtle, *Chelydra serpentine*. **Journal of Protozoology**, v.23, n.2, p.73-80, 1988.

PATZ, J. A. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environmental Health Perspectives**, v.112, n.10, p.1092-1098, 2000.

PEREIRA, G. R.; SOARES, P.; GOMES, M. Q., VIANA, L. A.; MANSO, P. P. A.; PAIVA, P.; OLIVEIRA, L. R. Are fish oaratic natural hosts os the caiman haemoparasite *Hepatozoon caimani*? **Parasitology Research**, v.13, n.1, p.351-354. 2014.

PEIRCE, M. A.; ADLARD, R. D. Haemoparasites from clinical screening of reptiles in South-East Queensland, Australia. **Veterinary Record**, v.155, n.22, p.708-709. 2004.

PERKINS, S. L.; MARTIN, J. M. Conserved oligonucleotídeos fail in the diagnosis of parasitic infection. **Journal of Parasitology**. v.85, n.5, p.982-984, 1999.

PERKINS, S. L.; KELLER, A. K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotideos. **Journal of Parasitology**, v. 87,n.4, p. 870-876, 2001.

PESSOA, S. B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras, hemogregarinas em cascavel. **Revista Brasileira de Biologia**, v.27, p.381-384, 1967.

PESSOA, S. B.; SACCHETTA, L.; CAVALHEIRO, J. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras – Hemogregarinas de *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v.12, p.197-200, 1970.

PESSOA, S. B.; BELLUOMINI, H. E.; SOUZA, D. M. Notas sobre hemogregarinas em serpentes brasileiras xiv- Esporogonia da hemogregarina dea *Bothrops moojeni* Hoje, 1965 no *Culex (Culex) dolosus* (L. Arribálzaga, 1891). **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 38, n.4, p.253-258, 1971.

PESSOA, S. B.; DE BIASI, P. Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa: Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. **Memórias do Instituto Butantan**, v.37, p.291-298. 1973.

PESSOA, L. M. B.; SCALON, M. C.; CARNEIRO, F. T.; LOTA, M. G. M; SILVA, T. F.; MONTEIRO, R. V.; PALUDO, G. R. Ocorrência de hemogregarina em duas espécies de cágados brasileiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, [n?], p.1381, 2016.

PETERSON, W.B.; DESSER, S.S. Observations of *Haemogregarina balli* sp. n. from commom snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **Journal of Parasitology**, v. 23, n.3, p.294-301, 1976.

PHISALIX, M.; LAVERAN, A. Sur une hémogrégarine nouvelle de *Lachesis alternates*. **Bulletin de la Société de pahologie exotique**, v.6, p.330-332, 1913.

PHISALIX, M. Les hémogrégarines de *Crotalus terrificus* Lau. **Bulletin de la Société de pahologie exotique**, v.24, p.190-194. 1931.

PIAIA, I. I. **Geografia do Mato Grosso**. 3º Ed. Edunic. 1997.

PICELLI, A. M.; CARVALHO, A. V.; VIANA, L. A.; MALVASIO, A. Prevalence and parasitemia of *Haemogregarina* sp. in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae)

form the Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Veterinarian Parasitology**, v.42, n.2, p.191-197. 2015.

PINCHEIRA-DANOSO, D.; BOUER A. M.; MEIERI S.; UETZ, P. Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles. **Plos One**, v.8, n.3, 2013.

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. The turtles of Venezuela. **Society for the Study of Amphibians and Reptiles**, Oxford, Ohio, p. 414, 1984.

PIZZATO, L. **Ecomorfologia e estratégias reprodutivas nos Biodae (Serpentes), com ênfase nas espécies Neotropicais**. Tese (Doutorado), Faculdade de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

PORTELINHA, T. C. G.; MALVASIO, A.; PIÑA, C. I.; BERTOLUCI, J. A. Reproductive Allometry of *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) in Southern Brazilian Amazon. **Journal of Herpetology**, v.47, n.2, p.232-236. 2013.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M. & HEISER, J. B. Testudines; Os Lepidossaúria: tuatara, lagartos e serpentes; Ectotermia: um acesso de baixo custo à vida. In: A Vida dos Vertebrados. Terceira Edição. Atheneu. São Paulo, p.699, 2003.

READEL, A. M.; PHILLIPS, C. A.; WETZEL, M. J. Leech parasitism in a Turtle Assemblage: Effects of Host and Environmental Characteristics. **American Society of Ichthyologists and Herpetologists**, p.227-233, 2008.

REICHNOW, E. *Haemogregarina stepanowi*. Die Entwicklungsgeschichte einer Hamogregarine. **Archive fur Protistenkunde**, v.20, p.251-350, 1910.

RODRIGUES, S. S. **Avaliação coproparasitológica de Chelonoidis carbonária (Spix, 1824) (Reptilia, Testudinidae) em cativeiro no Espírito Santo**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2011.

ROSSOW, J. A.; HERNANDEZ, S. M.; SUMMER, S. M.; ALTMAN, B. R.; CRIDER, C. G.; GAMMAGE, M. B., et al. Haemogregarine infections of three species of aquatic freshwater turtles from two sites in Costa Rica. **International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.2, p.131-135. 2013.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M; O'DWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. **Parasitology Research**, v.97, N.2, p.91-93, 2005a.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; RIBEIRO, V. C.; RIBOLLA, P. E. M.; SILVA, R. J.; O'DWYER, L. H. Caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae)

em *Hydrodynastes gigas* (Serpentes: Colubridae) In: Congresso Brasileiro de Herpetologia, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Minas Gerais, 2005b.

SAMBON, L. W.; SELIGMANN, C. G. Descriptions of five new species of haemogregarines from snakes. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v.1, p.283-284, 1907.

SANDLAND, G. J.; MINCHELLA, G. J. Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? **Trends of Parasitology**, v. 19, p.571–574, 2003.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v. 17, n.5, p. 914-921, 1994.

SANTOS, A. S., STOLL, M. N.; CAMPOS, Z.; MAGNUSSON, W. E.; MOURÃO, G. Diets of *Caiman crocodilus yacare* from different habitats in Brazilian Pantanal. **Herpetology Journal**, v.6, n.4, p.111-117, 1996.

SANTOS, M. M. V.; O'DRYER, L. H.; SILVA, R. J. Seasonal variation of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). **Parasitology Research**, v.97, n.2, p.94-97, 2005.

SANTOS, P. S. *Hepatozoon caimani*: caracterização morfológica e molecular. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2014.

SATO, L. H. **Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de trypanossomas de anuros da família Leptodactylidae**. 2015. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v.8, n.2, p.127-148. 2008.

SCHALL, J. J.; DENIS, K. M. St. Lack of Sequence Variation of the Mitochondrial Cytochromeb Gene from a Malaria Parasite, *Plasmodium mexicanum*. **Journal of Parasitology**, v.96, n.4, p.827-829, 2010.

SCOTT, M. E. The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. **Conservation Biology**, v.2, n.1, p. 40-56, 1998.

SIDDALL, M. E.; DESSER, S. S. Prevalence and intensity of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in three turtles species from Ontario with observations on intraerythrocytic development. **Canadian Journal of Zoology**, v.70, n.1, p.123-128, 1992.

SIDDALL, M. E. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarina complex. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.42, p.116-125, 1995.

SIDDALL, M. E.; DESSER, S. S. Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech, *Placobdella ornata*. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1217-1218, 2001.

SIMOND, P. L. Contribution a l'étude des hématozoaires endoglobulaires des reptiles. **Annales de l'Institut Pasteur**, v.15, p.319-351.

SIROKY, P.; KAMLER, M.; MODRY, D. Long-term occurrence of *Hemolivia* cf. *mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in captive *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): Evidence for cyclic merogony? **Parasitology**, v.90, n.6, p.1391-1393, 2004.

SLOBODA, M.; KAMLER, M.; BULANTOVÁ, J.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D. Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*? **Folia Parasitologica**, v.55, p.13-16. 2008.

SMITH, N. J. J. Destructive exploitation of the South American River Turtle. **Yearbook of the Association of Pacific Coast Geographers**, n. 36, p.85-120, 1974.

SMITH, T. G.; DESSER, S. S.; MARTIN, D. S. The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, The Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). **Parasitology Research**, v.80, p.559-568., 1994.

SMITH, G. T. The genus *hepatozoon* (APICOMPLEXA: ADELEINA). **Journal of Parasitology**, v.82, p.565-585, 1996.

SOARES, P.; BRITO, E. S.; PAIVA, F.; PAVAN, D.; VIANA, L. A. *Haemogregarina* spp. in wild population from *Podocnemis unifilis* Trschel, 1848 in Brazilian Amazonia. **Parasitology Research**, v.113, p.4499-4503.2014.

SOUZA, F. L.; MOLINA, F.B. Estado atual do conhecimento de quelônios no Brasil, com ênfase para as espécies não amazônicas. In: Nascimento, L.B.; Oliveira, M.E. (Eds.).

Herpetologia no Brasil II. Belo Horizonte. Sociedade Brasileira de Herpetologia, p. 264-277, 2007.

SOUZA, J. L. Diagnóstico parasitológico e imunológico em fezes de serpentes cativas do Instituto Vital Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p.123-128, 2014.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DE NICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEND, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica e Veterinária**. São Paulo: Roca. 2007.

TELFORD JR, S. R. Hemoparasites of reptiles. In. Diseases of amphibians and reptiles, G. L. Hoff, F.L. Frey, and E.R. Jacobson (eds.) Plenum Press. New York. p. 385-517, 1984.

TELFORD JR, S. R. A species of *Schellackia* (Apicomplexa: Lankesterellidae) parasiting east and Southeast Asian lizards. **Systematic Parasitology**, v.25, p.109-117.

TELFORD JR., S. R.; STEIN, J. Two malaria parasites (Apicomplexa: Plasmodiidae) of the Australia shink *Egernia stokesii*. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 395-406.2000.

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

TELFORD JR., S. R. A Haemocystidium species from the East African gecko *Lygodactylus capensis grotei*. **Journal of Parasitology**, v.91, p.135-138, 2005.

TELFORD, S. R. Jr. **Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text**. 1 ed. Florida: CRC Press. 2009.

UETZ, P. The Reptile Database. **Herpetological Review**, v.17, n.2, p.330-334, 2016.

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

URSULA, H.; KORBEL, R.; MUTSCHMANN, F.; RINDER, M. Blood parasites in reptiles imported to Germany. **Parasitology Research**, v.113, n.14, p. 4587-4599, 2014.

VALADÃO, R. C. **Evolução de Longo Termo do Relevo do Brasil Oriental (desnudação, superfícies de aplanamento e soerguimentos custais).** 1998. Tese (Doutorado), Universidade Federal da Bahia. Salvador, 1998.

VAN DIJK, P. P.; IVERSON, J. B.; RHODIN, A. G. J.; SHAFFER, H. B.; BOUR, R. Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project by the IUNC/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. **Chelonian Research Monographs**, v.5, n.7, p.329-479, 2014.

VARDO, A. M.; WARGO, A. R.; SCHALL, J. J. PCR Detection of Lizard Malaria Parasites: Prevalence of *Plasmodium* Infections with Low-Level Parasitemia Differs by Site and Season. **Journal of Parasitology**, v.91, n.6, p.159-1511, 2005.

VELASCO, A.; COLIMINE, G.; SOLA, R.; VILLARROEL, G. Effects of sustained harvests on wild populations of *Caiman crocodilus crocodilus* in Venezuela. **Interciencia**, v.28, n.9, p.544-548, 2009.

VERDADE, L. M. *Caiman latirostris*: In: Ross, J. P. (Ed.) **Crocodiles: Status Survey and Conservation** Action Plan. 2^a ed. IUCN, p. 18-20,

VERDADE, L. M. The São Francisco River “Codfish”: The northernmost wild populations of the Broads-snouted caiman (*Caiman latirostris*). **Crocodile Specialist Group Newsletter**, v.20, p.80-82, 2001.

VIANA, L. A.; MARQUES, E. J. Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) from Pantanal, Corumbá, MS, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.14, n.4, p.173-175, 2005.

VIANA, L. A. *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) no jacaré Caiman yacare no pantanal Sul Mato-Grossense: prevalência e transmissão natural. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2010.

VIANA, L. A.; PAIVA, F.; COUTINHO, M. E.; OLIVEIRA, L. R. *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal region, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.96, p.83-88.2010.

VIANA, L. A.; SOARES, P.; PAIVA, F.; SILVA, J. E.; COUTINHO, M. E. Anurans as paratenic hosts in the transmission of the *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. **Parasitology Research**, v.110, p.883-886. 2012.

VILLELA, P. M. S. **Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Paleosuchus trigonatus***. 2008. Tese

(Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2008.

VITT, L. J. Ecological observations on sympatric *Philodryas* (Colubridae) in northeastern Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.34, p.87-98. 1980.

VIOLA, L. B. Phylogenetic Analisys Based on Small Subunit rRNA and Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes and Ultrastructural Caracterization of two snakes Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* form *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n.6, p. 594-602, 2009.

VOGT, R. C. **Tartarugas da Amazônia**. Peru: Gráfica Biblos, 2008.

ZIPPEL, K. C.; LILLYWHITE, H. B.; MLADINICH, C. R. J. New vascular system in reptiles: Anatomy and postural hemodynamics of vertebral venomous lexus in snakes. **Journal of Morphology**, v.250, p.173-184, 2001.

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

WOZNIAK, E.J.; TELFORD JR., S. R.; GERALD, L. M. Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differention of reptilian hemogregarines and its application to preventive zoological medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, p. 538-547, 1994.

WOZNIAK, E. J.; TELFORD JR., S. R.; DENARDO, D. F.; MCLAUGHLIN, G.L.; BUTLER, J. F. Granulomatous hepatitis associated with *Hepatozoon* sp. Meronts in a southern water snake (*Nerodia fasciata pictiventris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n.1, p.68-71, 1998.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal of Zoology**, v.47, p.921-923, 1969.

Anexo:

Anexo 1 :

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais
Silvestres

**AUTORIZAÇÃO**

Uberlândia, 11 de junho de 2015.

Autorizo as pesquisadoras Márcia Cristina Cury e Letícia Pereira Úngari utilizar os répteis do acervo do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres para realização da pesquisa "Análise morfológica e caracterização molecular de hemoparasitos em répteis de vida livre e cativeiro".



Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos
Coordenador técnico do Laboratório de
Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres

Anexo 2:

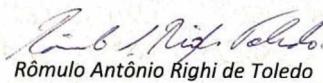
Participar do fortalecimento do Sistema Único de Saúde, protegendo e promovendo a saúde

Termo de Compromisso

O Serviço de Animais Peçonhentos - SAP da Fundação Ezequiel Dias - Funed, está trabalhando conjuntamente no Projeto de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, da Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas.

O Serviço de Animais Peçonhentos da Funed, aceita contribuir com amostras de sangue das serpentes de cativeiro para o projeto, devidamente licenciado pelos órgãos competentes. Projeto de Análise Morfológica e Caracterização Molecular de Hemoparasitos em répteis de vida livre e cativeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre da aluna Letícia Pereira Úngari, tendo como orientadora a Professora Dr.^a Márcia Cristina Cury e Co-orientador o professor Dr. André Luiz Quagliatto Santos, ambos catedráticos da Universidade federal de Uberlândia – UFU.

Belo horizonte, 07 de Outubro de 2015.


Rômulo Antônio Righi de Toledo

Chefe do Serviço de Animais Peçonhentos

Divisão de Produção Animal

Diretoria Industrial

Rua Conde Pereira Carneiro, nº 80 - Gameleira
Belo Horizonte - MG - CEP 30.510-010
www.funed.mg.gov.br
e-mail: faleconosco@funed.mg.gov.br
Tel.: 0800 283 1980



Anexo 3:



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISTIBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61388-1	Data da Emissão: 28/11/2015 11:50	Data para Revalidação: 26/11/2018
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, ainda vedada a qualquer tempo o prazo de validade equivalente ao previsto na cronograma de atividades do projeto, mas devendo ser reválida anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades e ser enviado por meio do Sistbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário da sua autorização.		

Dados do Titular

Nome: Letícia Parreira (Urgei)	CPF: 387.011.818-07
Título do Projeto: Análise morfológica e caracterização molecular de hemoperíneos em répteis da vida livre e captivos.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Liberdade	
CNPJ: 25.448.387/0001-18	

Cronograma de atividades

	Objetivo das atividades	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras de répteis da vida livre e de cativeiro	11/2015	12/2015
2	Elaboração e análise das amostras analisadas	1/2015	12/2016
3	Elaboração da Tela de caracterização molecular	03/2015	12/2016
4	Elaboração da PCR e caracterização molecular	03/2015	12/2016
5	Organização das dados e análise estatística	10/2015	12/2016
6	Elaboração final de resultados e discussão	10/2015	12/2016



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61388-1	Data da Emissão: 28/11/2016 11:50	Data para Revalidação*: 26/12/2016
* De acordo com o art. 28 do 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 da sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Letícia Pereira Üngari	CPF: 387.011.818-07
Título do Projeto: Análise morfológica e caracterização molecular de hemoparásitos em répteis de vida livre e cativeiro.	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.848.387/0001-15

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BRITÂNIA	GO	Rio Vermelho	Faz de UC Federal
2		GO	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL MIRANDOR DO RIO	UC Federal
3	MIRADOURO	MG	Fundação Escola Rio	Faz de UC Federal
4	UBERLÂNDIA	MG	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres	Faz de UC Federal

Atividades X Taxons

#	Atividade	Taxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Caiman crocodilus, Melanochelys niger, Podocnemis expansa, Podocnemis unifilis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Bos concolor, Bothrops mojeni, Trachemys scripta, Chelonoidis carbonaria, Bothrops jararacussu, Podocnemis unifilis, Caiman crocodilus, Iguana iguana, Podocnemis expansa, Epicrates cossus, Paleosuchus palpebrosus, Crocodylus duriaei, Tupinambis merianae, Chelonoidis denticulata, Bothrops alternatus
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Podocnemis expansa, Melanochelys niger, Podocnemis unifilis, Caiman crocodilus

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Réptile)	Sangue
2	Método de capturacolheita (Réptile)	Captura manual, Laço com coto de aço, Coleta manual, Anel
3	Método de marcação (Réptile)	Tag

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Federal de Uberlândia	

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).

Código de autenticação: 47924542



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SIBBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

* De acordo com o art. 28 de IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser reválida 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 da sua emissão.

Dados do titular

Nome: Letícia Pereira Üngari	CPF: 387.011.818-07
Título do Projeto: Análise morfológica e caracterização molecular de hemoperitoxes em répteis de vida livre e cativeiro.	
Nome da Instituição : Universidade Federal de Uberlândia	CNPJ: 25.848.387/0001-18

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à Instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

• Identificar a estratégia na qual haja premissa positiva.

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/CMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47924542



Página 313

Anexo 4:



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise morfológica e caracterização molecular de hemoparasitos de répteis de vida livre e cativeiro", protocolo nº 032/16, sob a responsabilidade de Márcia Cristina Cury – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 03 de junho de 2016.

(We certify that the project entitled "Análise morfológica e caracterização molecular de hemoparasitos de répteis de vida livre e cativeiro", protocol 032/16, under the responsibility of Márcia Cristina Cury - Involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - Is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 03rd, 2016).

Vigência do Projeto	Inicio: 15/06/2016 Término: 15/02/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonómicos	Espécie Silvestre brasileira – Réptil Réptil – serpentes, Testudíneos, crocodilianos, lagartos
Número de animais	-
Peso / Idade	-
Sexo	-
Origem / Local	Laboratório de Pesquisa e Ensino em Animais Silvestres (LAPAS-UFU) e Fundação Ezequiel Dias (FUNED)
Número da Autorização SISBIO	51398-1
Atividade(s)	-

Uberlândia, 10 de junho de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 5: Pesagem e medição dos crocodilianos da espécie *Caiman crocodilus* de vida livre e cativeiro para enquadramento da idade segundo Velasco et al. (2013).

	Identificação	Peso	Cabeça	Crânio	Crânio-cloaca	Total	Idade
Vida livre							
1	T01	50kg	28cm	11,5cm	1,20m	2,02m	Adulto
2	T02	50kg	25cm	11cm	1,12cm	2m	Adulto
3	T03	300g	6,5cm	3,5cm	22cm	43cm	Jovem
4	T04	2,5kg	11,2cm	5,3cm	43,5cm	86,5cm	Adulto
5	T05	3kg	12cm	6cm	46,5cm	86,5cm	Adulto
6	T06	9kg	16,4cm	7,2cm	67cm	1,20m	Adulto
7	T07	22,5kg	21,7cm	9cm	90,5cm	1,69m	Adulto
8	T08	12kg	18cm	8cm	72,5cm	1,40m	Adulto
9	T09	13kg	19cm	8cm	77,5cm	1,49m	Adulto
10	T10	300g	7,8cm	3,7cm	26,2cm	53,5cm	Jovem-Adulto
11	T11	100g	7cm	3,8cm	24,5cm	50cm	Jovem
12	T12	100g	6cm	3,3cm	22,2cm	44,8cm	Jovem
13	T13	150g	6cm	3,5cm	22,2cm	44,3cm	Jovem
14	T14	100g	5,5cm	3,3cm	19cm	38,3cm	Jovem
15	T15	100g	6cm	3,5cm	21,5cm	49cm	Jovem
16	T16	700g	8,2cm	4,5cm	30cm	60cm	Jovem-Adulto
17	T17	1kg	9,5cm	5,5cm	34,5cm	69cm	Jovem-Adulto
18	T18	9,5kg	17cm	7,5cm	70cm	1,33m	Adulto
19	T19	100g	6,5cm	4cm	22,5cm	43,5cm	Jovem
20	T20	50g	28cm	12cm	1,22m	2m	Adulto
21	T21	700g	8cm	4,5cm	29cm	59cm	Jovem-adulto
22	T22	100g	5,5cm	3cm	18,5cm	36,5cm	Jovem
23	T23	35kg	24,5cm	10cm	1,01m	1,78m	Adulto
24	JT01	4kg	13cm	6cm	32cm	45cm	Jovem
25	JT02	7,1kg	15,5cm	6,5cm	61cm	79cm	Jovem-Adulto
26	JT03	8kg	15cm	7cm	62cm	79cm	Jovem-Adulto
27	JT04	12,5kg	18cm	8cm	71cm	85cm	Adulto
28	JT05	4,5kg	12cm	5,5cm	50cm	63cm	Jovem-Adulto
29	JT06	2,5kg	11cm	5cm	40cm	59cm	Jovem-Adulto
30	JT07	8kg	16cm	7cm	61cm	77cm	Jovem-Adulto
31	JT08	<50kg	27cm	11cm	115cm	1,35m	Adulto
32	JT09	27kg	23cm	9cm	94cm	1,15m	Adulto
33	JT10	27,5kg	24cm	10cm	97cm	1,2m	Adulto
34	JT11	12,5kg	20cm	8cm	78cm	1,03m	Adulto
35	JT12	26kg	23cm	9cm	34cm	1,1m	Adulto
36	JT13	24kg	23cm	9,5cm	94cm	1,38m	Adulto
37	JT14	20kg	22cm	9cm	86cm	1,35m	Adulto
38	JT15	31,5kg	23cm	10cm	1m	1,50m	Adulto
39	JT16	21kg	20cm	8,5cm	86cm	1,29m	Adulto
40	JT17	<50kg	29cm	12cm	115cm	1,60m	Adulto
Cativeiro							
41	T01a	51kg	23cm	9,5cm	1,18m	2m	Adulto
42	T02a	49kg	25cm	10cm	1,09m	1,95m	Adulto

43	T03a	42kg	18cm	9,5cm	1m	1,78m	Adulto
44	T04a	300g	7,8cm	3,7cm	26,2cm	53,5cm	Jovem-Adulto
45	T05a	100g	7cm	3,8cm	24,5cm	50cm	Jovem
46	T06a	9kg	15,4cm	7cm	63cm	1,20m	Adulto
47	T07a	22,5kg	21,7cm	9cm	90,5cm	1,69m	Adulto
48	T08a	12kg	18cm	8cm	72,5cm	1,40m	Adulto
49	T09a	13kg	19cm	8cm	77,5cm	1,49m	Adulto
50	T10a	100g	5,5cm	3,3cm	19cm	38,3cm	Jovem
51	T11a	100g	7cm	3,8cm	24,5cm	50cm	Jovem
52	T12a	50kg	15cm	7cm	90cm	1,73m	Adulto
53	T13a	39kg	18cm	8cm	1,45m	1,60m	Adulto
54	T14a	100g	5,5cm	3,3cm	19cm	38,3cm	Jovem
55	T15a	100g	18cm	6cm	90cm	1,49m	Adulto
56	T16a	44kg	20cm	9,5cm	1,1m	1,88m	Adulto
57	T17a	9,5kg	17cm	17cm	70cm	1,33m	Adulto
58	T18a	10,5kg	19cm	19cm	77cm	1,43m	Adulto

Anexo 6: Informações gerais sobre os répteis positivos para os gêneros *Hepatozoon* e *Haemogregarina*.

	Identificação	Espécie	Nome popular	Sexo/Idade	Procedência	Local
Crocodilianos						
1	T02	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
2	T03	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Indefinido/Jovem	Vida livre	MT
3	T04	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Vida livre	MT
4	T05	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Vida livre	MT
5	T06	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
6	T07	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
7	T08	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
8	T09	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
9	T13	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Indefinido/Jovem	Vida livre	MT
10	T17	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Vida livre	MT
11	T18	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
12	T20	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
13	T21	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Indefinido/Jovem-adulto	Vida livre	MT
14	T22	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Indefinido/Jovem	Vida livre	MT
15	JT01	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem	Vida livre	MT
16	JT02	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Vida livre	MT
17	JT03	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Vida livre	MT
18	JT04	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
19	JT05	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Vida livre	MT
20	JT06	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Vida livre	MT
21	JT07	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Vida livre	MT
22	JT08	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
23	JT09	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
24	JT10	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT

25	JT11	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
26	JT12	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
27	JT13	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
28	JT14	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
29	JT15	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
30	JT16	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
31	JT17	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Vida livre	MT
32	T01a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
33	T02a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Jovem	Cativeiro Lapas	MG
34	T07a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
35	T08a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
36	T10a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
37	T11a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
38	T15a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
39	T16a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Fêmea/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
40	T17a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem	Cativeiro Lapas	MG
41	T18a	<i>Caiman crocodilus</i>	Jacaré-tinga	Macho/Jovem-Adulto	Cativeiro Lapas	MG

Testudines

42	TR01	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
43	TR02	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Jovem	Vida livre	GO
44	TR03	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
45	TR04	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Jovem	Vida livre	GO
46	TR05	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Jovem	Vida livre	GO
47	TR06	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
48	TR07	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
49	TR08	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
50	TR09	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
51	TR10	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
52	TR11	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO

53	TR12	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
54	TR13	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
55	TR14	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
56	TR15	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
57	TR16	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
58	TR17	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
59	TR18	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Vida livre	GO
60	Tr01	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
61	Tr02	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Filhote	Vida livre	GO
62	Tr03	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Jovem	Vida livre	GO
63	Tr04	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Filhote	Vida livre	GO
64	Tr05	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Filhote	Vida livre	GO
65	Tr06	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Jovem	Vida livre	GO
66	Tr07	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Jovem	Vida livre	GO
67	Tr08	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Jovem	Vida livre	GO
68	Tr09	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
69	Tr10	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
70	Tr11	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
71	Tr01	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
72	Tr02	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Filhote	Vida livre	GO
73	Tr13	<i>Podocnemis expansa</i>	Tartaruga da Amazônia	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
74	Tr14	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Vida livre	GO
75	T19b	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Cativeiro Lapas	MG
76	T20b	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Fêmea/Adulta	Cativeiro Lapas	MG
77	T24b	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
78	T33b	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
79	T34b	<i>Podocnemis unifilis</i>	Tracajá	Macho/Adulto	Cativeiro Lapas	MG
Serpentes						
80	S16	<i>Boa constrictor</i>	Jibóia	Macho/Adulto	Cativeiro Lapas	MG

81	Ca5	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Cativeiro Funed	MG
82	Ca6	<i>Bothrops moojeni</i>	Caiçaca	Fêmea/Adulta	Cativeiro Funed	MG
83	Ca9	<i>Bothrops moojeni</i>	Caiçaca	Fêmea/Adulta	Cativeiro Funed	MG
84	Ca11	<i>Bothrops alternatus</i>	Urutu	Fêmea/Adulta	Cativeiro Funed	MG
85	VL4	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Vida livre Funed	MG
86	VL5	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Vida livre Funed	MG
87	VL6	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Vida livre Funed	MG
88	VL9	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Vida livre Funed	MG
89	VL10	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
90	VL22	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
91	VL24	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
92	VL25	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
93	VL26	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
94	VL27	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
95	VL29	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
96	VL31	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Vida livre Funed	MG
97	VL32	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
98	VL33	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Macho/Adulto	Vida livre Funed	MG
99	VL38	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
100	VL39	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
101	VL40	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
102	VL41	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG
103	VL44	<i>Crotalus durissus</i>	Cascavel	Fêmea/Adulta	Vida livre Funed	MG