

INVESTIGAÇÃO DE HEMOPARASITAS EM  
ANFÍBIOS ANUROS DO GÊNERO  
*LEPTODACTYLUS*

**DENISE DUTRA MENEZES LEAL**

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

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



Instituto  
de  
Biociências

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG - BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DE HEMOPARASITAS EM  
ANFÍBIOS ANUROS DO GÊNERO  
*LEPTODACTYLUS*

**DOUTORANDA: DENISE DUTRA MENEZES LEAL**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA LUCIA HELENA O'DWYER**

**CO-ORIENTADORA: DRA. KARINA DOS SANTOS PADUAN**

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

**BOTUCATU – SP**

**2012**

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

Leal, Denise Dutra Menezes.

Investigação de hemoparasitas de anfíbios anuros do gênero *Leptodactylus* /  
Denise Dutra Menezes Leal. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências  
de de Botucatu

Orientador: Lúcia Helena O'Dwyer

Coorientador: Karina dos Santos Paduan

Capes: 21301026

1. Anfíbio. 2. Anuro. 3. Artrópodes vetores. 4. *Leptodactylus*. 5.  
Genética molecular. 6. Número de espécies.

Palavras-chave: Anuros; Caracterização molecular; *Hepatozoon*;  
*Leptodactylidae*; *Trypanosoma*.

*A minha mãe, ao meu pai (em memória) e  
meus irmãos, ao Inácio e a Mariana pelo  
carinho e apoio incondicional.*

*Momentos Efêmeros (A memória de meu filho Artur Leal Bianchi)*

*Aquilo que a memória amou ficou eterno. Um pôr de sol, uma carta que recebemos de um amigo, os campos de capim-gordura brilhando ao sol nascente, o cheiro de jasmim, um único olhar e uma pessoa amada, a sopa borbulhante sobre o fogão de lenha, as árvores de outono, o banho de cachoeira, mãos que seguram, o abraço de um filho. Houve muitos momentos de tanta beleza em minha vida que eu disse para mim mesmo: "Valeu a pena eu haver vivido toda a minha vida só para poder ter vivido esse momento. Há momentos efêmeros que justificam toda uma vida". (Rubem Alves)*

AGRADECIMENTOS

### **Agradecimentos**

- ◆ À minha orientadora Lucia Helena O'Dwyer e Co-orientadora Karina dos Santos Paduan pelo incentivo e compreensão quando precisei.
- ◆ À Prof. Dra. Vanda Lúcia Ferreira pela ajuda na coleta de anuros no Pantanal.
- ◆ Ao Prof.Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla por ter disponibilizado seu laboratório para que este trabalho fosse realizado.
- ◆ A Profa. Dra Luciene Maura Mascarini Serra pela ajuda estatística
- ◆ Aos técnicos de laboratório (Valdir, Roberto e Alessandra) pela amizade
- ◆ A Carine pela amizade e ajuda na genética molecular
- ◆ As amigas do coração: Tatiana, Larissa, Natália e Betina
- ◆ E a todos do Departamento de Parasitologia.

SUMÁRIO

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO GERAL .....	11
1.1. Ecologia de Anuros .....	11
1.2. Família Leptodactylidae.....	11
1.2.1 <i>Leptodactylus chaquensis</i> .....	12
1.2.2. <i>Leptodactylus podicipinus</i> .....	12
2. Parasitas sanguíneos em anfíbios.....	12
2.1. Gênero <i>Trypanosoma</i> .....	12
2.1.2. Aspectos morfológicos de tripanossomas e sua distribuição geográfica.....	13
2.1.3. Vetores.....	15
2.1.4 Caracterização molecular.....	17
2.2. Gênero <i>Hepatozoon</i> .....	18
2.2.1 Aspectos morfológicos de <i>Hepatozoon</i> e sua distribuição geográfica.....	19
2.2.2. Vetores.....	20
2.2.3. Caracterização molecular.....	22
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
4. REFERÊNCIAS.....	24
ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO DE <i>Hepatozoon</i> sp. EM <i>Leptodactylus chaquensis</i> e <i>Leptodactylus podicipinus</i> PROVENIENTES DE DUAS REGIÕES DO PANTANAL, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.....	
RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
1.INTRODUÇÃO .....	36
2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Espécies de Animais estudados.....	37
3.2. Coleta e material biológico.....	39
3.3. Análise Morfológica e Morfométrica de <i>Hepatozoon</i> sp.....	39
3.4. Caracterização Molecular.....	39
3.4.1. Extração do DNA.....	39



3.4.2. Oligonucleotídeos testados para <i>Hepatozoon</i> sp.....	40
3.4.3. Amplificação das amostras de DNA.....	40
3.4.4. Reação de PCR.....	41
3.4.5. Eletroforese.....	41
3.4.6. Purificação dos Produtos de PCR.....	41
3.4.7. Sequenciamento.....	41
3.4.8. Precipitação das reações de sequenciamento.....	42
3.4.9 Análise dos dados.....	42
3.5. Estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Locais de coleta.....	43
4.2. Animais positivos para <i>Hepatozoon</i> sp.....	43
4.3. Locais de coleta e animais parasitados pela técnica de PCR.....	44
4.4. Caracterização morfológica de <i>Hepatozoon</i> sp.....	44
4.5. Caracterização de formas parasitárias teciduais.....	49
4.6. Oligonucleotídeos e caracterização molecular.....	54
4.7. Análise Filogenética.....	61
5. Discussão.....	62
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS.....	66

ARTIGO 2: OCORRÊNCIA DE <i>Trypanosoma</i> sp. EM <i>Leptodactylus chaquensis</i> e <i>Leptodactylus podicipinus</i> PROVENIENTES DA REGIÃO DO PANTANAL, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.....	70
--	----

RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	72
1. INTRODUÇÃO .....	73
2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	74
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3.1. Espécies de Animais estudados.....	75
3.2. Coleta de Material biológico.....	77
3.3. Análise Morfológica e Morfométrica.....	77
3.4. Caracterização Molecular.....	77
3.4.1. Extração do DNA.....	77

3.4.2. Oligonucleotídeos testados para <i>Trypanosoma</i> sp.....	78
3.4.3. Amplificação das amostras de DNA.....	78
3.4.4. Reação de PCR.....	79
3.4.5. Eletroforese.....	79
3.4.6. Análise dos dados.....	79
3.4.7. Estatística.....	80
4. RESULTADOS.....	80
4.1. Locais de coleta.....	80
4.2. Animais positivos para <i>Trypanosoma</i> sp.....	80
4.3. Locais de coleta e animais parasitados.....	80
4.4. Caracterização morfológica de <i>Tripanosoma</i> sp.....	81
4.5. Caracterização de formas parasitárias teciduais.....	95
4.6. Oligonucleotídeos e caracterização molecular.....	95
5. DISCUSSÃO.....	96
6. CONCLUSÃO.....	99
7. REFERÊNCIAS.....	99

OCORRÊNCIA DE *Lankesterella* sp. E *Dactylosoma* sp. NO SANGUE E Miyxozoa NOS RINS DE *Leptodactylus chaquensis* E *Leptodactylus podicipinus* PROVENIENTES DO PANTANAL, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.....103

REFERÊNCIAS.....	107
------------------	-----

## INTRODUÇÃO GERAL

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Ecologia de Anuros

No mundo são reconhecidas aproximadamente 36 famílias de anuros, com 350 gêneros e aproximadamente 5.300 espécies. O número exato das famílias é variável, devido ao desacordo entre os sistematas (Wells, 2007), mas apenas no Brasil já foram relatadas a ocorrência de 913 anuros (SBH, 2012).

A grande maioria dos anuros necessita de água para reproduzir, portanto locais úmidos como o das florestas é onde encontram o ambiente mais favorável (Rothermel e Semlitsch, 2002). No entanto, estes animais possuem grande facilidade de adaptação as mais diversas condições pluviométricas e de temperatura, sendo assim, podemos encontrá-los, também, em regiões áridas como na caatinga, pois são capazes de sobreviver às mais extremas condições climáticas, passando, às vezes, meses sem se alimentar e em estado de hibernação. Podem, também, ser vistos ocupando as mais diversas altitudes, desde as restingas costeiras aos campos de altitude de 2.400 metros, como no Itatiaia - RJ (Santos, 2011). Diante de tal adaptabilidade, ainda sim, os anuros sofrem com as mudanças ambientais, que ao ocorrerem de forma muito rápida, não permitem que estes animais respondam de maneira adequada à nova condição, como por exemplo, o aumento da radiação UV e poluição, que agindo em conjunto ou isoladamente, acabam por afetar o seu ciclo de vida (Schiesari, Grillitsch, B. e Grillitsch, H., 2007).

Estes aspectos, aliados às características de apresentarem uma intensa filopatria (fidelidade ao habitat) e limitada mobilidade faz com que estes funcionem como indicadores da condição do ambiente em que ocupam (Blaustein, Wake e Souza, 1994).

### 1.2. Família Leptodactylidae

Entre as famílias que apresentam a maior diversidade de espécies da ordem Anura tem-se a família Leptodactylidae (Heyer, 1969). O gênero *Leptodactylus* ocupa áreas das América Norte, Central e do Sul (Heyer, 1969). Seu corpo tem coloração variada, locomove-se por saltos e possui os olhos com pupila horizontal (Heyer, 1969). As espécies deste gênero têm como característica a deposição de ovos em massa de espuma flutuante na lâmina d'água ou em câmaras escavadas no solo (Duellman e Trueb, 1986; Prado, Uetanabaro e Haddad, 2002). Em geral são animais de médio e pequeno porte, insetívoros, terrestres ou semi-aquáticos, e de atividade noturna (Frost, 2011).

### 1.2.1. *Leptodactylus chaquensis*

Esta espécie é encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (Frost, 1985). Seus ovos são colocados em poças ou áreas inundadas, coberta ou não por vegetação, e em águas com profundidades menores do que 15 cm (Prado, Uetanabaro e Lopes, 2000). Os meses de reprodução ocorrem de outubro a março (Prado, Uetanabaro e Lopes, 2000).

### 1.2.2. *Leptodactylus podicipinus*

É encontrada em áreas abertas do Paraguai, Argentina, Bolívia e na região central do Brasil (Heyer, 1994). A sua reprodução ocorre ao longo do ano, mas principalmente de novembro a março. Seus ovos são colocados nas bordas das poças permanentes e áreas inundadas, com ou sem vegetação, mas geralmente em áreas sombreadas com 5 cm de profundidade (Prado, Uetanabaro e Lopes, 2000).

## 2. Parasitas sanguíneos em anfíbios

Infecções causadas por hemoparasitas têm sido relatadas em anuros, além de outros hospedeiros vertebrados (Molyneux e Ashford, 1983). Anuros, por viverem tanto em ambientes terrestres como aquáticos, estão expostos a diversos vetores hematófagos e conseqüentemente a parasitas sanguíneos intra e extracelulares (Barta e Desser, 1984; Overath et al., 1998; Desser, 2001).

### 2.1. Gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* (família: Trypanosomatidae; Ordem: Kinetoplastida) é composto por flagelados unicelulares que são parasitas de todas as classes de vertebrados (Haag, O'hUigin e Overath, 1998), tendo como vetores várias espécies de sanguessugas (água doce e marinha) e artrópodes (insetos e carrapatos), portanto são encontrados em todos os continentes (Hamilton, Gibson e Stevens, 2007).

Os protozoários da família Trypanosomatidae são caracterizados pela presença de uma organela conhecida como cinetoplasto, rica em DNA mitocondrial e que está localizada na base do flagelo (Vickerman, 1976; Mcghee e Coscove, 1980).

De acordo com Bardsley e Harmsen (1973), estes parasitas digenéticos estão presentes no sangue de vertebrados e intestino de sanguessugas ou artrópodes. O ciclo de vida compreende vários estágios de desenvolvimento, tanto no hospedeiro vertebrado como no

invertebrado. As formas tripomastigota e epimastigota são comuns a quase todos os ciclos biológicos de tripanossomas, mas amastigotas e promastigotas, também, podem estar presentes. Estes hemoflagelados são vistos parasitando o sangue das principais classes de vertebrados. As espécies que parasitam elasmobrânquios (peixes cartilagosos), actinopterígeos (peixes ósseos), anfíbios e quelônios são transmitidas por sanguessugas, e nestas, o ciclo de desenvolvimento termina com a forma metacíclica que migra para a cavidade da probóscide da sanguessuga, enquanto que nos animais ectotérmicos terrestres, os tripanossomas são transmitidos via artrópodes hematófagos (Bardsley e Harmsen, 1973).

### 2.1.2. Aspectos morfológicos de tripanossomas e sua distribuição geográfica

As descrições de todas as espécies do endoparasita são baseadas em aspectos morfológicos das formas tripomastigotas observadas na circulação sanguínea e tecidos do hospedeiro vertebrado e nas formas epimastigotas no vetor invertebrado (Haag, O'hUigin e Overath, 1998; Martin et al., 2002). Devido a isso, as descrições, para a maioria das espécies, são frequentemente confundidas pela extrema variabilidade morfológica, pela ocorrência de espécies morfológicamente idênticas em diferentes hospedeiros no mundo, pela ausência de descrição de um ciclo de vida completo e dados do hospedeiro específico, ou pela probabilidade que diferentes espécies contenham estágios evolutivos semelhantes (Martin et al., 2002).

As diversas espécies podem diferir no tamanho e forma do corpo, na posição do núcleo e do cinetoplasto, bem como no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo. Portanto, para se medir estas variações são comumente utilizados parâmetros morfométricos como: comprimento corporal, incluindo flagelo livre, comprimento do flagelo livre, distância do cinetoplasto em relação à extremidade posterior até o núcleo, dimensões nucleares e sua distância das extremidades anterior e posterior (Martin et al., 2002).

Levando em consideração os aspectos de variabilidade e semelhança morfológica destes parasitas em anuros, podemos citar como exemplo, *Trypanosoma rotatorium*, que segundo a literatura tem uma distribuição cosmopolita (Scorza e Dagert, 1958), sendo este, portanto, o motivo pelo o qual o parasita muitas vezes é identificado erroneamente como outra espécie. Esta particularidade levou França e Athias (1906); Diamond (1965); Miyata (1978), Barta, Boulard e Desser (1989), Werner (1993), dentre outros, a observarem *T. rotatorium* como uma forma semelhante à descrita por Miyata apud Mayer (1843), que na

época de sua observação relatou o parasita como um paramécio denominando-o de *Paramecium loricatum*, devido a seu corpo largo. E que mais tarde foi relatada por Laveran e Mesnil (1912) contendo mais uma forma distinta do parasita, denominando-os como *Amoeba rotatorium* e *Paramecium loricatum*, que posteriormente foi renomeado como *T. rotatorium*. Além disso, o formato mais "largo" de *T. rotatorium* observado pelos pesquisadores, nada mais era, do que uma mudança de conformação do parasita, logo que o sangue era retirado do hospedeiro (Kudo, 1922). O tripanossoma, após perder o flagelo, sofria esse arredondamento e entrava em processo de divisão (Machado, 1911; Pereira et al., 1973).

Todo este pleomorfismo de tripanossoma foi constatado também por Miyata (1978) quando estudou rãs oriundas de duas ilhas do Japão (Kyushu e Ryukyu), onde foi observado que algumas espécies, como por exemplo, *T. rotatorium*, *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma loricatum* e *Trypanosoma tsunetzomiyatai* também podiam ser encontrados em várias localidades do mundo, enquanto que *Trypanosoma miyagii*, *Trypanosoma tsukamotoi*, *Trypanosoma ishigakiense* e *Trypanosoma nagasakiense* apenas poderiam ser observados em anuros de regiões restritas do Japão. Concluindo, portanto, que os tripanossomas de anuros podem se distribuir de forma ampla ou restrita, de acordo com a espécie. Segundo Miyata (1978), as rãs infectadas observadas em sua pesquisa geralmente estavam parasitadas por mais de uma espécie.

Em pesquisas com anuros na Costa Rica, Desser (2001) relatou que os parasitas mais encontrados no sangue destes animais foram tripanossomas, fato constatado em quatro de sete espécies amostradas. No gênero *Rana* foram observados nove tripanossomas morfológicamente distintos, sendo que cinco espécies de tripanossomas foram diagnosticadas em hospedeiros aquáticos. Segundo o autor, dos oito tipos observados no sangue de anuros, somente dois eram suficientemente diferentes para serem designados como espécies: *T. chattoni* e *T. loricatum*. Embora estas espécies sejam cosmopolitas em distribuição, diferenças morfométricas e morfológicas têm sido registradas entre formas de populações isoladas geograficamente de mesma espécie de rã e entre diferentes espécies (Diamond, 1965; Woo, 1969; Bardsley e Harmsen, 1973; Miyata, 1978; Barta e Desser, 1984). De acordo com Martin et al. (2002), dados moleculares e bioquímicos de tripanossoma de anuros são limitados e o relacionamento taxonômico entre os tripanossomas de anuros são pobremente conhecidos. Além disso, a diversidade genética de tripanossomas não é refletida na estrutura grosseira do parasita.

No Brasil, Ferreira et al. (2007) capturaram anuros pertencentes a família Hylidae, Bufonidae, Leptodactylidae, Brachycephalidae, Leuperidae e Microhylidae provenientes de diferentes biomas e observaram que entre os anuros havia um índice de infecção variável para tripanossoma, que era independente da família estudada. Analisando a morfologia dos parasitas os autores encontraram formas e tamanhos bem diferentes entre espécies distintas de anuros, entre indivíduos de mesma espécie e também dentro do mesmo indivíduo. Foram relatadas formas similares do parasita em espécies diferentes de anuros pertencendo ou não a mesma família. E quando compararam os parâmetros morfométricos do parasita os autores encontraram 11 formas diferentes separadas em dois grupos.

Em nosso trabalho anterior com este parasita as formas encontradas mostraram as mesmas variações relatadas por Ferreira et al. (2007) nas mesmas famílias de anuros (Hylidae, Leptodactylidae e Bufonidae), capturadas nos estados de São Paulo e Mato Grosso do sul, Brasil (Leal et al., 2009). Através de análise morfológica e morfométrica, observamos diferentes formas, tanto nos hospedeiros de mesma espécie, como entre hospedeiros de espécies diferentes. Ressaltamos que alguns dos anuros estudados (*L. chaquensis*, *L. podicipinus* e *Phylomedusa hypocondrialis*) estavam, também, parasitados por hemogregarinas. Sendo assim, o resultado mostrou uma prevalência relativamente maior para tripanossomas do que para hemogregarinas. (Leal et al., 2009).

A variabilidade de formas dos parasitas encontrados, não nos permitiu que os separássemos por espécies, apesar de mostrarem semelhanças às descrições na literatura. Observamos que apenas o aspecto morfológico não foi suficiente para caracterizá-los. Além do que, não acompanhamos a fase evolutiva do parasita nos anuros e no hospedeiro invertebrado (Leal et al., 2009).

### 2.1.3 Vetores

Em diversas pesquisas com hemoparasitas de anuros a sanguessuga é registrada como vetor de tripanossomas, embora existam evidências que dípteros também façam este papel (Feng e Chao, 1943; Ayala 1971, Desser, McIver e Jez, 1975).

Barta e Desser (1984), em seus experimentos, observaram a sanguessuga *Batrachobdella picta* fixada ao corpo de girinos e adultos de *Lithobates clamitans*, *Lithobates catesbeianus* e *Lithobates septentrionalis*. Neste estudo, a frequência de parasitas sanguíneos em anfíbios aquáticos foi bem maior do que nas espécies terrestres (*Pseudacris crucifer*,



*Anaxyrus americanus*, *Lithobates sylvaticus* e *Plethodon cinereus*). De acordo com Martin e Desser (1991), um breve contato de anuros terrestres (*Anaxyrus americanus*) com a água já seria suficiente para que o animal fosse infectado por *T. fallisi* através de vetores como as sanguessugas. Apesar destes relatos, em algumas pesquisas foram encontrados vetores artrópodes hospedando estes hemoparasitas.

Em relação aos dípteros, Feng e Chung (1940) e Ayala (1971) observaram formas epimastigotas no intestino posterior e reto de *Lutzomia vexatrix occidentis*. Também nos experimentos de Desser, McIver e Jez (1975), formas epimastigotas de *T. rotatorium* foram observadas no intestino e reto de *Culex territans*, mas a infecção experimental para *Lithobates pipiens* não foi bem sucedida. Segundo os autores, este fato pode estar relacionado ao comportamento alimentar do vetor na natureza, pois estes insetos não têm por hábito sugar o sangue de *L. pipiens*. E de acordo com Hamilton et al. (2005), a presença de tripanossoma em um invertebrado não o incrimina como o vetor deste parasita, pois estes podem ter adquirido o flagelado durante a sua alimentação através de um hospedeiro vertebrado parasitado, e podem ser incapazes de desenvolver o ciclo do parasita.

O mosquito *Cx. territans* se alimenta ocasionalmente de aves e répteis, mas preferem anfíbios (Crans, 1970). A transmissão de tripanossoma pode ocorrer através da saliva do vetor durante a alimentação no vertebrado, por depósitos fecais dentro das feridas ou por ingestão do hospedeiro invertebrado (Desser, McIver e Ryckman, 1973). Nas pesquisas de Bartlett-Healy, Crans e Gaugler (2009) envolvendo *Cx. territans*, foi percebido que os hemoparasitas neste vetor estavam associados à sazonalidade, ou seja, a prevalência de tripanossomas nas fêmeas era maior no período da primavera e ia decaindo até o final da estação. As altas prevalências ocorriam nos meses de maio, junho, julho e agosto, com o pico de prevalência associado também ao fotoperíodo, à temperatura, à taxa de glicose de anfíbios na época de reprodução e à distribuição sazonal de sanguessugas (Bardsley e Harmsen, 1973).

Neste trabalho de Bartlett-Healy, Crans e Gaugler (2009), as análises filogenéticas de todas as sequências presentes no vetor (41 amostras) foram colocadas dentro do Clado aquático, sendo que destas, oito foram agrupadas juntamente com outros tripanossomas (*T. rotatorium*, *Trypanosoma fallisi* e *Trypanosoma mega*) e uma amostra foi relacionada aos tripanossomas isolados de sanguessugas aquáticas. Os resultados indicaram que *Trypanosoma* spp. forma um grupo monofilético que engloba espécies terrestres e aquáticas (Bartlett-Healy, Crans e Gaugler, 2009). A explicação para o fato de uma amostra estudada

estar junto com tripanossomas de sanguessugas pode estar relacionada à origem de seus vetores *Culicidae* e *Phlebotominae* que ocorreram por volta de 40 milhões de anos depois das sanguessugas *Placobdella* spp. aparecerem. Este fato sugere que os tripanossomas de dípteros podem ter divergido dos tripanossomas transmitidos por sanguessugas (McGhee e Cosgrove, 1980).

Quanto às sanguessugas como vetores, Barrow (1953) verificou uma particularidade neste invertebrado, demonstrando que *Batrachobdella picta* infectada por *Trypanosoma diemyctyli* (parasita de tartarugas) debelava a infecção quando passava muito tempo sem se alimentar. Fato que também foi observado por Woo (1969) quando examinou a longevidade de *Trypanosoma chrysemydis* (parasita encontrado em tartarugas) em *Chrysemys picta marginata* (sanguessuga).

#### 2.1.4 Caracterização molecular

Devido a todos os problemas de classificação, Werner (1993); Žičhus (2002) e Martin, et al. (2002) sugeriram que estudos moleculares e morfológicos destes tripanossomas sejam realizados para que ocorra a correta classificação.

O posicionamento filogenético de Kinetoplastida e a posição do gênero *Trypanosoma* ainda geram dúvidas. Por isso, foi proposta a utilização para comparação da sequência de genes, de pequenas subunidades (SSU rRNA) e de grande subunidades (LSU rRNA). A espécie *Trypanosoma* foi vista em alguns trabalhos formando um grupo parafilético e em outros como monofilético (Haag, O'hUigin e Overath, 1998).

Os tripanossomas de anuros já foram posicionados filogeneticamente próximos à parasitas de cervídeos e bovídeos não ungulados, dentro do subgênero *Megatrypanum*, devido a sua similaridade em tamanho (Martin et al. 2002). Anteriormente, Martin et al. (2002) utilizaram a região 18S (rRNA) para tentar posicionar melhor estes tripanossomas. Na árvore construída, *T. chattoni* se encontrava distante de *T. fallisi*, *T. ranarum*, *T. mega*, *T. neveulemairei* e *T. rotatorium*, isso condiz com sua morfologia diversa. Enquanto que, para alguns tripanossomas de sapos, a ordem de ramificações na árvore filogenética parece indicar que houve eventos de mudança de parasitas entre os hospedeiros (Brooks, 1990), o que não foi confirmado. Todos os tripanossomas do estudo demonstram monofilia, exceto *T. chattoni*. Portanto, os tripanossomas são estruturalmente conservados, devido ao ancestral comum, mas guardam diferenças genéticas.

Para inferir o relacionamento filogenético entre as espécies de *Trypanosoma*, Maia da Silva et al. (2004), Rodrigues, et al. (2006) e Ferreira et al. (2007) utilizaram em seus estudos regiões de sequências SSU rRNA e sequências ITS (mais variáveis), coletando hospedeiros de diversas regiões geográficas. Foi observada a grande diversidade morfológica e molecular destes parasitas, demonstrando, algumas vezes, a possibilidade de coevolução entre hospedeiros vertebrados e invertebrados ou uma associação entre hospedeiros e regiões geográficas. Em algumas situações aparentava haver especificidade entre parasita e hospedeiro e em outras a especificidade não ocorreu.

## 2.2. Gênero *Hepatozoon*

O termo hemogregarina é usado para descrever coletivamente parasitas sanguíneos pertencentes à subordem Adeleorina, Filo Apicomplexa (Jakes, O'donoghue e Cameron, 2003). Os principais gêneros deste grupo são *Hepatozoon* (família Hepatozoidae) e *Haemogregarina* (família Haemogregarinidae). A distinção entre os gêneros *Haemogregarina* e *Hepatozoon* geralmente basea-se no desenvolvimento do estágio esporogônico no vetor. Em *Haemogregarina* o oocisto formado é pequeno contendo somente oito esporozoítos sem esporocisto, enquanto que em *Hepatozoon* o oocisto contém múltiplos esporozoítos envolvidos por esporocistos. Grande parte das espécies foi descrita considerando-se somente os estágios sanguíneos no hospedeiro e pouco do ciclo biológico das diferentes espécies foi elucidado (Desser, 1993).

Diante disso, Desser (1993) sugeriu uma lista de características para a espécie *Hepatozoon* que poderia ajudar no reconhecimento do endoparasita:

- 1) As espécies são encontradas parasitando anfíbios, répteis, aves e mamíferos.
- 2) A merogonia ocorre no fígado, no baço e pulmão, dentre outros órgãos.
- 3) Gamontes somente são vistos em eritrócitos, exceção para os mamíferos, onde a espécie pode ser vista em leucócitos.
- 4) Cistos monozoicos e dizoicos podem estar presentes no pulmão e outros órgãos.
- 5) Artrópodes são hospedeiros definitivos e vetores passivos. Os oocistos no vetor são encontrados na hemocele e, algumas vezes, no epitélio intestinal ou outro tecido.

### 2.2.1. Aspectos morfológicos de *Hepatozoon* spp. e sua distribuição geográfica

A diversidade de ectoparasitas e endoparasitas que infectam anuros é grande e se reflete nas formas de hemogregarinas encontradas na circulação sanguínea destes animais (Levine, 1988; Desser, Hong e Martin, 1995; Smith, 1996).

As descrições de *Hepatozoon* spp., geralmente, baseia-se na aparência e dimensões dos gamontes intraeritrocíticos. A falta de conhecimento dos vetores de hemogregarinas em anuros torna difícil determinar o gênero correto do protozoário (Desser, Hong e Martin, 1995). Segundo Smith (1996), em suas pesquisas com anuros, o hemoparasita foi apenas observado nas famílias *Ranidae* e *Bufo* *idae*, mas não em *Hylidae*.

Várias espécies de hemogregarinas foram descritas em rãs, na África, Ásia e Europa (Levine, 1988; Desser, 2001) sempre levando em consideração apenas os estágios sanguíneos no hospedeiro (Desser, 1993). Cunha e Muniz (1927) descreveram detalhadamente a evolução esquizogônica de hemogregarina parasitando o fígado, pulmão e intestino de *Leptodactylus latrans* provenientes do Brasil. Assim como, Costa et al. (1973) descreveram *Hepatozoon leptodactyli* no gênero *Leptodactylus*. Os autores capturaram rãs *L. latrans* e *L. pentadactylus*, além de sanguessuga *Haementeria lutzii*, e entre as 90 rãs capturadas, 17 apresentaram-se positivas para o parasita. Foram observadas formas intracelulares e extracelulares. Os gamontes mediram 21 x 8,3 µm a 5,1 x 2,3 µm, algumas vezes, provocaram o deslocamento do núcleo da hemácia e nas infecções com mais de um gamonte por eritrócito, a célula apresentou-se mais alargada. Viu-se também formas esquizogônicas no fígado e baço do hospedeiro vertebrado, além de outros órgãos como pulmão, intestino delgado, coração e cérebro. No provável vetor *H. lutzii*, os pesquisadores observaram o estágio esporogônico depois que a sanguessuga alimentou-se de *L. pentadactylus*, o oocisto estava no intestino do hirudíneo. Os esporozoítos encontravam-se envolvidos por um esporocisto em número de 18 a 38, medindo de 17 a 18 µm x 3 a 4 µm, com o núcleo medindo 4 µm<sup>2</sup> de área, em média. Além disso, dentre as sanguessugas do experimento, uma apresentou um grande número de cistos no seu trato digestivo (Costa et al., 1973).

Souza e Borriello Filho (1974), também, encontraram uma hemogregarina parasitando *Rhinella ornata*, espécie proveniente do Brasil, com características semelhantes à espécie relatada por Costa et al. (1973). Vários outros pesquisadores no mundo puderam observar em seus estudos, hemogregarinas em anuros que provocaram alterações na célula do hospedeiro vertebrado, ora os gamontes causavam fragmentação do núcleo do eritrócito, ora provocavam

o deslocamento deste núcleo, ora modificavam a forma do eritrócito (Fantham, Porter e Richardson, 1942; Mohamed e Mansour 1963,1966; Mansour e Mohamed, 1966; Kim, Smith e Desser, 1998; Desser, 2001).

Desser et al. (1995) foram os primeiros a observarem o ciclo esporogônico no vetor invertebrado, estudando a relação existente entre o possível vetor de *Hepatozoon catesbiana* e seus hospedeiros *Lithobates catesbeianus* e *Cx territans*. Nesta pesquisa constatou-se que *Cx. territans* estava envolvido na transmissão do parasita, pois foram encontrados oocistos no túbulo de Malpighi deste inseto. A infecção de *H. catesbiana* teve início quando as rãs ingeriram os mosquitos que haviam se alimentado de outras rãs infectadas (Hayes, 1961; Murphey, Burbutis e Bray, 1967); sendo comum observar uma aglomeração destes dípteros ao redor das rãs (Desser et al., 1995).

Em nossas pesquisas anteriores com anuros no Brasil, também, observaram-se animais positivos para hemogregarinas em espécies de Leptodactylidae, ainda não descrita como hospedeiro de hemogregarinas, e de Hylidae (Leal et al., 2009), que segundo Smith (1996), por possuir habitat arbóreo estaria menos sujeita aos vetores. Já para Bufonidae, cujos relatos de encontro de hemogregarinas são comuns (Smith, 1996), relatamos apenas uma espécie positiva (*Rhinella schneideri*) (Leal et al., 2009). Devido às variações morfológicas e alterações citopatológicas nas células do vertebrado, pela não observação do ciclo biológico no vetor e pela não utilização da caracterização molecular, as espécies encontradas por nós não foram nomeadas (Leal et al., 2009).

### 2.2.2. Vetores

Os vetores para *Hepatozoon* spp. englobam uma grande variedade de artrópodes como ácaros, triatomíneos, pulgas, piolhos e mosquitos. Todos, ao serem ingeridos pelo vertebrado, podem transmitir o parasita (Davies et al., 2004).

Além desta forma de infecção, o ciclo de *Hepatozoon* spp., também, pode envolver mais de três hospedeiros, ou seja, pode haver a presença de um hospedeiro paratênico, que são hospedeiros intermediários que contém a forma cística (latente) do parasita em seus órgãos (Desser, 1993). Smith, Desser e Martim (1994) puderam observar esse modo de infecção em *Hepatozoon sipedon* parasita de *Nerodia sipedon sipedon* (cobra d'água) envolvendo *Lithobates pipens*, *Cx territans* e *Culex pipiens*. No experimento, os dípteros se alimentaram do réptil e se infectaram. Posteriormente, estes mosquitos foram oferecidos à rãs,

que mais tarde apresentaram em seu fígado cistos dizóicos. Além disso, as serpentes que se alimentaram destas rãs contendo cistos desenvolveram macromerontes no fígado, pulmão e rim e micromerontes nos mesmos órgãos e, também, nos tecidos do coração (Smith, Desser e Martin, 1994). Em outra pesquisa desenvolvida no Brasil, Viana et al. (2012) estudaram o envolvimento de hospedeiros paratênicos (*L. chaquensis*, *L. podicipinus* e *Scinax nasicus*) na transmissão de *Hepatozoon caimani* para *Caiman caiman yacare* e *Caiman latirostris*. De acordo com os autores, *L. chaquensis* desenvolveu cistos de *H. caimani* no fígado, enquanto nas outras espécies de anuros os cistos não foram observados, não significando, contudo, que estas não podem atuar como hospedeiros paratênicos. Mas todos os anuros apresentaram gametócitos nos eritrócitos. Portanto, concluiu-se que estes hospedeiros, por coexistirem no mesmo ambiente dos jacarés e se alimentarem de mosquitos que hospedam o parasita, podem naturalmente funcionar como uma rota de transmissão do protozoário para estes répteis.

Além dos aspectos considerados acima, a transmissão ou não de um parasita pelo vetor envolve muitos fatores biológicos, químicos e fisiológicos (Ferguson e Smith, 2012). O relacionamento trófico entre mosquitos e rãs depende de uma seleção feita pelo inseto. Nesta seleção está envolvida uma série de mecanismos, como atração, repulsão, substâncias químicas eliminadas pela presa, além de pistas visuais e olfatórias (Ferguson e Smith, 2012).

Na literatura tem-se observado, com certa frequência, a associação de mosquitos *Cx. territans* na transmissão de hemoparasitas em anuros. Há alguns trabalhos que associam a prevalência de hemoparasitas em anuros machos, à vocalização na época de reprodução, ou seja, *Cx. territans*, assim como outras espécies, seriam atraídos por estes “chamamentos” e consequentemente transmitiriam os parasitas (Ferguson e Smith, 2012). Outra linha de estudo mostra que a prevalência maior de parasitas em machos anuros não se justifica, pois os mosquitos são ingeridos igualmente por machos e fêmeas, quando estes insetos chegam para se alimentar do sangue destes animais. Além destes fatores, a mudança sazonal também teria grande influência sobre a transmissão do parasita por mosquitos para o seu hospedeiro vertebrado. Por exemplo, *Lithobates sylvaticus* tem como característica a reprodução que dura somente duas semanas, portanto, o inseto só tem este tempo para se alimentar desta espécie, mas isto também gera um problema à transmissão do parasita, pois pode ser que o mesmo requeira mais tempo de amadurecimento dentro do invertebrado para que seja infectivo. Diante desta incompatibilidade temporal, o vetor passa a não ser um bom hospedeiro adequado para aquele parasita (Ferguson e Smith, 2012).

Outra característica observada em *Cx. territans* é que estes artrópodes não são atraídos pela abundância ou pelo tamanho de rãs. Em alguns casos, o relacionamento entre o mosquito e o vertebrado é desfeito pela liberação de substâncias repelentes que são produzidas pela pele do vertebrado, impedindo desta maneira que o mosquito se alimente de seu sangue e que, conseqüentemente, transmita o parasita (Ferguson e Smith, 2012).

Na pesquisa de Kim, Smith e Desser (1998), *Cx. territans* e *Cx. pipiens* foram utilizados como vetores de *Hepatozoon* spp. para *L. catesbeianus* (Desser, Hong e Martin 1995; Kim, Smith e Desser, 1998), *L. clamitans* e *L. pipiens* (Kim, Smith e Desser, 1998). Neste experimento foi observado que *Cx. pipiens*, depois de se alimentar dos anuros, chegava a desenvolver gamontes mas a infecção se debelava. Uma explicação para tal fato é que este díptero, em condições naturais, não se alimenta do sangue de rãs, preferindo aves, mamíferos e répteis. Outra provável explicação envolve a especificidade do parasita com seu hospedeiro definitivo. Mais tarde este experimento foi reproduzido por Harkness et al. (2010) utilizando outro hospedeiro vertebrado, *L. sylvaticus*, que é uma espécie próxima de *L. catesbeianus* e *L. clamitans*, além dos dípteros *Cx. pipiens* e *Cx. territans* como vetor para o *H. clamatae*. Neste estudo, tentou-se a transferência de *H. clamatae* de *L. clamitans* através de *Cx. territans* para *L. sylvaticus*, mas os gamontes não se desenvolveram nesta rã. Uma das explicações seria a resistência imunológica que este animal poderia apresentar frente a esta espécie de *Hepatozoon*. Enquanto que o outro vetor *Cx. pipiens* provou ser um hospedeiro definitivo experimental, desenvolvendo oocistos no túbulo de Malpighi, mas apenas em insetos que se alimentaram nas primeiras 2 h de sangue diluído em solução fisiológica. Este fato foi interpretado pelos autores como a perda de viabilidade do parasita decorrido o tempo de 2h de oferecimento do sangue. Além disso, é ressaltado pelos autores que *Cx. pipiens* não é encontrado na natureza alimentando-se do sangue de *L. sylvaticus*, portanto, não é um vetor importante para *H. clamatae*.

### 2.2.3. Caracterização molecular

Diante de todos os problemas em se nomear corretamente uma espécie, a aplicação da genética molecular no estudo destes hemoparasitas permitiu que os mesmos fossem mais bem caracterizados e agrupados filogeneticamente segundo sua semelhança, a nível molecular (Schlegel, 1991).

Pesquisadores passaram a utilizar sequências de nucleotídeos da região ITS, que são regiões altamente variáveis, permitindo, portanto, a separação de espécies de protozoários ou de populações estreitamente relacionadas (Cai et al., 1992), além dessa região, a pequena subunidade 18S rRNA tem também sido usada extensivamente para inferir relacionamentos filogenéticos entre diversos protozoários (Schlegel, 1991).

Kim, Smith e Desser (1998) estudaram as variações da região ITS-1 de *Hepatozoon* em *L. catesbeianus* e *L. clamitans* e seus vetores, provenientes de locais diferentes do Canadá. Nesta pesquisa foram encontradas variações de seis nucleotídeos entre os seis isolados de *H. clamitae* e *H. catesbeiana*, mas apesar destas variações, os autores decidiram separar estes hemoparasitas pelas suas diferenças morfológicas, efeitos citopatológicos no eritrócito do hospedeiro e na capacidade da espécie de parasitar um ou mais hospedeiros.

Outro estudo envolvendo as mesmas espécies de rãs da pesquisa de Kim, Smith e Desser (1998), mas coletadas em locais diferentes no Canadá foi realizado por Boulianne, Evans e Smith (2007). Neste estudo os autores encontraram diferenças morfológicas semelhantes às descritas no trabalho anterior e observaram fortes evidências moleculares que as duas espécies de *Hepatozoon* observadas nestes anuros eram realmente compostas por espécies distintas. Seguindo esta mesma linha, Barta et al. (2012), utilizando a sequência 18S rRNA com vários métodos de reconstrução filogenética, demonstraram que na subordem Adeleorina os gêneros monoxenos (*Adelina* e *Klossia*, família Adeleidae) e famílias heteroxênicas (Hepatozoidae, Karyolysidae, Hemogregarinidae e Dactylosomatidae) formam um clado monofilético, todos unidos biologicamente pela formação de um cisto no ciclo de vida, característica que pode ser ancestral para estes grupos. Diante disso, foi sugerido pelos autores que a sequência 18S rRNA pode ser uma ferramenta útil para identificar afiliação genérica de um parasita em particular, sem precisar recorrer ao conhecimento de seu desenvolvimento esporogônico.

### **3. Considerações finais**

A diversidade de formas de hemoparasitas tanto do gênero *Hepatozoon* como do gênero *Trypanosoma* no sangue de anfíbios anuros mostra que a utilização isolada de técnicas para seu estudo pode não produzir resultados satisfatórios. Portanto, há a necessidade da associação de características morfológicas e biológicas com as técnicas moleculares para que



se aproxime de um resultado esperado, ou seja, a variabilidade de formas do hemoparasita em seus hospedeiros pode não ser refletida geneticamente.

#### 4. REFERÊNCIAS

AYALA, S.C. Trypanosomes in wild California sandflies and extrinsic stages in *Trypanosoma bufophlebotomi*. **J. Protozool.**, v.18, p. 433-436, 1971.

BARDSLEY, J.E.; HARMSSEN, R. The trypanosomes of anura. In: DAWES, B. (Ed.). **Advance Parasitology**. London: Academic Press, 1973. v.7, p.1-73.

BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **J. Wildlife Dis.**, v. 20, n. 3, p.180-189, 1984.

BARTA, J.R.; BOULARD, Y.; DESSER, S.S. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern north american ranids in the context of host phylogeny. **Trans. Am. Microsp. Soc.**, v.108, p.6-20, 1989.

BARTA, J.R.; OGEDENGBE, J.D.; MARTIN, D.S.; SMITH, T.G. Phylogenetic position of the Adeleorinid Coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 59, n. 2, p. 171-180, 2012.

BARTLETT-HEALY, K.; CRANS, W.; GAUGLER, R. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: *Culicidae*). **J. Parasitol.**, v. 95, n. 2, p. 381-387, 2009.

BARROW, J.H. The biology of *Trypanosoma diemyctyli* (Tobey). I. *Trypanosoma diemyctyli* in the leech, *Batracobdella picta* (Verrill). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v.72, p. 197-216, 1953.

BLAUSTEIN, A.R.; WAKE, D.B.; SOUSA, W.P. Amphian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. **Conserv. Biol.**, v.8, n.1, p. 60-71, 1994.

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

BROOKS, D.R. Parsimony analysis in historical biogeography and coevolution: Methodological and Theoretical update. **Syst. Zool.**, v.39, p.14-30, 1990.

CAI, J.; COLLINS, M.D.; MCDONALD, V.; THOMPSON, D.E. PCR cloning and nucleotide sequence determination of the 18S rRNA genes and internal transcribed spacer 1 of protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1131, p. 317-320, 1992.

COSTA, S.C.G.; PESSOA, S.B.; PEREIRA, N.M.; COLOMBO, T. The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970 – A parasite of the common laboratory animal – The frog of the genus *Leptodactylus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 71, n.1/2, p.1-8, 1973.

CRANS, W.J. The blood feeding habits of *Culex territans* Walker. **Mosq. News**, v. 30, n. 3, p. 445-447, 1970.

CUNHA, A.M.; MUNIZ, J. Sobre o cyclo endogeno da Haemogregarina *Leptodactyli* Lésage 1908 (Karyolysis?). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.20, n. 2, p. 307-313, 1927.

DAVIES, A. J.; SMIT, N. J.; HAYES, P. M.; SEDDON, A. M.; WERTHEIM, D. Haemogregarina bigemina (Protozoa: apicomplexa: Adeleorina)- past, present and future. **Folia Parasitol. (Praha)**, v.51, p. 99-108, 2004.

DESSER, S.S.; MCIVER, S.B.; RYCKMAN, A. *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. **J. Parasitol.**, v. 59, n. 2, p. 353-358, 1973.

DESSER, S.S.; MCLVER, S.B.; JEZ, D. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. **Int. J. Parasitol.**, v. 5, p. 50-59, 1975.

DESSER, S.S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: KREIER, J.P. **Parasitic protozoa**. New York: Academic Press, 1993. v. 4, p. 247-272.

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

DESSER, S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **J. Parasitol.**, v.87, n.1, p.152-160, 2001.

DIAMOND, L.S. Study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of anura. **Wildlife Dis.**, v.44, p.1-77, 1965.

DUELMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of Amphibians**. New York: McCray-Hill, 1986 p.670.

FANTHAM, H.B.; PORTER, A.; RICHARDSON, L.R. Some Haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. **Parasitology**, v.34, p. 199 – 226, 1942.

FENG, L.S.; CHUNG, H.L. *Phlebotomus squamirostris* (Newstead), transmitter of *Trypanosoma bocagei* (França) in the toad, *Bufo bufo gargazians*. **Chinese Med. J.**, n. 3, p. 198-210, 1940.

FENG, L.S.; CHAO, C.S. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris*. **Chin. Med. J.**, v.62, p.210-217, 1943.

FERGUSON, L.V.; SMITH, T.G. Reciprocal trophic interactions and transmission of blood parasites between mosquitoes and frogs. **Insects**, v. 3, p. 410-423, 2012.

FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L.B. TAKATA, C.S.A.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M.G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v.19, p.1-16, 2007.

FRANÇA, C.; ATHIAS, M. Recherches sur les trypanomes des amphibiens. I. Les trypanosomes de la *Rana esculenta*. **Arch. de Inst. Bacteriol. (Camara Pestana)**, v.1, p.127-165, 1906.

FROST, D.R. (Ed.). **Amphibian Species of the world: Taxonomic and Geographical Reference** Lawrence: Allen Press Inc. And Association of Systematics Collections, 1985.

FROST, D.R. 2011. Amphibian species of the world 5.5. New York: American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> Acesso em: 01/08/2012.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the salivaria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.91, p.37-49, 1998.

HAYES, R.O. Host preferences of *Culiseta melanura* and allied mosquitoes. **Mosq. News**, v. 21, p. 179-187, 1961.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R; GIDLEY, J.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. A new lineage vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 431-443, 2005.

HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C.; STEVENS, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol. Phyl. Evol.**, v.44, p. 15-25, 2007.

HARKNESS, L.M.; DROHAN, A.E.; DICKSON, C.M.; SMITH, T.G. Experimental transmission of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleida) to the wood frog, *Rana sylvatica*, and to the mosquito *Culex pipiens*. **J. Parasitol.**, v. 96, n. 2, p. 434-436, 2010.

HEYER, R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, v.23, p.421-428, 1969.

HEYER, R. Variation within the *Leptodactylus podicipinus* – *wagneri* complex of frogs (Amphibia, Leptodactylidae). **Smithsonian Contrib. Zool.**, v. 546, p. 1-124, 1994.

JAKES, K.; O'DONOGHUE, P.J.; CAMERON, S.L. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* (Haemogregarina) *boigae*, *Hepatozoon* sp., *Haemogregarina clelandi* and *Haemoproteus chelodina* from Australian reptiles to other Apicomplexa based on cladistic analyses of ultrastructural and life-cycle characters. **Parasitology**, v. 126, p. 555-559, 2003.

KIM, B.; SMITH, T.G.; DESSER, S.S. The life history and host specificity of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleorina) and ITS-1 nucleotide sequence variation of *Hepatozoon* species of frogs and mosquitoes from Ontario. **J. Parasitol.**, v. 84, p.789-797, 1998.

KUDO, R. On the protozoa parasitic in frogs. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v.40, p.59-76, 1922.

LAVERAN, A.; MESNIL, F. **Trypanosomes et trypanosomiases**. Paris: Masson et Cie, 1912, p.861-870.

LEAL, D.D.M.; O'DWYER, L.H.; RIBEIRO, V.C.; SILVA, R.J.; FERREIRA, V.L.; RODRIGUES, R.B. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida:

Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States – Brasil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, n. 2, p. 199-206, 2009.

LEVINE, N.D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Boca Raton: CRC Press Incorporated, Florida, 1988. p. 115-134.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; TAKEDA, G.F.; SHAW, J.J.; TEIXEIRA, M.M. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v.128, p. 283-294, 2004.

MACHADO, A.; Pesquisas citológicas sobre o *Trypanozoma rotatorium* Gruby. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.3, p.108-135, 1911.

MARTIN, D.S.; DESSER, S.S. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro: a light and electron microscopic study. **Parasitol. Res.**, v. 77, p. 18-76, 1991.

MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Phylogenetic position of the giant trypanosomes *Trypanosoma chanttoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 3, p. 566-571, 2002.

MIRANDA-RIBEIRO, A. Os Brachycephalideos do Museu Paulista (com três espécies novas). **Rev. Mus. Paul.**, v. 12, n.8, p. 307-315, 1920.

MIYATA, A. Anuran trypanosomes in Kyushu and Rhyukyu island, with descriptions of six new species. **Trop. Med.**, v.20, p.51-80, 1978.

MOLYNEUX, D.I.I.; ASHFORD, R.W. (Eds). **The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania***: Parasites of man and domestic animals. London: Taylor & Francis, 1983. 294p.

MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. *Haemogregarina aegyptia* sp. nov. from Africa toads (*Bufo regularis*) and its relationship to *Haemogregarina tunisiensis* Nicolle, 1904. **Proc. Zool. Soc.**, v.1, p. 33-46, 1963.

MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. Development of *Haemogregarina boueti* in the toad *Bufo regularis*. **J. Protozool.**, v. 13, n. 2, p. 259-264, 1966.

MANSOUR, N.S.; MOHAMMED, A.H. *Haemogregarina faiyumensis* n. sp. in the toad *Bufo regularis* in Egypt. **J. Protozool.**, v. 13, n.2, p. 269-271, 1966.

MURPHEY, F.J.; BURBUTIS, P.P.; BRAY, D.F. Bionomics of *Culex salinarius* Coquillet.II. Host acceptance and feeding by adult females of *C. salinarius* and other mosquito species. **Mosq. News**, v.27, n. 3, p. 366-374, 1967.

MCGHEE, R.B.; COSGROVE, W.B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 140-173, 1980.

OVERATH, P.; RUOFF, J.; STIERHOF, Y.D.; HAAG, J.; TICHY, H.; DYKOVÁ, I.; LOM, J. Cultivation of bloodstream forms of *Trypanosoma carassii*, a common parasite of freshwater fish. **Parasitol. Res.**, v.84, p.343-347, 1998.

PEREIRA, N.M.; COSTA, S.C.G.; COLOMBO, T.; TRAVASSOS, J.M.C. Formas de cultura de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 – isolado da rã *Leptodactylus ocellatus* do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.71, n.4, p. 357-367, 1973.

PRADO, C.P.A.; UETANABARO, M.; LOPES, F.S. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brasil. **J. Herpetol.**, v. 34, n. 1, p. 135-139, 2000.

PRADO, C.P.A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C.F.B. Description of a new reproductive mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a review of the reproductive specialization toward terrestriality in the genus. **Copeia**, v.4, p. 1128-1133, 2002.

RAMOS, B.; URDANETA-MORALES, S. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. **Rev. Biol. Trop.**, v. 25, n. 2, p. 209-217, 1977.

RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v.132, p.215-224, 2006.

ROTHERMEL, B.B.; SEMLITSCH, R.D. An experimental investigation of landscape resistance of forest versus old-field habitats to emigrating juvenile amphibians. **Conserv. Biol.**, v.16, p.1324–1332, 2002.

SANTOS, A.R.S. **Fauna do Brasil: habitat e distribuição.** (Programa Ambiental A Última Arca de Noé). 2011. Disponível em: <<http://www.ultimaarcadenoe.com.br/habitat-e-distribuicao/>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

SCHIESARI, L.; GRILLITSCH, B.; GRILLITSCH, H. Biogeographic biases in research and their consequences for linking amphibian declines to pollution. **Conserv. Biol.**, v. 21, p.465-471, 2007.

SCHLEGEL, M. Protist evolution and phylogeny as discerned from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Eur. J. Parasitol.**, v. 27, 207-219, 1991.

SCORZA, J.V.; DAGERT, C. Sobre la sinonimia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. **Bol. Venez. Lab. Clin.**, v.3, p.29-36, 1958.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA 2012. Brazilian amphibians-list of species. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/> Acesso em: 1/08/2012.



SOUZA, M.A.; BORRIELLO FILHO, A. Uma nova hemogregrina no sangue de *Bufo crucifer* WIED, 1821 do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.72, p.275-282, 1974.

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

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

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

VICKERMAN, K. Diversity of the kinetoplastid flagelates. In: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D.A. (Eds). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976, p. 1-34.

WELLS, K.D. **The ecology and behavior of amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. 1148p.

WERNER, J.K. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. **J. Parasitol.**, v. 79, n. 3, p. 356-363, 1993.

WOO, P.T.K. The life cycle of *Trypanosoma chrysemydis*. **Can. J. Zool.**, v.47, p.1139-1151, 1969.

ŽIČHUS, T. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. **Acta Zool. Lituanica**, v.12, n.2, p.197-202, 2002.

**CARACTERIZAÇÃO DE *Hepatozoon* sp. EM *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus* PROVENIENTES DE DUAS REGIÕES DO PANTANAL, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.**

Denise Dutra Menezes Leal<sup>1✉</sup>, Carine Spenassato<sup>2</sup>, Vanda Lucia Ferreira<sup>3</sup>, Reinaldo José da Silva<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Martins Ribolla<sup>2</sup>, Karina dos Santos Paduan<sup>2</sup>, Lucia Helena O'Dwyer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Email: lealdenise@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900, Mato Grosso do Sul, Brasil.

## RESUMO

*Hepatozoon* spp. são parasitas que comumente infectam anfíbios anuros e artrópodes hematófagos. Possuem como uma das características a grande variabilidade morfológica e morfométrica e, devido a estas variações, a denominação correta da espécie é prejudicada. Assim, a visualização do ciclo esporogônico no vetor é a principal forma de resolver este problema. Recentemente, a utilização da genética molecular tem ajudado na denominação de espécies. Neste trabalho coletamos 145 anuros (68 *Leptodactylus chaquensis* e 77 *Leptodactylus podicipinus*) em dois diferentes locais de coleta, onde foram encontrados 18 (26,5%) *L. chaquensis* e 24 (31,3%) *L. podicipinus* positivos para o parasita. Além de gamontes, também foram observadas formas esquizogônicas nos órgãos dos animais. A diferença de prevalência entre os locais de coleta nas diferentes espécies de anuros não se mostrou estatisticamente significativa. Comparando os gamontes encontrados em cada espécie de anuro, observamos diferenças na morfologia. Infelizmente, não foi possível a comparação a nível molecular para *L. podicipinus* devido à pequena quantidade de sangue obtido, apenas *L. chaquensis* teve o DNA de seus parasitas sequenciados. Diante disso, vimos que embora a morfologia e morfometria do parasita em cada local coletado mostrassem diferenças, quando realizamos o sequenciamento, as amostras obtidas foram idênticas, ao passo que quando comparadas à espécies depositadas no GenBank, nossas amostras foram bem diferentes.

Palavras chave: Leptodactylidae, *Hepatozoon* spp., anuros, *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*.

## ABSTRACT

*Hepatozoon* spp. are parasites that commonly infect frogs and arthropod vectors. This species has variability in morphological and morphometric characteristics. Due to these variations the name of the species is thus impaired and only by visualizing the sporogonic cycle in vector can be solved this problem. Recently the use of molecular genetics has helped the denomination of species. In this work we collected 145 frogs (68 *Leptodactylus chaquensis* and 77 *Leptodactylus podicipinus*) in different sampling sites, where they were found 18 (26.5%) *L. chaquensis* and 24 (31.3%) *L. podicipinus* positive for parasites. Besides of gamonts, schizogonic forms also were seen in organs of animals. The positivity difference between the sites for different frog species were not significant. Comparing gamonts found in each species of anuran, we observed differences in morphology. Unfortunately it was not possible in the molecular level comparison for *L. podicipinus* due to small amount of blood obtained, just *L. chaquensis* have had their DNA sequenced parasites. Therefore, we have seen that, although the morphology and morphometry of the parasite collected at each site showed differences, the sequencing of these samples revealed identical species of *Hepatozoon*, and different compared to those from GenBank. We also emphasize that the collection points did not influence the presence of this parasite, even located at a distance of approximately 76 km apart one of other.

Keywords: Leptodactylidae, *Hepatozoon* sp., anurans, *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*

## 1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios anuros, por ocuparem tanto ambientes terrestres como aquáticos, são afetados comumente por ecto e endoparasitas. Dentre os hemoparasitas encontrados, podemos destacar o grupo das hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* (Barta e Desser, 1984).

Estes hemoparasitas apresentam grande diversidade morfológica e morfométrica de acordo com a espécie. Estas formas tão diversas no sangue de anuros fizeram com que pesquisadores do mundo todo nomeassem diferentes espécies que possivelmente representavam uma única espécie de *Hepatozoon* (Levine, 1988; Desser, 1995; Smith, 1996; Desser, 2001). Costa et al. (1973) no Brasil, relataram formas esquizogônicas nos órgãos de *Leptodactylus latrans* e *Leptodactylus pentadactylus* e formas esporogônicas no invertebrado (sanguessuga). Desser et al. (1995) foram os primeiros a relatarem experimentalmente o ciclo completo do hemoparasita no vertebrado (*Lithobates catesbeianus*) e o ciclo esporogônico no vetor (*Culex territans*). Posteriormente a este estudo, pesquisadores como Kim, Smith e Desser (1998) e Harkness et al. (2010) utilizaram a infecção experimental e compararam aspectos morfológicos, morfométricos e moleculares (Kim, Smith e Desser, 1998; Boulianne, Evans e Smith, 2007) dos parasitas encontrados.

Diante da problemática da identificação de parasitas sanguíneos observados em anuros, vários pesquisadores propuseram o estudo molecular de sequências 18S rRNA (regiões conservadas) (Haag, O'huigin e Overath, 1998; Martin et al., 2002) e ITS (regiões variáveis) para inferir relacionamentos filogenéticos entre diversos protozoários (Schlegel, 1991, Cai et al., 1992, Maia da Silva et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Ferreira et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivos, determinar a prevalência de *Hepatozoon* sp. em rãs *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus*, provenientes da região do Pantanal, MS - Brasil e caracterizar os parasitas por meio da morfologia, morfometria e análise molecular, afim de inferir as relações filogenéticas entre as amostras analisadas, bem como as diferentes espécies já descritas disponíveis nos bancos de dados.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

As coletas foram realizadas em duas localidades diferentes do município de Corumbá, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: Base de Estudos do Pantanal (BEP) (19°34'39"S e 57°0'44"W), localizada no Passo do Lontra e na Fazenda Nhumirim (centro de pesquisa),

localizada na sub-região de Nhecolândia (18°59'00”S e 56°39'00”w). Ficando os dois pontos de coleta a uma distância de aproximadamente 76 km um do outro (Figura 1).

A Sub-região região do Passo do Lontra pertencente à bacia hidrográfica do Rio Paraguai, situando-se na porção mais baixa da sub-bacia do rio Miranda, com influência do Rio Abobral. Com período de chuvas de novembro a março (Polizer, Lastória e Rondon, 2000).

Nhecolândia é caracterizada por um mosaico de lagoas salinas e de água doce, entremeando cordilheiras com vegetação florestal, e entre estas, corixos e vazantes, marcando corredores de vegetação de cerrado e de campo (Rodela, 2006). O clima na região pode ser definido por duas estações, o chuvoso, que ocorre de novembro a março e um período seco que ocorre de abril a outubro (Soriano e Alves, 2005).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Espécies de animais estudados**

Os anuros estudados pertencem às espécies *L. podicipinus* e *L. chaquensis*. Estes animais foram coletados nos meses de abril, novembro e dezembro de 2008 e janeiro de 2009.

A captura dos exemplares foi realizada com a mão, colocando os animais em sacos plásticos e levados ao laboratório, para posteriormente serem eutanasiados com uma dose elevada de anestésico (Tiopental Sódico).

A captura dos animais foi realizada sob a aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) n° 1608, localizada no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) n° 16696-1.

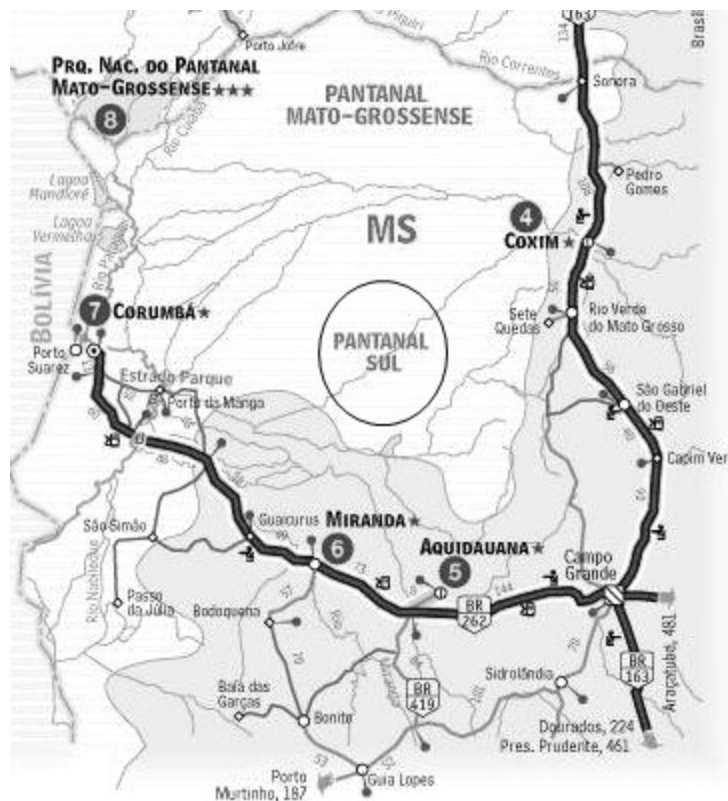


Figura 1. Mapa de localização do Pantanal e localização dos pontos de coleta (BEP e Fazenda Nhumirim). Fonte: [www.explorepantanal.com](http://www.explorepantanal.com)

### 3.2. Coleta de Material Biológico

O sangue foi retirado através de punção cardíaca, utilizando-se EDTA como anticoagulante. Deste sangue realizaram-se esfregaços sanguíneos que posteriormente foram fixados em metanol por 3 minutos e corados com May-Gruenwald-Giemsa (10%) por 30 minutos e examinados em microscópio óptico, aumento de 1000x, para o diagnóstico de hemoparasitas.

As amostras de sangue com EDTA foram congeladas a -20°C para realização dos estudos de caracterização molecular pela técnica de PCR.

Durante a necrópsia, *imprint* de órgãos (fígado, baço e rim) também foram realizados com o intuito de visualizar possíveis estágios esquizogônicos de *Hepatozoon* sp. Estas lâminas foram fixadas e coradas como descrito acima.

O material testemunho foi depositado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

### 3.3. Análise Morfológica e Morfométrica de *Hepatozoon* sp.

As análises morfológicas e morfométricas dos parasitas foram feitas em um microscópio com sistema computadorizado de análise de imagem (Qwin lite 2.5–Leica), as quais foram comparadas com outras espécies descritas na literatura.. As variáveis utilizadas no estudo foram analisadas através da Área (AP), do comprimento (CP) e da largura (LP) do parasita, tanto dos gamontes como de seus núcleos.

### 3.4. Caracterização Molecular

#### 3.4.1. Extração do DNA

O DNA total foi extraído através do “Kit Ilustra™ blood genomic Prep Mini Spin” (GE Healthcare®), misturando-se 10 µl do sangue total a 20µl de Proteinase K e 500 µl de solução lise, deixando a mistura a 58°C, por 4 horas, seguidos de 15 minutos à 70°C. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para a coluna de centrifugação e centrifugado a 8000 rpm (rotação por minuto) por um minuto e em seguida adicionou-se 500 µl de solução lise, centrifugando a 8000 rpm por mais um minuto, adicionou-se 500 µl de álcool e centrifugou-se a 12000 rpm por três minutos, adicionou-se 50 µl de tampão de eluição (pré-aquecido à 70°C) e centrifugou-se a 8000 rpm por um minuto.



No caso de hospedeiros muito pequenos como *L. podicipinus*, nos quais não foi possível coletar o sangue, as lâminas foram raspadas. Para a extração de sangue das lâminas, foram feitas raspagem lavando-se com 500 µl de solução tampão lise. Posteriormente a esta etapa, todos os passos da extração descritos acima foram realizados normalmente. Depois de terminada a extração, as amostras foram mantidas no freezer à -20°C até o seu uso.

#### 3.4.2. Oligonucleotídeos testados para *Hepatozoon* sp.

Os oligonucleotídeos testados foram: região 18S rDNA (HEPF e HEPR) (Inokuma et al., 2002) e (HEMO I e HEMO II) (Perkins e Keller, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de primers usados para amplificação dos genes 18S rRNA de *Hepatozoon* sp.

PRIMER	PARASITA	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
HEPF/HEPR	<i>Hepatozoon</i> sp.	5'ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC3'/ 3'CTT ATT CCA TGC TGC AG5'	Inokuma et al. (2002)
HEMO I/HEMOII	<i>Hepatozoon</i> sp.	5'TAT TGG TTT TAA GAA CTA ATT TTA TGA TTG3'/ 3'CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG GTT CAC5'	Perkins e Keller (2001)

#### 3.4.3. Amplificação das amostras de DNA

Para a padronização da reação de PCR foram utilizadas metodologias existentes na literatura de acordo com o oligonucleotídeo a ser testado. A reação foi realizada em termociclador “My Cycler™ thermal cycler” (BioRad®), além disso foram feitos testes de gradiente de temperatura para que se chegasse a amplificação do fragmento ideal.

#### 3.4.4. Reação de PCR

Reação para um volume final de 20 µl: 10 µl de GoTaq Colorless Master Mix (GoTaq® DNA polimerase, 2X GoTaq Colorless Reaction buffer, pH 8,5; 400 µM dATP; 400 µM dGTP; 400 µM dCTP; 400 µM dTTP e 3 mM MgCl<sub>2</sub>) (Promega), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*), 1 µl do DNA total e H<sub>2</sub>O q.s.p. Todas as reações foram realizadas utilizando um controle negativo.

#### 3.4.5. Eletroforese

Para a visualização dos produtos amplificados, foram adicionados 8 µl da amostra com 2 µl de tampão para, posteriormente, serem adicionados ao gel. Os produtos da extração foram analisados por eletroforese em gel de agarose usando uma mini cuba horizontal Hoefer HE 33” (GE Healthcare®) contendo 40 ml de gel de agarose 1% (Uniscience) misturados com 6 µl de “Gelred™” (Biotium®) a 80V por 1h em tampão TAE (Tris-Ácido acético-EDTA). Os produtos foram observados através de um fotodocumentador “Major Science UVDI®” e em seguida fotografados com o auxílio de uma câmera digital Canon Power Shot G9™ (Canon®).

Todos os fragmentos gerados foram comparados com um marcador molecular de tamanho de 1000 pb (pares de base) (“Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder”, Fermentas®). Neste trabalho, as amostras positivas geraram um fragmento amplificado de tamanho aproximado ao descrito anteriormente na literatura.

#### 3.4.6. Purificação dos Produtos de PCR

Todos os produtos das amostras a serem sequenciadas, passaram por um processo de purificação, chamado de reação enzimática, onde se adicionou 2 µl da enzima “ExoSap IT” (GE Healthcare®) com 5 µl do produto de PCR, seguindo a recomendação do fabricante. Posteriormente estes produtos foram levados ao termociclador por 60 minutos a 37°C e 20 minutos a 80°C.

#### 3.4.7. Sequenciamento

As seqüências de DNA foram determinadas em sequenciador capilar “3500 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems) utilizando-se 1,9 µl de 5X “Save Money” (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl<sub>2</sub>), 0,5 µl “BigDye” Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction

Kit v. 3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 pmol do oligonucleotídeo *forward*, 4ng/μl do produto de PCR purificado e H<sub>2</sub>O q.s.p. para completar o volume final de 10 μl. As reações foram realizadas em termociclador “Eppendorf Master Cycler Gradient” (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com os ciclos de temperatura programados: 25 ciclos de 95°C por 10s, 50°C por 5s, 60°C por 4 min com rampa de 1°C/s, como indicado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para cada amostra foi realizada uma única reação com o oligonucleotídeo *forward*.

#### 3.4.8. Precipitação das reações de sequenciamento

Para reação de sequenciamento foram adicionados 80 μl de isopropanol 65%, incubando à temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugou-se à velocidade de 10000 rpm por 25 minutos em temperatura ambiente. Todos os tubos foram invertidos para a remoção do isopropanol, em seguida foram adicionados 200 μl de etanol a 70% e centrifugados à velocidade de 10000 rpm por cinco minutos à temperatura ambiente. Todo o etanol foi removido com auxílio de uma micropipeta. As amostras foram secas à temperatura ambiente e o DNA eluído em 2 μl de tampão de amostra contendo “Formamida HI-DI™” (Applied Biosystems) e Loading Buffer (25 mM EDTA pH 8,0, contendo 50 mg/ml Blue Dextran) (5:1). No momento da aplicação em sequenciador automático as amostras foram aquecidas a 95°C por cinco minutos e rapidamente transferidas para o gelo.

#### 3.4.9 Análise dos dados.

As sequências de bases geradas automaticamente foram alinhadas com auxílio do programa MERGER (<http://bioweb.pastuer.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) utilizado para produzir a sequência consenso de cada amostra de DNA.

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o programa Clustal X versão 1.83 (Thompson et al., 1994) com parâmetros padrão e com ajustes manuais quando necessários. As sequências alinhadas foram analisadas com auxílio do pacote de programas MEGA (Kumar et al, 2001). Métodos de distância (Neighbour-joining/NJ) foram utilizados na construção da árvore filogenética (Saitou e Nei, 1987). O teste de bootstrap foi aplicado para estimar o índice de consistência das análises de distâncias dos ramos da árvore de Neighbour-joining (Felsenstein, 1985).

### 3.5. Estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados o teste de Qui-quadrado (EPI INFO 6.0). O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Neste teste foi verificado se houve diferença significativa para a prevalência dos parasitas em relação aos locais de captura e também se houve diferenças significativas de prevalência entre as espécies de rãs e seus respectivos locais de coleta.

Para determinar as variações de desvio padrões entre as espécies de parasitas dos anuros utilizou-se a fórmula:  $cv$  (coeficiente de variação) =  $\sigma$  (desvio padrão) /  $\chi$  (média) x 100 (Costa Neto, 1994).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Locais de coleta

Na primeira região de coleta, BEP, foram coletados 73 anuros (38 *L. chaquensis* e 35 *L. podicipinus*), enquanto na Faz. Nhumirim foram coletados 72 anuros (30 *L. chaquensis* e 42 *L. podicipinus*), totalizando 145 animais capturados, 68 *L. chaquensis* e 77 *L. podicipinus*.

### 4.2. Animais positivos para *Hepatozoon* sp.

Os animais encontrados positivos em relação à espécie de *Leptodactylus* e local de coleta podem ser observados na tabela 2.

Dos 68 *L. chaquensis* capturados, oito (11,76%) animais foram positivos pela microscopia, de esfregaços sanguíneos ou órgãos, sendo que quatro foram coletados na BEP e quatro na Faz. Nhumirim. Pela técnica de PCR 18 (26,47%) animais foram positivos. Dentre as amostras positivas para *Hepatozoon* sp. pela técnica de esfregaço sanguíneo, três apresentaram resultado negativo pela PCR, mesmo com gamontes e esquizontes típicos de *Hepatozoon* sp.

Entre os 77 *L. podicipinus* capturados, dois (2,60%) foram positivos pela microscopia, de esfregaços sanguíneos ou órgãos, ambos coletados na Faz. Nhumirim. Pela técnica de PCR 24 (31,17%) animais foram positivos. Entre as amostras positivas em lâmina, por falta de material, uma amostra não foi submetida a PCR. Nestes animais, também, dentre as amostras positivas em lâmina, uma foi negativa em PCR, mesmo com esquizontes e gamontes presentes.

#### 4.3. Locais de coleta e animais parasitados pela técnica de PCR

Na BEP coletaram-se 73 animais, dos quais 21 (28,77%) foram positivos para *Hepatozoon* sp., 13(34,21%) *L. chaquensis* e 8 (22, 86%) *L. podicipinus*.

Na Faz. Nhumirim dos 72 animais estudados 21 (29,16%) foram positivos para *Hepatozoon* sp., cinco (16,67%) *L. chaquensis* e 16 (38%) *L. podicipinus* (Tabela 2)

Tabela 2. Prevalência para *Hepatozoon* pela técnica de PCR em *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus* coletados em duas regiões do Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Localidades	<i>Leptodactylus chaquensis</i>			<i>Leptodactylus podicipinus</i>			Total de Hosp. e Fazenda Nhumirim
	Número total hospedeiros N	Positivos microscopia N (%)	Positivos PCR N (%)	Número total hospedeiros N	Pos microscopia N (%)	Pos PCR N (%)	
BEP	38	4 (10,5)	13 (34,21)	35	0	8 (22,86)	73
Fazenda Nhumirim	30	4 (13,3)	5 (16,67)	42	2 (4,76)	16 (38)	72
TOTAL	68	8 (11,76)	18 (26,47)	77	2 (2,6)	24 (31,17)	145

Na análise estatística não foram encontradas diferenças significativas de prevalência entre os anuros coletados no BEP e coletados na Faz. Nhumirim ( $\chi^2 = 0$ ;  $p = 0,95$ ). O mesmo ocorreu para *L. chaquensis* coletados no BEP e Faz. Nhumirim ( $\chi^2 = 2,65$ ;  $p = 0,103$ ) e para *L. podicipinus* coletados nestes mesmos locais ( $\chi^2 = 2,07$ ;  $p = 0,15$ ).

#### 4.4. Caracterização morfológica de *Hepatozoon* sp.

Os gamontes de *Hepatozoon* apresentaram formas intraeritrocítica e extraeritrocítica. Estas formas eram variáveis, algumas mais arredondadas com o núcleo tomando toda a largura do gamonte, e outra com as extremidades arredondadas. Algumas vezes, o núcleo estava deslocado para periferia, com a cromatina nuclear variando de fragmentada a condensada. Os gamontes encontrados tinham o formato que variou de alongado a globular,

com o citoplasma basofílico e o núcleo variou de uma coloração azul acinzentada a rosa. Na grande maioria dos eritrócitos o núcleo deslocou-se para periferia, na presença do parasita (Figuras 2, 3,4 e 5). Não encontramos gamontes hipertrofiando os eritrócitos dos hospedeiros. As médias e desvios padrão da morfometria dos gamontes encontrados, estão na Tabela 3. A morfometria realizada dos gamontes mostrou que o coeficiente de variação (*cv*) foi relativamente maior em *L. chaquensis* do que em *L. podicipinus*.

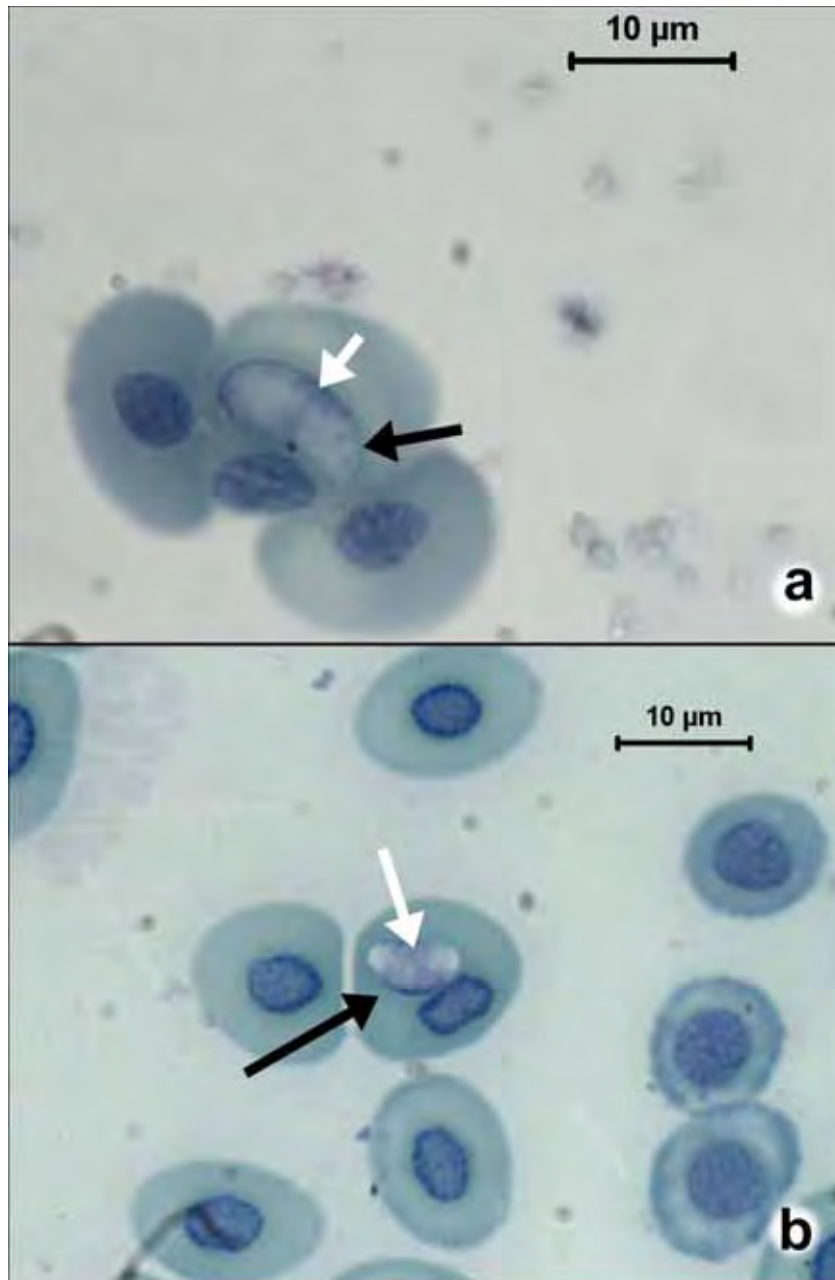


Figura 2. Gamontes intraeritrocíticos de *Hepatozoon* observados em *Leptodactylus chaquensis*, coletados na BEP. A seta branca indica o núcleo basofílico e condensado e a seta preta o gamonte.

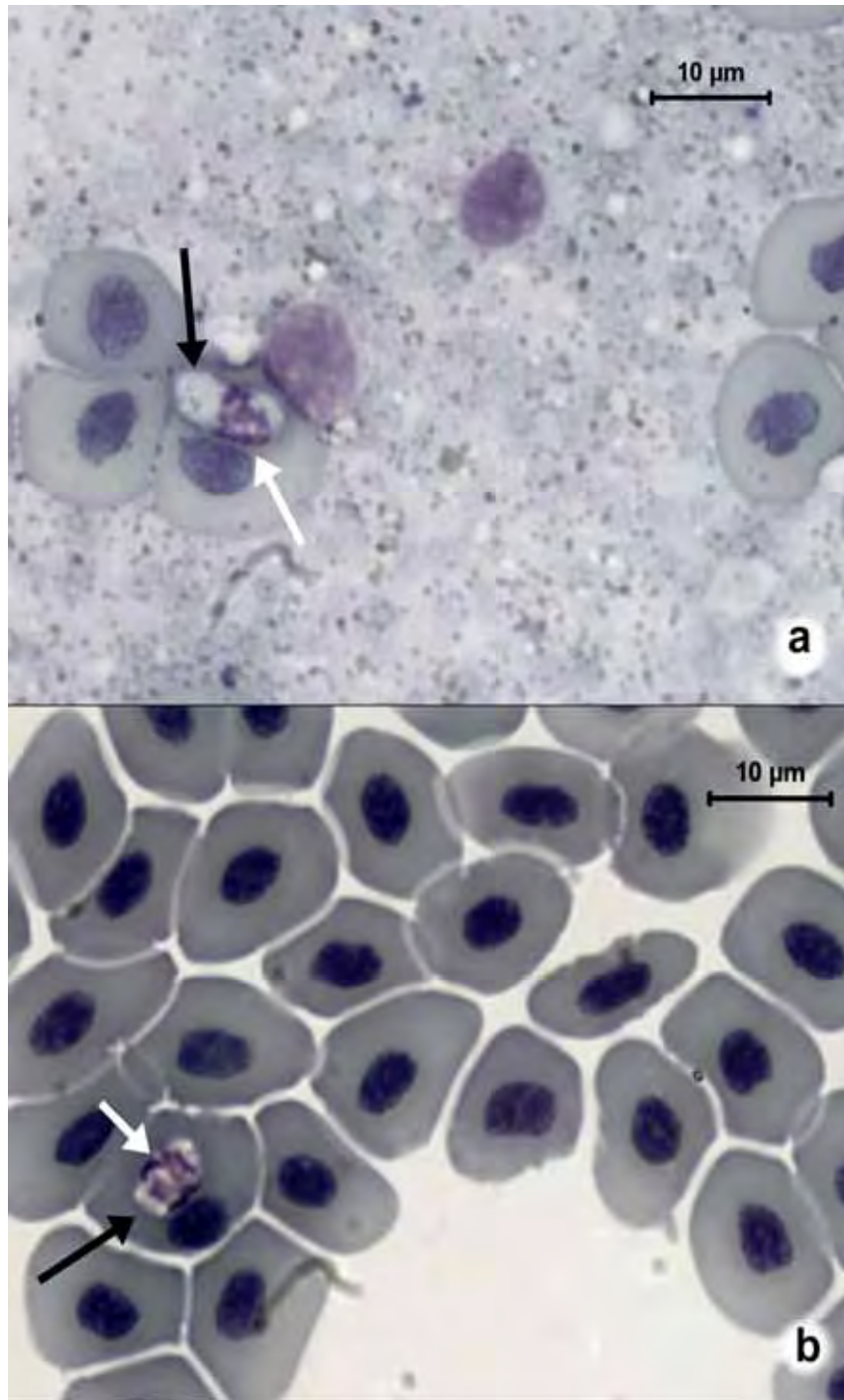


Figura 3. Gamontes intraeritrocíticos de *Hepatozoon* sp. observados em *Leptodactylus chaquensis*, coletados na Faz. Nhumirim. A seta branca indica o núcleo acidofílico e fragmentado e a seta (preta) indica o gamonte.

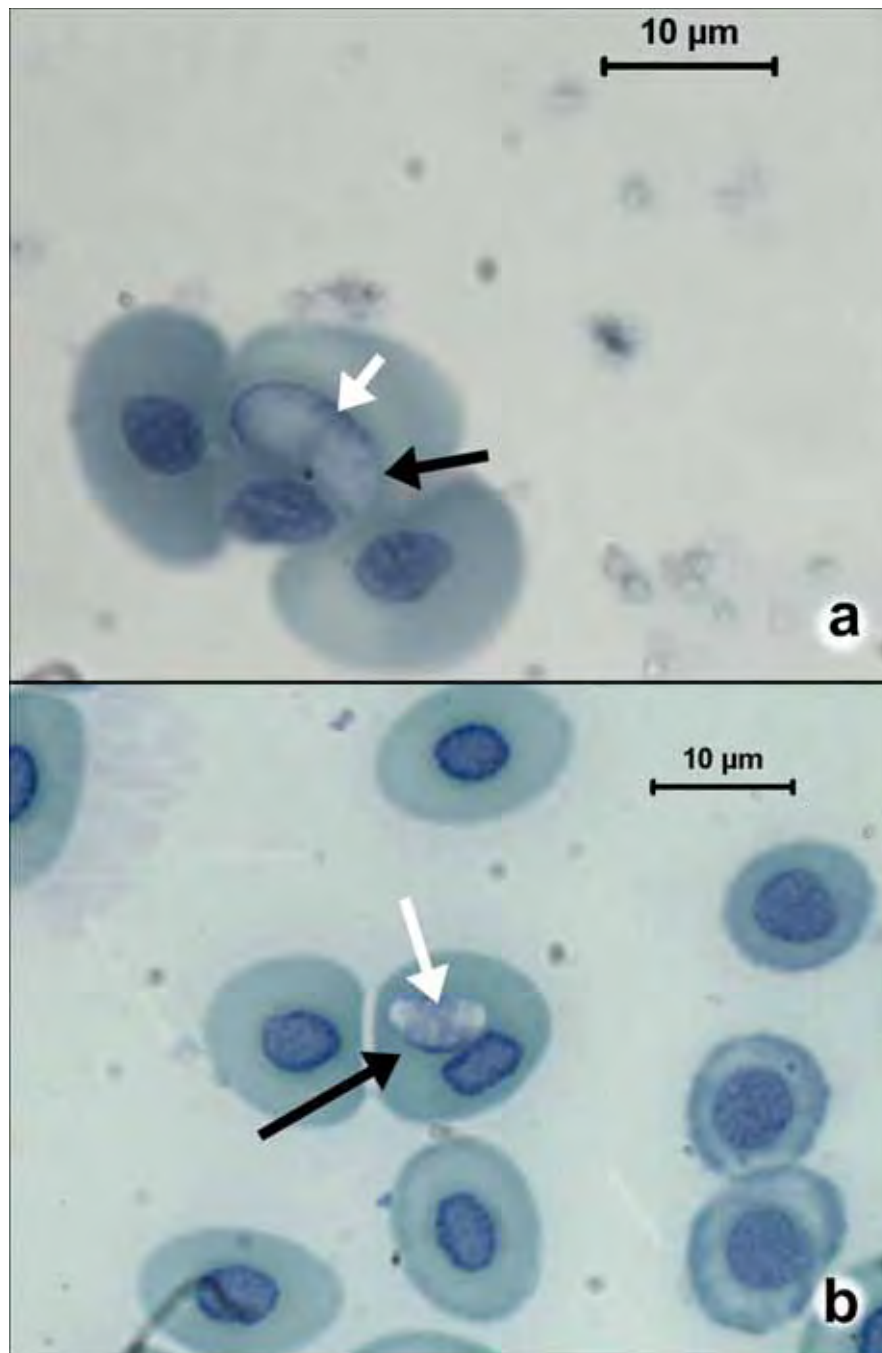


Figura 4. Gamontes de *Hepatozoon* sp. Em *Leptodactylus podicipinus* coletados na Faz. Nhumirim. a – gamontes intraeritrocíticos; b – gamonte extraeritrocítico. Seta (preta) indica os gamontes e seta (branca) o núcleo.



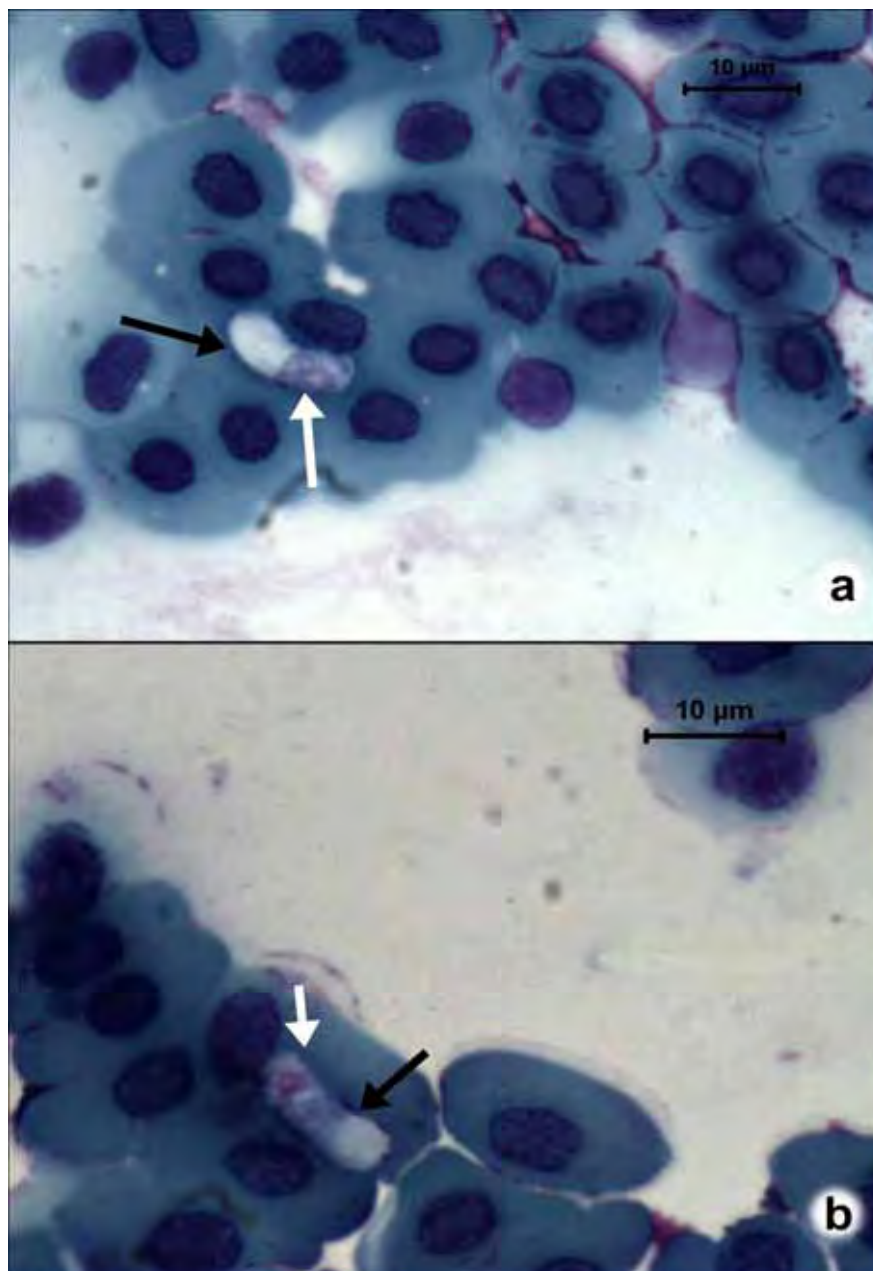


Figura 5. Gamontes de *Hepatozoon* sp. em *Leptodactylus podicipinus* coletados na Faz. Nhumirim. (a,b) - Gamontes intraeritrocíticos. Seta (preta) indica os gamontes e seta (branca) o núcleo.

Tabela 3. Parâmetros morfométricos de gamontes de *Hepatozoon* observados em *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus* coletados na Mato Grosso do Sul

ANIMAL PARASITADO	MORFOMETRIA DO PARASITA					
	AP ( $\mu\text{m}^2$ )	CP ( $\mu\text{m}$ )	LP ( $\mu\text{m}$ )	ANP ( $\mu\text{m}^2$ )	CNP ( $\mu\text{m}$ )	LNP ( $\mu\text{m}$ )
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	35,05 ± 9,96 (20,71 - 49,98)	9,68 ± 2,71 (4,89 - 13,91)	4,50 ± 0,67 (3,19 - 5,71)	16,25 ± 5,27 (6,69 - 27,78)	4,67 ± 1,38 (2,10 - 8,60)	4,18 ± 0,75 (2,73 - 5,43)
cv	28,42%	28%	14,88%	32,43%	29,55%	17,94%
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	43,77 ± 6,17 (30,15 - 49,20)	13,95 ± 3,34 (7,11 - 17,20)	4,60 ± 0,55 (3,97 - 5,79)	15,30 ± 3,93 (9,25 - 21,05)	4,71 ± 1,07 (2,28 - 6,02)	4,19 ± 0,46 (3,65 - 5,27)
cv	14,1%	23,94%	11,96%	25,69%	22,72%	10,98%

cv: coeficiente de variação; AP: área do parasita, CP: comprimento do parasita, LP: largura do parasita, ANP: área do núcleo do parasita, CNP: comprimento do núcleo do parasita, LNP: largura do núcleo do parasita.

#### 4.5. Caracterização de formas parasitárias teciduais

Dentre os 145 animais capturados, foram realizados 133 *imprints* dos órgãos (baço, fígado e rim) de 51 *L. chaquensis* e 82 *L. podicipinus*, onde encontrou-se apenas quatro (3%) animais com esquizontes. Em *L. chaquensis* observou-se em três animais (5,88%), três esquizontes no fígado e dez no baço. Enquanto que *L. podicipinus* apresentou apenas um animal (1,22%) com um esquizonte no fígado. Gamontes também foram observados nos órgãos. Em *L. chaquensis*: foram observados em quatro animais (7,84%), seis gamontes no fígado, um gamonte no baço e um gamonte no rim, enquanto em *L. podicipinus* foram observados em dois animais (2,44%), um gamonte no baço e um gamonte no rim.

(Tabela 4).

Nestes órgãos encontraram-se esquizontes maduros com merozoítos e em número reduzido, onde se pode ver o parasita formado com seu núcleo (Figura 6), outros com merozoítos radialmente arranjados ao redor de um corpo residual (Figura 7a e b), e outro estágio de desenvolvimento com numerosos trofozoítos, ocupando uma cavidade de célula no fígado, por isso o espaço periférico observado (Figura 8a). Já os esquizontes imaturos continham numerosos núcleos no seu interior e ao redor do esquizonte pode-se observar uma

membrana dupla (Figura 8b). Os esquizontes encontrados estavam na fase imatura e madura do ciclo. As medidas morfométricas dos esquizontes se encontram na Tabela 5. A área do esquizonte foi calculada através do software Qwin lite 2.5-Leica.

Além de todas estas formas visualizadas nos órgãos, foram encontrados, também no fígado de *L. chaquensis* uma forma que se assemelhava a um macromeronte.

Tabela 4. Ocorrência de *Hepatozoon* sp. observados no baço, fígado e rim das rãs *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus*.

ANUROS	ANIMAIS POSITIVOS	ESTÁGIO DO PARASITA	ÓRGÃO		
			BAÇO	FÍGADO	RIM
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	4	gamonte	1	6	1
	3	esquizonte	10	3	-
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	2	gamonte	1	-	1
	1	esquizonte	-	1	-

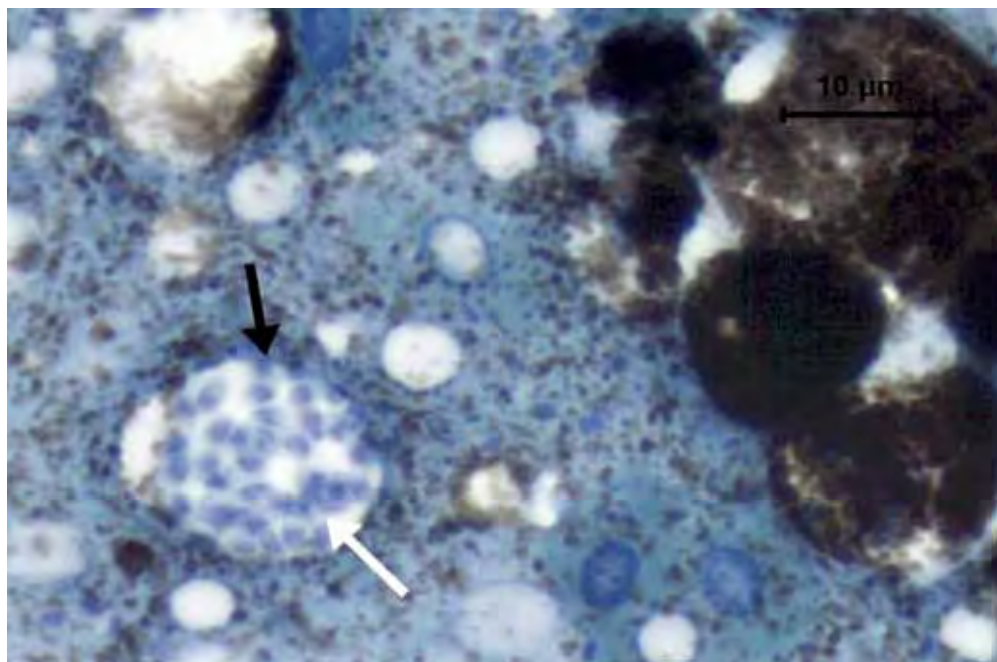


Figura 6. Esquizonte maduro presente no fígado de *Leptodactylus chaquensis*. A seta preta indica o esquizonte, e a seta branca os merozoítos.

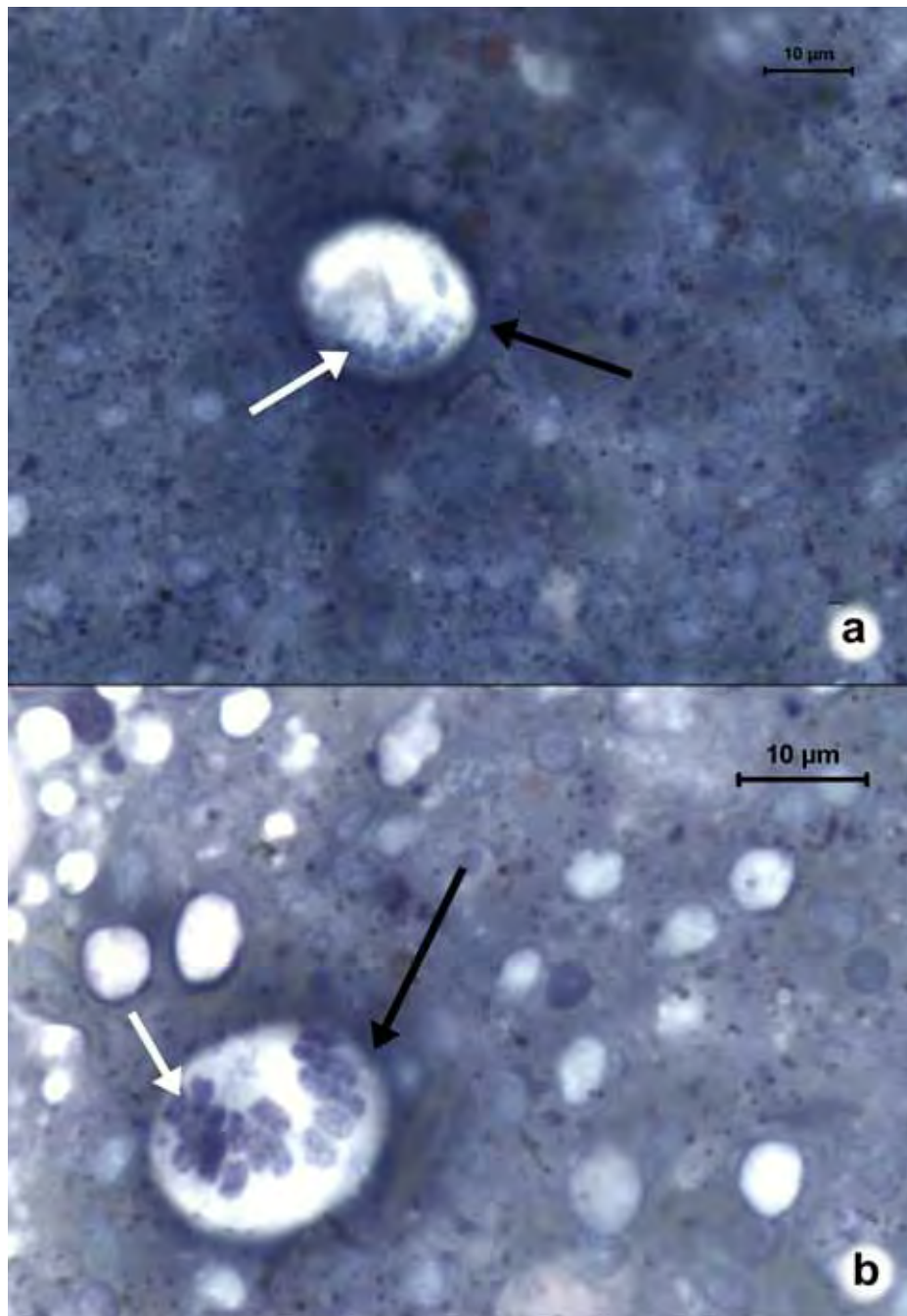


Figura 7. Esquizontes maduros no baço de *Leptodactylus podicipinus* (a e b). A seta preta indica os esquizontes, e a seta branca os merozoítos.



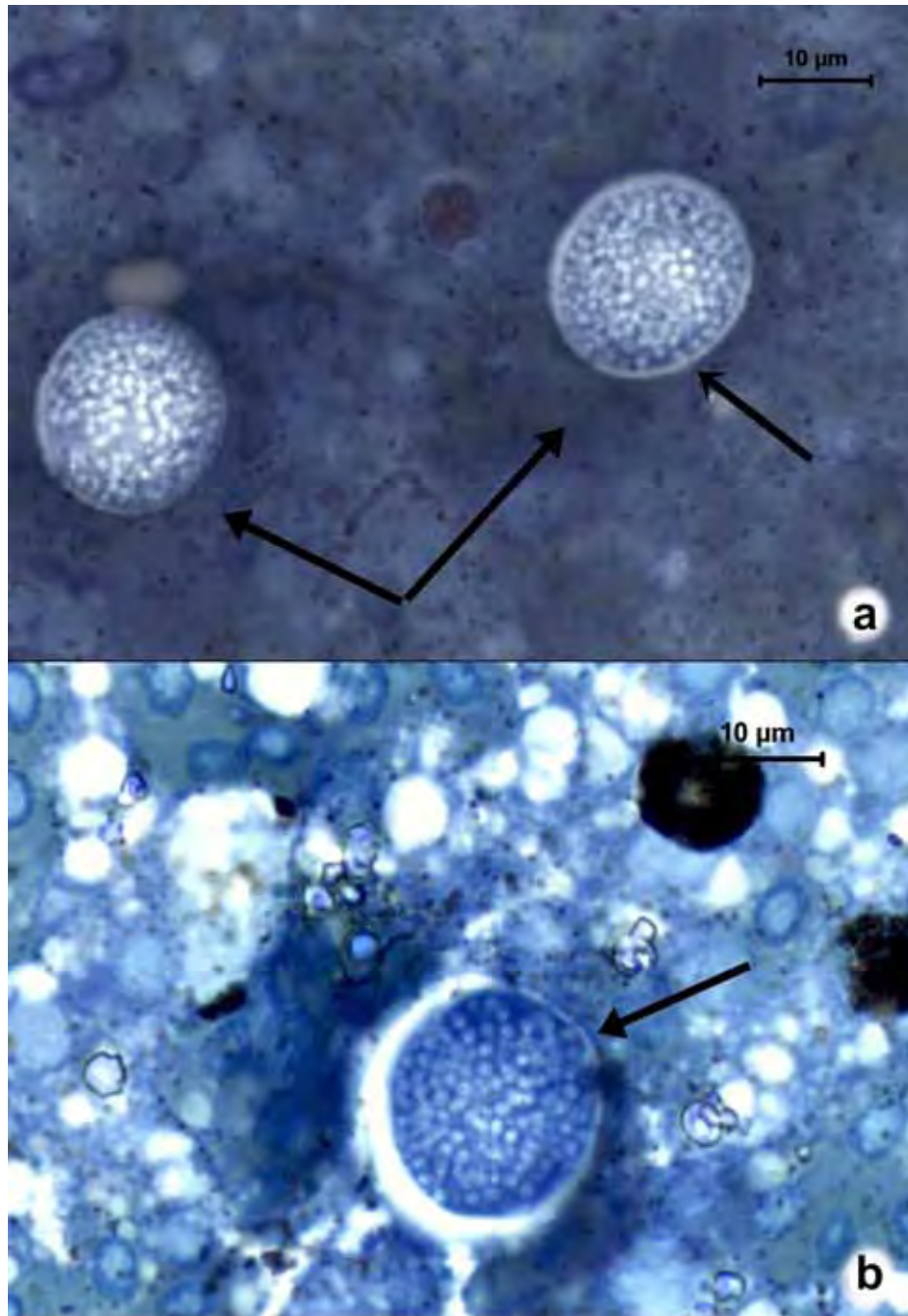


Figura 8. Esquizontes imaturos observados no baço (a) e fígado (b) de *Leptodactylus chaquensis*. A seta cheia (preta) indica os esquizontes, seta vazada indica a “linha dupla”.

Tabela 5. Parâmetros morfométricos de esquizontes no baço e fígado de *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus*.

<b>ESQUIZONTE</b>			
HOSPEDEIRO	ÁREA ( $\mu\text{m}^2$ )	COMPRIMENTO ( $\mu\text{m}$ )	LARGURA ( $\mu\text{m}$ )
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	491,20	24,98	24,59
	331,80	23,10	18,53
	223,50	17,17	16,64
	267,20	17,93	18,00
	574,70	25,37	29,71
	121,20	14,55	11,85
	270,46	20,21	17,80
	287,10	18,81	20,99
	237,20	18,17	17,99
	253,90	18,80	18,15
	256,50	17,77	18,54
	252,00	15,33	19,63
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	168,80	13,37	17,27
$\chi \pm \sigma$	$287,35 \pm 121,92$	$17,95 \pm 3,19$	$18,75 \pm 4,08$

#### 4.6. Oligonucleotídeos e Caracterização molecular

A utilização dos primers HepF e HepR não foram capazes, neste estudo, de amplificar sequências de *Hepatozoon* sp. no tamanho do fragmento desejado de 625pb, embora várias tentativas de mudança na temperatura e concentração dos produtos da reação

de PCR tenha sido realizadas. Somente os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 foram eficientes na amplificação.

Todo o sequenciamento das 10 amostras só foi realizado para *L. chaquensis*. Não foi possível que o mesmo fosse realizado para *L. podicipinus*, pois a quantidade de DNA foi insuficiente.

Após as devidas padronizações, a utilização dos oligonucleotídeos HEMO I e HEMO II produziram produtos do tamanho esperado aproximado a 900pb (Figura 9).

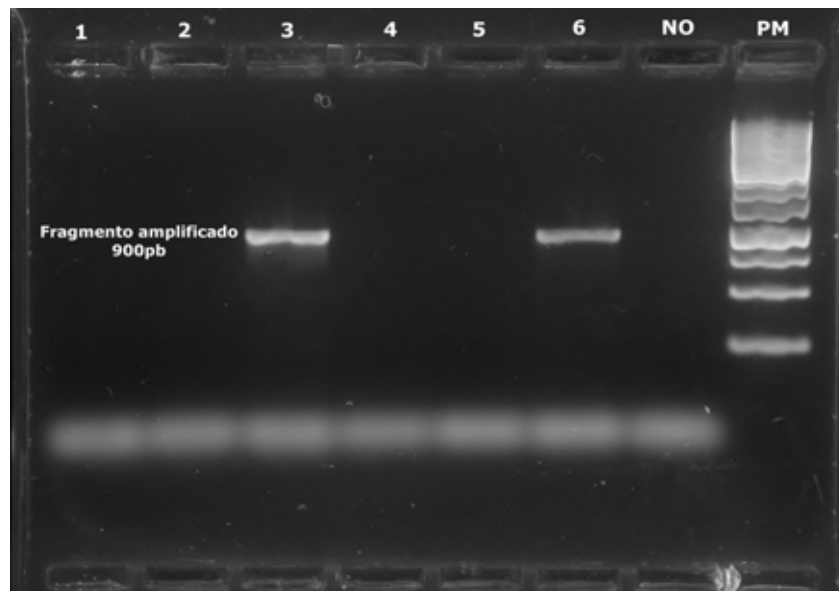


Figura 9. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp. amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2. Poços 3 e 6; NO: controle negativo; PM: peso molecular (1Kb) de 1000pb.

O completo alinhamento das sequências foi gerado pelo programa Clustal X (1.83), obtendo-se fragmentos de 861 pb onde encontrou-se 84 sítios polimórficos, sendo 24 posições informativas, as quais estão distribuídas pelos fragmentos gerados, nestes fragmentos foram observados 44 transições, 25 transversões, 12 inserções e 3 deleções (Figura 10).



19 52 55 60

HEP9 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP10 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP7 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP8 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP5 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP6 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP3 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP4 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP1 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 HEP2 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 Hepatozoon sp.boiga GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 Hepatozoon canis GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAC  
 Hepatozoon felis GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAC  
 Hepatozoon cf.catesbianae GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAT  
 Hepatozoon sp.DG1 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACAACTAC  
 Hepatozoon sp.Squirrel GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 Hepatozoon sp.BV1 GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 Hepatozoon ayorgbor GGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACACACTAC  
 \*\*\*\*\*

75

HEP9 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP10 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP7 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP8 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP5 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP6 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP3 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP4 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP1 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 HEP2 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon sp.boiga TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon canis TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon felis TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon cf.catesbianae TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon sp. DG1 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon sp.Squirrel TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon sp.BV1 TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Hepatozoon ayorgbor TCGCAAAGCATTGGCCAAAGATGTTTTCAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 \*\*\*\*\*

126 161 173

HEP9 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP10 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP7 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP8 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP5 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP6 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP3 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP4 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP1 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 HEP2 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon sp.boiga ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon canis ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon felis ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon cf.catesbianae ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon sp.DG1 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon sp.Squirrel ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon sp.BV1 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hepatozoon ayorgbor ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 \*\*\*\*\*

184 187  
 | 185 | 188  
 196 209 223 227  
 | | | |  
 HEP9 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP10 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP7 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP8 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP5 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP6 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP3 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP4 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP1 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 HEP2 CTTTATGCACGACTCCTTCAGCACCTTACAAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon sp.boiga CTTTAT**AA**ACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon canis CTT**AT**AAACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTT**AG**GTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens CTT**AT**AAACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTT**AG**GTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon felis CTTTAT**AA**ACGACTC**T**TTACGACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon cf.catesbiana CTT**AT**AAACGACTCCTTCAGCACCTT**T**GAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon sp.DG1 CTTTAT**AA**ACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon sp.Squirrel CTTTAT**AA**ACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGT**G**TTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon sp.BV1 CTTTAT**AA**ACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 Hepatozoon ayorgbor CTTTAT**AA**ACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGA  
 \*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

248 272 279  
 | | |  
 HEP9 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP10 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP7 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP8 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP5 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP6 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP3 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP4 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP1 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 HEP2 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon sp.boiga GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon canis GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon felis GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon cf.catesbiana GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon sp.DG1 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon sp.Squirrel GTATGGT**G**GCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATT**G**GACGG**G**AGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon sp.BV1 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hepatozoon ayorgbor GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

302 332 334 337 351 359  
 | | | | | |  
 HEP9 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP10 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP7 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP8 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP5 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP6 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP3 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP4 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP1 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 HEP2 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon sp.boiga CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAA**T**TACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon canis CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon felis CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon cf.catesbiana CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTC**A**C**T**AGGTCCAGACAT**A**AAAGGATTG  
 Hepatozoon sp.DG1 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon sp.Squirrel **C**GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGG**A**T**G**  
 Hepatozoon sp.BV1 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 Hepatozoon ayorgbor CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTG  
 \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

367 370                      386                              407

HEP9 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP10 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP7 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP8 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP5 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP6 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP3 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP4 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP1 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
HEP2 ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon sp. boiga ACAGATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon canis ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon sp. European Pine Martens ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon felis ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon cf. catesbiana ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon sp. DG1 ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon sp. Squirrel ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon sp. BV1 ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT  
Hepatozoon ayorgbor ACAGATTGA**T**AGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT

\*\*\*\*\* \*    \*\*\*\*\*

425 427 431                              457                              468

HEP9 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP10 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP7 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP8 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP5 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP6 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP3 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP4 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP1 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
HEP2 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon sp. boiga GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon canis GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon sp. European Pine Martens GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon felis GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon cf. catesbiana GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon sp. DG1 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon sp. Squirrel GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG**G**AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon sp. BV1 GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG  
Hepatozoon ayorgbor GGAGTG-ATTTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACG-AGACCTTAACCTTGCTAAATAGGG

\*\*\*\* \*    \*\*\*\*    \*\*\*\*\*

482 484 486 487 488 489 490 494                      500                              530                              537

HEP9 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP10 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP7 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP8 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP5 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP6 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP3 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP4 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP1 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
HEP2 TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
Hepatozoon sp. boiga TTA AAAACACATTTGTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGTTAACGCAAGG  
Hepatozoon canis TGA AAAAGC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon sp. European Pine Martens TGA AAAAGC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon felis TGA AAAAGC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon cf. catesbiana TTA AAAAC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon sp. DG1 TTA AAAAC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon sp. Squirrel TCA CA CAC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon sp. BV1 TTA AAAAC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG  
Hepatozoon ayorgbor TTA AAAAC--TTTTGTTTTAAAATTACTTCTTAGAAGGACTTTGC GTGCTAAACGCAAGG

\* \*                      \*\* \*\*\*\*\*

541

HEP9 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP10 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP7 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP8 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP5 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP6 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP3 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP4 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP1 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 HEP2 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon sp.boiga T AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon canis -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon felis -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon cf.catesbianae -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon sp. DGl -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon sp.Squirrel -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon sp.BV1 -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 Hepatozoon ayorgbor -AAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCTGCACGCCGCT  
 \*\*\*\*\*

604 606 614 632 636 637 640 642 645 657  
 HEP9 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP10 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP7 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP8 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP5 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP6 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP3 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP4 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP1 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 HEP2 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon sp.boiga ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon canis ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon felis ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon cf.catesbianae ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon sp. DGl ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon sp.Squirrel ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon sp. BV1 ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 Hepatozoon ayorgbor ACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTAGGTAATCTTTTGAAT  
 \*\*\* \* \*\*\*\*\* \*

662 667 670 673 676 697 702 710 711  
 HEP9 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP10 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP7 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP8 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP5 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP6 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP3 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP4 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP1 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 HEP2 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon sp.boiga GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGG--TGCTAGTA  
 Hepatozoon canis GTGCATCGTGATGGGAATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon sp.European Pine Martens GTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon felis GTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon cf.catesbianae GTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon sp.DGl GTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon sp.Squirrel GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon sp. BV1 GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 Hepatozoon ayorgbor GTGCATTGTGATGGGGATAGATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTAGTA  
 \*

```

      726      733      740
      |        |        |
HEP9  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP10 AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP7  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP8  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP5  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP6  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP3  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP4  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP1  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
HEP2  AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon sp.boiga AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon canis    AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon sp.European Pine Martens AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon felis    AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon cf.catesbianaes AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon sp.DG1   AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon sp.Squirrel AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon sp.BV1   AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
Hepatozoon ayorgbor AGCGCAAGTCATCAGCTTGGCGTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGC
*****

```

```

                                     813      827      833      834      838
                                     |        |        |        |        |
HEP9  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP10 TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP7  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP8  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP5  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP6  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP3  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP4  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP1  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
HEP2  TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon sp.boiga TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon canis    TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon sp.European Pine Martens TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon felis    TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon cf.catesbianaes TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon sp.DG1   TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon sp.Squirrel TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon sp.BV1   TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
Hepatozoon ayorgbor TCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTAATTTAGACTGTATTTATAGCAGTATTTGTATT
*****

```

```

      842      846      858      859
      |        |        |        |
HEP9  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP10 AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP7  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP8  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP5  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP6  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP3  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP4  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP1  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
HEP2  AGATATAGAAAAGTTTTGTGAA
Hepatozoon sp.boiga AGATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon canis    AAATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon sp.European Pine Martens AAATA-AGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon felis    AAATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon cf.catesbianaes AAATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon sp.DG1   AGATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon sp.Squirrel AGATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon sp.BV1   AGATATAGAAAAGTTTTGTAA
Hepatozoon ayorgbor AGATATAGAAAAGTTTTGTAA
* ** *

```

Figura 10. Alinhamento das sequências 18S rRNA de espécies de *Hepatozoon* sp. As variações encontradas estão localizadas nas respectivas linhas numeradas. Os locais invariáveis são denotados por \*, a cor vermelha representa a base que foi variável.

#### 4.7. Análise Filogenética

Todas as amostras amplificadas e sequenciadas de *Hepatozoon* sp. (HEP1 a HEP 10) geraram seqüências com 99% de *Bootstrap*. Todas as amostras, HEP1 a HEP10, apresentaram-se na árvore filogenética como um ramo separado das demais hemogregarinas descritas em outros hospedeiros. As amostras identificadas na rã apresentaram maior similaridade com o exemplar *Hepatozoon* sp. *Boiga* (trabalho não publicado) e estão em um ramo separado das demais seqüências descritas como: *Hepatozoon ayorgbor*, *Hepatozoon* sp. DG1, *Hepatozoon* sp. BV1, e em um ramo mais distante de *Hepatozoon cf. catesbiana*e (Figura 11). Na Tabela 6 estão as espécies de *Hepatozoon* com seus respectivos hospedeiros intermediários, utilizadas na construção da árvore filogenética.

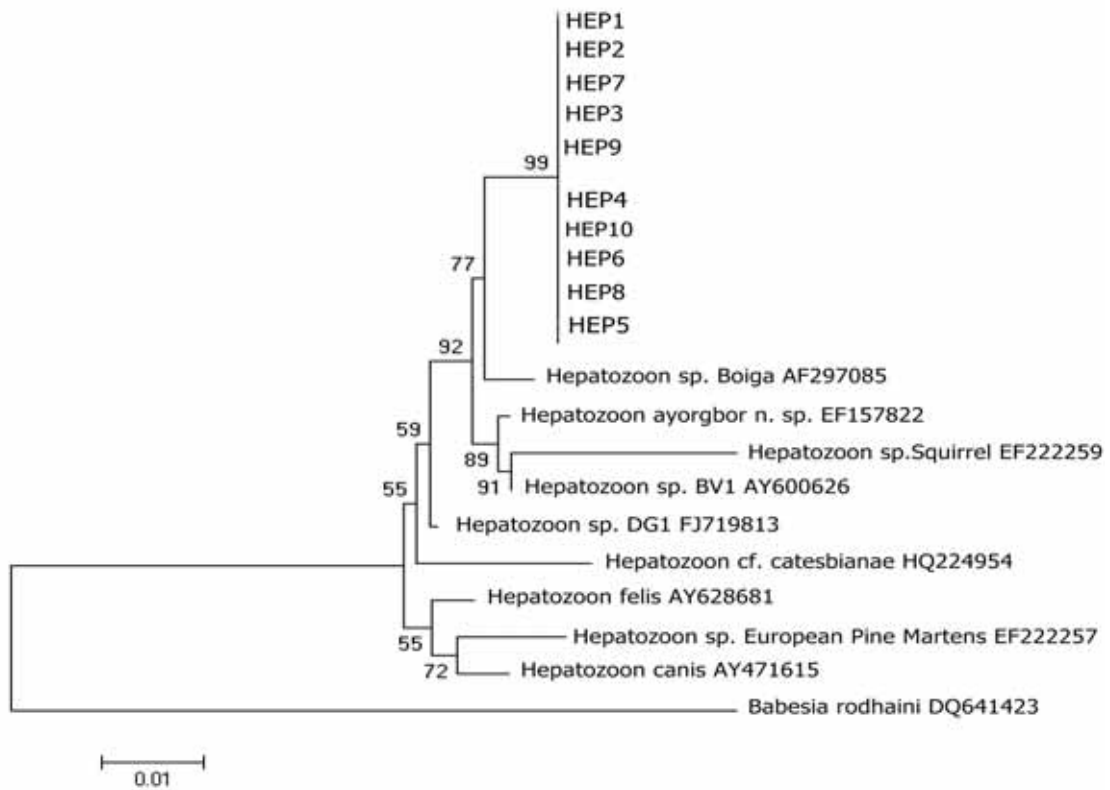


Figura 11. Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-joining obtida através da análise do gene 18SRNA de 10 amostras de *Hepatozoon* sp. Os números nos nós, indicam valores de *Bootstrap* para 1000 réplicas. A escala indica a distância evolucionária de 0,01 de nucleotídeos por posição na seqüência. Grupo externo: *Babesia rodhaini*

Tabela 6. Espécies utilizadas na análise filogenética, incluindo hospedeiro intermediário, localidade e número no GenBank.

HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS	PARASITA	LOCALIDADE	GENBANK
<i>Boiga</i> sp.	<i>Hepatozoon</i> sp. <i>Boiga</i>	Austrália	AF 297085
<i>Python regius</i>	<i>Hepatozoon ayorgbor</i> n. sp.	África	EF 157822
<i>Sciurus vulgaris</i>	<i>Hepatozoon</i> sp. Squirrel	Espanha	EF 222259
<i>Clethrionomys glareolus</i>	<i>Hepatozoon</i> sp. BV1	Espanha	AY 600626
<i>Dromiciops gliroides</i>	<i>Hepatozoon</i> sp. DG1	Chile	FJ719813
<i>Rana catesbeiana</i>	<i>Hepatozoon</i> cf. <i>catesbiana</i> e	Canadá	HQ 224954
<i>Felis catus</i>	<i>Hepatozoon felis</i>	Espanha	AY 628681
<i>Martes martes</i>	<i>Hepatozoon</i> sp. European Pine Martens	Espanha	EF 222257
<i>Pseudalopex gymnocercus</i>	<i>Hepatozoon canis</i>	Brasil	AY 471615
<i>Mus musculus</i>	<i>Babesia rodhaini</i>	-	DQ641423

## 5. Discussão

A presença de gamontes intraeritrocíticos de *L. chaquensis* e *L. podicipinus* mostraram variações morfológicas e alterações citopatológicas semelhantes às descritas em outros estudos (Fantham, Porter e Richardson, 1942; Mohamed e Mansur, 1963; Costa et al., 1973; Kim, Smith e Desser, 1998; Smith et al., 2000; Desser, 2001; Leal et al., 2009).

Na morfometria, os gamontes de *L. chaquensis* se apresentaram relativamente menores ao que foi relatado por Costa et al. (1973), que obtiveram gamontes mais longos e mais largos. No entanto, em relação a *L. podicipinus* o tamanho dos gamontes foi mais próximo ao destas rãs. Ressaltamos que os anuros pesquisados por Costa et al (1973) eram do gênero *Leptodactylus*.

A relação do desvio padrão, observados entre os gamontes nas duas espécies de anuros em nossa pesquisa, mostrou que os gamontes de *L. chaquensis* variaram mais em tamanho e foram menores em relação aos gamontes de *L. podicipinus*. Resultado similar, também, foi observado no nosso trabalho anterior (Leal et al., 2009) com estas mesmas espécies de rãs. Talvez os valores encontrados para esta variação de gamontes seja atribuível ao aparecimento simultâneo de diferentes estágios de desenvolvimento no sangue, fato que já foi relatado por Hull e Camin, (1960) e Clark e Bradford (1969). Características que também já foram observadas por Smith (1994) em *Nerodia sipedon sipedon*, parasitada por *Hepatozoon sipedon*, cujos répteis exibiam em sua circulação sanguínea muitos gamontes em fase imatura.

Na análise estatística, a prevalência de *Hepatozoon* sp. em *L. chaquensis* e *L. podicipinus* não sofreram influência do meio em que foram coletados. Este resultado é interessante, já que as duas regiões de coleta são muito diferentes, como descrito anteriormente. Ressaltamos que nesta análise, apenas o fator ambiente foi testado e outros fatores, como por exemplo, diferença sexual entre hospedeiros ou densidade de vetores não foram levados em consideração.

Para as amostras que foram negativas no PCR, mesmo com a presença de gamontes e esquizontes observados pela técnica de esfregaço sanguíneo, concluímos que talvez a técnica de raspagem para estas lâminas não tenha sido tão eficiente.

As formas de gamontes observadas em *L. chaquensis* foram mais homogêneas nos animais capturados na BEP com predomínio de gamontes de tamanho médio (Figura 2a e 2b). Já os animais capturados na Faz. Nhumirim apresentaram gamontes com maior variação, mostrando formas pequenas, médias e grandes (Figura 2c e 2d). Talvez, este pleomorfismo seja o resultado de pressões endógenas e exógenas sobre estes parasitas, ou seja, pressões externas sofridas pelo hospedeiro vertebrado que provocariam uma resposta fisiológica ou até mesmo alterações hormonais que consequentemente alteraria o meio em que o parasita está. Fato que ainda merece ser estudado.

Comparando os gamontes encontrados em cada espécie de anuro com o local de coleta, vimos que *L. chaquensis* apresentou gamontes que variaram no tamanho e na forma, apresentando citoplasma basofílico e núcleo condensado a fragmentado, variando de basofílico a acidofílico. No outro hospedeiro, *L. podicipinus*, os gamontes somente foram observados na Faz. Nhumirim, não sendo possível fazer a comparação entre os locais, no



entanto, as formas encontradas neste ponto de coleta foram mais homogêneas na sua morfologia, apresentando citoplasma e núcleo basofílicos.

Embora anuros sejam considerados hospedeiros paratênicos, não foram encontrados cistos nos órgãos que os pudessem designá-los como tal, apenas esquizontes foram observados e estavam presentes no baço e fígado, mostrando fases imatura e madura. Devido à baixa sensibilidade desta técnica, não podemos afirmar que os animais não tivessem cistos nos seus tecidos. Na pesquisa de Mohammed e Mansour, (1966); Levine e Nyer (1977) e Desser, Hong e Martin (1995) também foram observados esquizonte, no entanto, estes autores somente encontraram esquizontes no fígado.

As formas maduras de esquizontes observados em nosso trabalho foram semelhantes às relatadas por Mohammed e Mansour (1966) e Levine e Nyer (1977), porém, o tamanho era menor. Enquanto que, ao compararmos os esquizontes maduros relatados por Costa et al. (1973) no mesmo gênero de rãs, os esquizontes observados por nós eram relativamente maiores.

Além dos relatos de esquizontes nos órgãos de *L. podicipinus*, no *imprint* de fígado observamos uma estrutura como sendo um macromeronte, que se assemelhou ao macromeronte de *H. sipedon*, encontrado em *N. sipedon sipedon* (cobra d'agua), animal proveniente do Canadá (Smith, Desser e Martin, 1994). O macromeronte possuía a morfologia circular com uma membrana dupla, contendo estruturas internas, que de acordo com Smith, Desser e Martin (1994) são macromerozoítos.

A morfologia e morfometria de nossas amostras de *L. chaquensis* evidenciaram diferenças de gamontes e esquizontes em relação aos dados da literatura, entretanto, ao analisarmos a árvore filogenética encontramos um alto grau de similaridade entre nossas amostras, formando um ramo separado. E apesar destes animais terem sido coletados em ambientes que possuíam características próprias e estavam aproximadamente de 76 km um do outro, isto não influenciou na espécie de parasita encontrada.

Ao analisarmos a árvore filogenética, observamos que *Hepatozoon* sp. *boigae* (*Boiga irregularis*) é um ramo que está mais próximo de nossas amostras e ao compararmos os fragmentos gerados dessa hemogregarina com nossas amostras encontramos poucas substituições entre elas. Apesar desta proximidade genética, esta espécie de *Hepatozoon* mostra algumas diferenças de seus gamontes em relação aos gamontes de nosso trabalho. *Hepatozoon* sp. *boigae* são intraeritrocíticos, não provocam a distensão da célula do

hospedeiro, porém causam o deslocamento do núcleo do eritrócito, além dos eritrócitos infectados se corarem de forma mais clara que as células não parasitadas (Jakes, O'donoghue e Cameron, 2003). Os gamontes observados em nossa pesquisa não foram preferencialmente eritrocíticos, e também não houve o clareamento da célula quando na presença do parasita.

Outra espécie de *Hepatozoon* que se posicionou em um ramo próximo ao nosso na árvore filogenética foi *Hepatozoon ayorgbor* n. sp. (*Phyton regius*), o qual também exibe algumas diferenças em relação aos gamontes. Esta espécie apresenta gamontes e núcleos mais longos e mais estreitos que as medidas observadas em nosso trabalho. Já os esquizontes, além de serem encontrados apenas no fígado, possuíam tamanho bem menor em relação aos descritos por nós (Sloboda et al., 2007).

Em relação a *H. cf. catesbiana*, embora seja uma espécie que esteja presente em *L. catesbeianus*, se posicionou em um ramo mais distante de HEP1 a HEP10, além de ser morfometricamente bem diferente. Fato que observamos no trabalho de Desser, Hong e Martin (1995) realizado com estes anuros, onde os gamontes encontrados são bem maiores morfometricamente que os descritos nesta pesquisa. Estes gamontes tinham o formato mais alongado, citoplasma basofílico e corado palidamente, o núcleo era compacto e central. Nossos gamontes não eram tão alongados e o núcleo, também, não era somente compacto e central, houve variações. Apenas o citoplasma dos gamontes se corou de maneira semelhante ao relatado pelos autores.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, os anuros não se comportaram como hospedeiros paratênicos, mas possuíam espécies próprias.

Ambas as espécies de analisadas tiveram alta prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp.

Não houve diferenças entre a positividade em relação aos dois locais de coleta.

As diferenças encontradas nos aspectos morfológicos e morfométricos entre a espécie de *Hepatozoon* de *L. chaquensis* observada neste estudo, em relação com as que foram aqui comparadas, evidenciam que nossas amostras são diferentes, tanto morfológica e morfometricamente quanto geneticamente, demonstrando, com isso, que a espécie de *Hepatozoon* deste hospedeiro pode representar uma espécie nova.

## 7. REFERÊNCIAS

- BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **J. Wildlife Dis.**, v. 20, n. 3, p.180-189, 1984.
- BOULIANNE, B.; EVANS, R.C.; SMITH, T.G. Phylogenetic Analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. **J. Parasitol.**, v. 93, n. 6, p. 1435:1441, 2007.
- CAI, J.; COLLINS, M.D.; MCDONALD, V.; THOMPSON, D.E. PCR cloning and nucleotide sequence determination of the 18S rRNA genes and internal transcribed spacer 1 of protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1131, p. 317-320, 1992.
- CLARK, G.W.; BRADFORD, J. Blood parasites of some reptiles of the Pacific northwest. **J. Protozool.**, v.16, p. 578-581, 1969.
- COSTA, S.C.G.; PESSOA, S.B.; PEREIRA, N.M.; COLOMBO, T. The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 1908) Pessoa, 1970 – A parasite of the common laboratory animal – The frog of the genus *Leptodactylus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 71, n.1/2, p.1-8, 1973.
- COSTA NETO, P.L.O. Estatística. Edgard Blucher LTDA (ed)., São paulo, 1994, 263p.
- DESSER, S.S.; HONG, H.; MARTIN, D.S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbiana* n. comb., an apicomplexan parasite on the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. **J. Parasitol.**, v.81, p.212-222, 1995.
- DESSER, S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **J. Parasitol.**, v.87, n.1, p.152-160, 2001.
- FANTHAM, H.B.; PORTER, A.; RICHARDSON, L.R. Some Haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. **Parasitology**, v.34, p. 199 – 226, 1942.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.
- FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L.B. TAKATA, C.S.A.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M.G. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v.19, p.1-16, 2007.

- HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the salivaria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.91, p.37-49, 1998.
- HARKNESS, L.M.; DROHAN, A.E.; DICKSON, C.M.; SMITH, T.G. Experimental transmission of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleida) to the wood frog, *Rana sylvatica*, and to the mosquito *Culex pipiens*. **J. Parasitol.**, v. 96, n. 2, p. 434-436, 2010.
- HULL, R.W.; CAMIN, J. H. Hemogregarines in snakes: The incidence and identity of the erythrocytic stages. **J. Parasitol.**, v. 46, n. 4, p. 515-523, 1960.
- INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 106, p. 265-271, 2002.
- JAKES, K.; O'DONOGHUE, P.J.; CAMERON, S.L. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* (*Haemogregarina*) *boigae*, *Hepatozoon* sp., *Haemogregarina clelandi* and *Haemoproteus chelodina* from Australian reptiles to other Apicomplexa based on cladistic analyses of ultrastructural and life-cycle characters. **Parasitology**, v. 126, p. 555-559, 2003.
- KIM, B.; SMITH, T.G.; DESSER, S.S. The life history and host specificity of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleorina) and ITS-1 nucleotide sequence variation of *Hepatozoon* species of frogs and mosquitoes from Ontario. **J. Parasitol.**, v. 84, p.789-797, 1998.
- KUMAR, S.K.; TAMURA, I.B.; JAKOBSEN, NEI, M. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**. v. 17, p.1244-1245, 2001.
- LEAL, D.D.M.; O'DWYER, L.H.; RIBEIRO, V.C.; SILVA, R.J.; FERREIRA, V.L.; RODRIGUES, R.B. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States – Brasil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, n. 2, p. 199-206, 2009.
- LEVINE, N.D.; NYE, R.R. A survey of blood and other tissue parasites of leopard frogs *Rana pipiens* in the United States. **J. Wildlife Dis.**, v. 13, p. 17-23, 1977.
- LEVINE, N.D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Boca Raton: CRC Press Incorporated, Florida, 1988. p. 115-134.

- MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; TAKEDA, G.F.; SHAW, J.J.; TEIXEIRA, M.M. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v.128, p. 283-294, 2004.
- MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Phylogenetic position of the giant trypanosomes *Trypanosoma chanttoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 3, p. 566-571, 2002.
- MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. *Haemogregarina aegyptia* sp. nov. from Africa toads (*Bufo regularis*) and its relationship to *Haemogregarina tunisiensis* Nicolle, 1904. **Proc. Zool. Soc.**, v.1, p. 33-46, 1963.
- MOHAMMED, A.H.; MANSOUR, N.S. Development of *Haemogregarina boueti* in the toad *Bufo regularis*. **J. Protozool.**, v. 13, n. 2, p. 259-264, 1966.
- PERKINS, S.L.; KELLER, A.K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. **J. Parasitol.**, v.87, n. 4, p. 870-876, 2001.
- POLIZER, M.; LASTÓRIA, G.; RONDON, M.A.C. Características físicas da região do Passo do Lontra. In: **I Simpósio Brasileiro de Recursos hídricos do Centro Oeste, Brasília, 2000**. Disponível em:  
< [www.abrh.org.br/novo/i\\_simp\\_rec\\_hidric\\_centrooeste\\_bsb10.pdf](http://www.abrh.org.br/novo/i_simp_rec_hidric_centrooeste_bsb10.pdf) > Acesso em: 10/11/2012.
- RODELA, L.G. 2006. Unidades de Vegetação e pastagens nativas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. 252p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2006, São Paulo.
- RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v.132, p.215-224, 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v 4, p.406-25, 1987.

SCHLEGEL, M. Protist evolution and phylogeny as discerned from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. **Eur. J. Parasitol.**, v. 27, 207-219, 1991.

SLOBODA, M.; KAMLER, M.; BULANTOVÁ, J.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Phyton regius* (serpentes: Phytonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. **J. Parasitol.**, v. 93, n. 5, p. 1189-1198, 2007.

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

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

SMITH, T.G.; KIM, B.; HONG, H.; DESSER, S.S. Intraerythrocytic development of species of *Hepatozoon* infecting ranid frogs: evidence for convergence of life cycle characteristics among apicomplexans. **J. Parasitol.**, v. 86, n. 3, p. 451-458, 2000.

SORIANO, B.M.A.; ALVES, M.J.M. Boletim agrometeorológico ano 2002 para a sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, brasil. Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 2005. 29p.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.C.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids. Res.**, v. 11, p. 4673-80, 1994.

**CARACTERIZAÇÃO DE *Trypanosoma* sp. EM *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus* PROVENIENTES DE DUAS REGIÕES DO PANTANAL, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.**

Denise Dutra Menezes Leal<sup>1✉</sup>, Carine Spenassatto<sup>2</sup>, Vanda Lucia Ferreira<sup>3</sup>, Reinaldo José da Silva<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Martins Ribolla<sup>2</sup>, Karina dos Santos Paduan<sup>2</sup>, Lucia Helena O'Dwyer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Email: lealdenise@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900, Mato Grosso do Sul, Brasil.

## RESUMO

Anuros são animais que estão em constante contato com o ambiente aquático e terrestre e esta dualidade faz com que fiquem vulneráveis a uma infinidade de ecto e endoparasitas presentes nestes locais. Dentre todos os parasitas que infectam estes animais, destacamos os do gênero *Trypanosoma*, que tem como vetores as sanguessugas e artrópodes hematófagos. A transmissão para o hospedeiro ocorre quando o vetor se alimenta do sangue do anuro ou quando estes são ingeridos pelo hospedeiro. No sangue destes animais, estes parasitas apresentam uma variabilidade muito grande de formas e isto acaba provocando dúvidas em relação às espécies observadas. No presente trabalho foram capturados 145 anuros (68 *Leptodactylus chaquensis* e 77 *Leptodactylus podicipinus*) em dois diferentes locais de coleta, onde foram encontrados 66 (97%) *L. chaquensis* e 55 (71,4%) *L. podicipinus* positivos para o parasita. Foram observados tripanossomas também nos órgãos destes anuros. Ao analisarmos as diferenças de positividade para o parasita entre as espécies de rãs estudadas, encontramos positividade significativa entre os pontos de coleta, mas quando separamos as espécies de anuros por locais, *L. chaquensis* não mostrou diferença significativa de positividade, mas em *L. podicipinus* ocorreu o oposto. Neste caso, pode estar agindo a especificidade vetor-parasita. Na PCR foram utilizados oligonucleotídeos IR1 e 5.8R que amplificaram fragmentos ao tamanho desejado de aproximadamente 500pb. Infelizmente, não foi possível o sequenciamento das amostras positivas em PCR.

Palavras chave: *Trypanosoma*, Caracterização molecular, *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*



## ABSTRACT

Frogs are animals that are in constant contact with the aquatic and terrestrial environment and thus vulnerable to a plethora of ecto and endo-parasites present in these locations. Of all the parasites that infect this hosts animals highlighted are those of the *Trypanosoma* genus, which has the bloodsucking leeches and arthropods as vectors. The transmission to the host occurs when the infected vector feeds on the blood of the anuran or when they are ingested by the host. In the blood of animals these parasites have a very large variability of shapes and this may cause doubts about the species when observed. Considering these aspects, this study examines the prevalence of *Trypanosoma* spp. in frogs *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus*, from the region of the Pantanal, MS – Brazil, as well as the association between morphology, morphometry and the molecular analysis. In this work we caught 145 frogs (68 *L. chaquensis* and 77 *L. podicipinus*) in different sampling sites, where were found 66 (97%) *L. chaquensis* and 55 (71,4%) *L. podicipinus* positive for parasites. Trypanosomes were observed also in the organs of frogs. By analyzing the differences in positivity among parasite species, we found significant positivity between the collection points, but when we separate the frog species by local, *L. chaquensis* showed no significant difference in positivity, but in *L. podicipinus* the opposite occurred. In this case, the vector-parasite specificity may be acting, although there are other explanations for this fact. The PCR primers were used to amplify IR1 and 5.8R fragments to the desired size of approximately 500bp. Unfortunately it was not possible sequencing of PCR-positive samples due to amplification of other than the desired fragments.

Keywords: *Trypanosoma*, Molecular characterization, *Leptodactylus chaquensis*, *Leptodactylus podicipinus*

## 1. INTRODUÇÃO

Os anfíbios anuros, por ocuparem tanto ambientes aquáticos como terrestres, são afetados comumente por ecto e endoparasitas. Dentre os hemoparasitas encontrados podemos destacar os do gênero *Trypanosoma* (Barta e Desser, 1984). Espécies deste gênero têm como hospedeiros definitivos as sanguessugas (Barrow, 1953; Woo, 1969) e os dípteros (Feng e Chao, 1943; Crans, 1970; Ayala, 1971; Desser, McIver e Jez, 1975; Healy, Crans e Gaugler, 2009). O parasita é comumente encontrado na circulação sanguínea de hospedeiros vertebrados e intestinos de sanguessugas ou artrópodes, ocorrendo a transmissão por via inoculativa ou por ingestão do vetor (Bardsley e Harmsen, 1973).

Geralmente as descrições das espécies de *Trypanosoma* na literatura são baseadas em aspectos morfológicos das formas tripomastigotas observadas na circulação sanguínea e tecidos do hospedeiro vertebrado e nas formas epimastigotas no vetor invertebrado (Haag, O'hUigin, Overath, 1998; Martin et al., 2002). As formas relatadas podem diferir no tamanho do corpo, na posição do núcleo e do cinetoplasto, bem como no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo.

O problema de identificação morfológica das espécies sempre esbarrou no pleomorfismo, fato que pode ser facilmente percebido em *Trypanosoma rotatorium*, uma espécie que já foi descrita em vários continentes e que, pelo fato de apresentar formas evolutivas diferentes no sangue do vertebrado, muitas vezes foi denominado erroneamente como outra espécie (Scorza e Dagert, 1958; França e Athias, 1906; Diamond, 1965; Miyata, 1978; Barta, Boulard e Desser, 1989; Werner, 1993).

Em pesquisas com anuros da Costa Rica, Desser (2001) também encontrou diferenças morfológicas. Foi relatado no gênero *Rana* nove tripanossomas morfolologicamente distintos, com cinco destas espécies em hospedeiros aquáticos. Dos oito tipos observados no sangue de anuros, somente dois eram suficientemente diferentes para serem designados como espécies: *Trypanosoma chattoni* e *Trypanosoma loricatum*. Segundo os autores, embora estas espécies tenham uma distribuição cosmopolita, ainda existem diferenças morfométricas e morfológicas do parasita que são encontradas em populações isoladas geograficamente de mesma espécie de rã e também entre diferentes espécies de hospedeiro, fato que ainda não foi explicado (Diamond, 1965; Woo, 1969; Bardsley e Harmsen, 1973; Miyata, 1978; Barta e Desser, 1984). De acordo com Martin et al. (2002) a variabilidade morfológica do parasita e a

falta de observação de seu ciclo de vida completo, leva o observador a identificar erroneamente a espécie.

Segundo Martin et al. (2002), embora dados moleculares e bioquímicos de tripanossoma de anuros sejam limitados, em seus estudos filogenéticos baseados nas sequências SSU rDNA, revelaram que *Trypanosoma fallisi*, *T. rotatorium*, *Trypanosoma ranarum*, *Trypanosoma neveulemairei* e *Trypanosoma mega* estão mais intimamente relacionados, com exceção de *T. chattoni* que está mais distante filogeneticamente destas espécies, mostrando que a morfologia diferente de *T. chattoni* correspondia a diferença genética.

De acordo com a literatura, apenas aspectos morfológicos isoladamente não conseguem dar uma “identidade” ao parasita, há a necessidade de se aliar características morfológicas e moleculares (Werner, 1993; Žičhus, 2002; Martin et al., 2002 e Leal et al., 2009).

Este trabalho teve como objetivo examinar a prevalência de *Trypanosoma* sp. em rãs *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus*, provenientes da região do Pantanal, MS - Brasil. Bem como caracterizar as espécies utilizando a morfologia, morfometria e análise molecular.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

As coletas foram realizadas em duas localidades diferentes do município de Corumbá, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: Base de Estudos do Pantanal (BEP) (19°34'39”S e 57°0'44”W), localizada no Passo do Lontra e na Fazenda Nhumirim (centro de pesquisa), localizada na sub-região de Nhecolândia (18°59'00”S e 56°39'00”w). Ficando os dois pontos de coleta a uma distância de aproximadamente 76 km um do outro (Figura 1).

A Sub-região de do Passo do Lontra pertencente à bacia hidrográfica do Rio Paraguai, situando-se na porção mais baixa da sub-bacia do rio Miranda, com influência do Rio Abobral. Com período de chuvas de novembro a março (Polizer, Lastória e Rondon, 2000).

Nhecolândia é caracterizada por um mosaico de lagoas salinas e de água doce, entremeando cordilheiras com vegetação florestal, e entre estas, corixos e vazantes, marcando corredores de vegetação de cerrado e de campo (Rodela, 2006). O clima na região pode ser definido por duas estações, o chuvoso, que ocorre de novembro a março e um período seco que ocorre de abril a outubro (Soriano e Alves, 2005).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Espécies de animais estudados**

Os anuros estudados pertencem às espécies *L. podicipinus* e *L. chaquensis*. Estes animais foram coletados nos meses de abril, novembro e dezembro de 2008 e janeiro de 2009.

A captura dos exemplares foi realizada com a mão, colocando os animais em sacos plásticos e levados ao laboratório, para posteriormente serem eutanasiados com uma dose elevada de anestésico (Tiopental Sódico).

A captura dos animais foi realizada sob a aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) n° 1608, localizada no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) n° 16696-1.

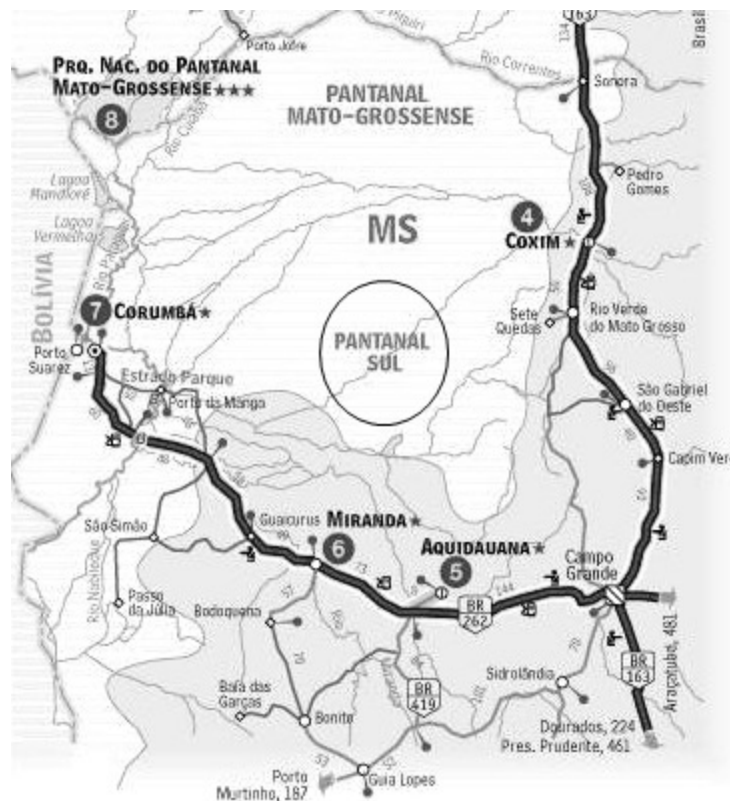


Figura 1. Mapa mostrando a localização dos pontos de coleta (BEP e Faz. Nhumirim). Mapa do Brasil político ([www.portalbrasil.net/brasil.htm](http://www.portalbrasil.net/brasil.htm))

### 3.2. Coleta de Material Biológico

O sangue foi retirado através de punção cardíaca, utilizando-se EDTA como anticoagulante. Deste sangue realizaram-se esfregaços sanguíneos que posteriormente foram fixados em metanol por 3 minutos e corados com May-Gruenwald-Giemsa (10%) por 30 minutos e examinados em microscópio óptico, aumento de 1000x, para o diagnóstico de hemoparasitas. As amostras de sangue com EDTA foram congeladas a -20°C para realização dos estudos de caracterização molecular pela técnica de PCR.

Durante a necrópsia, *imprint* de órgãos (fígado, baço, rim) foram confeccionados com o intuito de visualizar possíveis estágios tissulares de *Trypanosoma* sp. Estas lâminas foram fixadas e coradas como descrito acima.

O material testemunho está depositado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil.

### 3.3. Análise Morfológica e Morfométrica

Nos animais que foram positivos fizeram-se análises morfológicas e morfométricas dos parasitas, as quais foram comparadas com outras espécies descritas na literatura. Os parasitas foram analisados em um microscópio com sistema computadorizado de análise de imagem (Qwin lite 2.5–Leica) e as variáveis utilizadas no estudo foram: Área (AP), Comprimento (CP) e largura do parasita (LP); Distância da porção mais larga do parasita mais a membrana ondulante (L-MO); Área do núcleo (ANP); Distância da região anterior final do parasita ao meio do núcleo (A-N); Distância da região posterior final do parasita ao meio do núcleo (P-N); Distância do cinetoplasto a região anterior do parasita (K-A); Distância do cinetoplasto a região posterior do parasita (K-P); Distância do cinetoplasto ao meio do núcleo (K-N); Distância do cinetoplasto a porção final do núcleo (K-Np); Distância do parasita com o flagelo livre (D-F); Comprimento da membrana ondulante (CMO) e Comprimento do flagelo livre (CF).

### 3.4. Caracterização Molecular

#### 3.4.1. Extração do DNA

O DNA total foi extraído através do “Kit Illustra™ blood genomic Prep Mini Spin” (GE Healthcare®), misturando-se 10 µl do sangue total a 20 µl de Proteinase K e 500 µl de solução lise, deixando a mistura a 58°C, por 4 horas, seguidos de 15 minutos à 70°C.

Posteriormente, o conteúdo foi transferido para a coluna de centrifugação e centrifugado a 8000 rpm (rotação por minuto) por um minuto e em seguida adicionou-se 500 µl de solução lise, centrifugando a 8000 rpm por mais um minuto, adicionou-se 500 µl de álcool e centrifugou-se a 12000 rpm por três minutos, adicionou-se 50 µl de tampão de eluição (pré-aquecido à 70°C) e centrifugou-se a 8000 rpm por um minuto.

No caso de hospedeiros muito pequenos como *L. podicipinus*, nos quais não foi possível coletar o sangue, as lâminas foram raspadas. Para a extração de sangue das lâminas, foram feitas raspagem lavando-se com 500 µl de solução tampão lise, posteriormente a esta etapa, todos os passos da extração descritos acima foram realizados normalmente. Depois de terminada a extração, as amostras foram mantidas no freezer à -20°C até o seu uso.

#### 3.4.2. Oligonucleotídeos testados para *Trypanosoma* sp.

Os oligonucleotídeos testados foram: região ITS rDNA (IR1 e 5.8R) e região V7-V8 de SSU rDNA ( 609F e 706R) (Maia da Silva et al., 2004) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de primers usados para amplificação dos genes 18S rRNA de *Trypanosoma* sp.

PRIMER	PARASITA	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
609F/706R	<i>Trypanosoma</i> sp.	5'CAC GAG CAA AAT CTCAAT CTC AAC3/ 3'TTG AGG TTA CAG TCT CAG5'	Maia da silva et al. (2004)
IR1/5.8R	<i>Trypanosoma</i> sp.	5'GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT3/ 3'GGA AGC CAA GTC ATC CATC5'	Maia da silva et al. (2004)

#### 3.4.3. Amplificação das amostras de DNA

Para a padronização da reação de PCR foram utilizadas metodologias existentes na literatura de acordo com o oligonucleotídeo a ser testado, além disso foram feitos testes de gradiente de temperatura para que se chegasse a amplificação do fragmento ideal. A reação foi colocada em termociclador “My Cyclex™ thermal cyclex” (BioRad®).

#### 3.4.4. Reação de PCR

Reação para um volume final de 25 µl: 1xTampão (500 mM KCL, 200 mM Tris-HCL, pH 8,4), 0,7 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP, 10 pmol de cada oligonucleotídeo (*forward* e *reverse*), 1U “Platinum® Taq DNA Polymerase” (Invitrogen®), 2 µl de DNA e água q.s.p. Todas as reações foram realizadas usando um controle negativo.

#### 3.4.5. Eletroforese

Para a visualização dos produtos amplificados, foram adicionados 8 µl da amostra com 2 µl de tampão para, posteriormente serem adicionados ao gel. Os produtos da extração foram analisados por eletroforese em gel de agarose, usando uma mini cuba horizontal Hoefer HE 33” (GE Healthcare®) contendo 40 ml de gel de agarose 1% (Uniscience) misturados com 6 µl de “Gelred™” (Biotium®) a 80 V por 1h em tampão TAE (Tris-Ácido acético-EDTA). Os produtos foram observados através de um fotodocumentador “Major Science UVDI®” e em seguida fotografados com o auxílio de uma câmera digital Canon Power Shot G9™ (Canon®).

Todos os fragmentos gerados foram comparados com um marcador molecular de tamanho de 1000 pb (pares de base) (“Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder”, Fermentas®). Neste trabalho, as amostras positivas geraram um fragmento amplificado de tamanho aproximado ao descrito anteriormente na literatura.

#### 3.4.6 Análise dos dados.

As seqüências de bases geradas automaticamente foram alinhadas com auxílio do programa MERGER (<http://bioweb.pastuer.fr/seqanal/alignment/intro-uk.html>) utilizado para produzir a seqüência consenso de cada amostra de DNA.

As seqüências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o programa Clustal X versão 1.83 (Thompson et al., 1994) com parâmetros padrão e com ajustes manuais quando necessários. As seqüências alinhadas foram analisadas com auxílio do pacote de programas MEGA (Kumar et al, 2001). Métodos de distância (Neighbour-joining/NJ) foram utilizados na construção da árvore filogenética (Saitou e Nei, 1987). O teste de bootstrap foi aplicado para estimar o índice de consistência das análises de distâncias dos ramos da árvore de Neighbour-joining (Felsenstein, 1985).



### 3.4.7. Estatística

Para as análises estatísticas foram utilizados o teste do Qui-quadrado (EPI INFO 6.0). O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Neste teste foi verificado se houve diferença significativa para a prevalência dos parasitas em relação aos locais de captura e também se houve diferenças significativas de prevalência entre as espécies de rãs e seus respectivos locais de coleta.

Para determinar as variações de desvio padrões entre as espécies de anuros utilizou-se a fórmula:  $cv$  (coeficiente de variação) =  $\sigma$  (desvio padrão) /  $\chi$  (média) x 100 (Costa Neto, 1994).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Locais de coleta

Na primeira região de coleta, BEP, foram coletados 73 anuros (38 *L. chaquensis* e 35 *L. podicipinus*), enquanto na Faz. Nhumirim foram coletados 72 anuros (30 *L. chaquensis* e 42 *L. podicipinus*), totalizando 145 animais capturados, 68 *L. chaquensis* e 77 *L. podicipinus*.

### 4.2. Animais positivos para *Trypanosoma* sp.

Dos 68 *L. chaquensis* coletados, foram encontrados na análise microscópica de esfregaços sanguíneos ou órgãos 36 (52,94%) animais positivos. Na técnica de PCR realizada em 68 indivíduos, encontrou-se 66 (97,06%) animais positivos e um (1,47%) animal negativo e uma amostra foi contaminada na PCR.

Dos 77 *L. podicipinus* foram encontrados na análise microscópica 10 (12,99%) animais positivos. Na técnica de PCR realizada em 77 indivíduos, encontrou-se 55 (71,43%) animais positivos e 12 (15,58%) animais negativos e 10 amostras foram contaminadas no PCR.

### 4.3. Locais de coleta e animais parasitados

Na BEP coletaram-se 73 animais, dos quais 55 (75,34%) foram positivos para *Trypanosoma* sp., 36 (94,74%) *L. chaquensis* e 19 (54,28%) *L. podicipinus*.

Na Faz. Nhumirim coletaram-se 72 animais, dos quais 66 (91,67%) foram positivos para *Trypanosoma* sp., 30 (100%) *L. chaquensis* e 36 (85,71%) *L. podicipinus*.

A positividade dos animais em relação à espécie de *Leptodactylus* e local de coleta pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Positividade para *Trypanosoma* sp. em *L. chaquensis* e *L. podicipinus* coletadas em duas regiões do pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Localidades	<i>Leptodactylus chaquensis</i>			<i>Leptodactylus podicipinus</i>			Total de Hosp. e Fazenda Nhumirim
	Número total hospedeiros N	Positivos microscopia N (%)	Positivos PCR N (%)	Número total hospedeiros N	Pos microscopia N (%)	Pos PCR N (%)	
BEP	38	31 (81,5)	36 (94,74) <sub>a</sub>	35	9 (25,71)	19 (54,28) <sub>a</sub>	73
Fazenda Nhumirim	30	5 (16,67)	30 (100) <sub>a</sub>	42	1 (2,38)	36 (85,71) <sub>b</sub>	72
TOTAL	68	36 (52,94)	66 (97,06)	77	10 (12,99)	55 (71,43)	145

a - não houve diferença estatística, b - houve diferença estatística

Não foram encontradas diferenças significativas de prevalência para *L. chaquensis* coletados na BEP e Faz. Nhumirim ( $\chi^2 = 1,63$ ;  $p = 0,202$ ), já para *L. podicipinus* coletados nestes mesmos locais encontrou-se  $\chi^2 = 9,24$ ;  $p = 0,002$ , portanto um valor significativo.

#### 4.4. Caracterização morfológica de *Trypanosoma* sp.

Os tripanossomas encontrados foram polifórmicos nas formas observadas, apresentando desde aspectos ovais a mais alongados e finos. Algumas vezes, as extremidades apresentaram-se arredondadas na região anterior e posterior ao cinetoplasto. Foram vistas, algumas vezes, a formação de estrias na superfície do corpo do parasita. O núcleo, quando presente, apresentava-se na forma arredondada a alongada. O cinetoplasto, quando visível, se situava posteriormente ou na região do núcleo. A membrana ondulante, quando presente, estendia-se por todo o corpo do parasita, somente até a metade ou podia estar apenas na extremidade do tripanossoma. O flagelo se apresentou nas dimensões de curto a longo (Figuras 2, 3, 4, 5, 6,7, 8, 9, 10 e 11). As variações na morfologia puderam ser confirmadas através dos parâmetros morfométricos destes parasitas (Tabela 3). O coeficiente de variação foi maior em *L. chaquensis* do que em *L. podicipinus*.

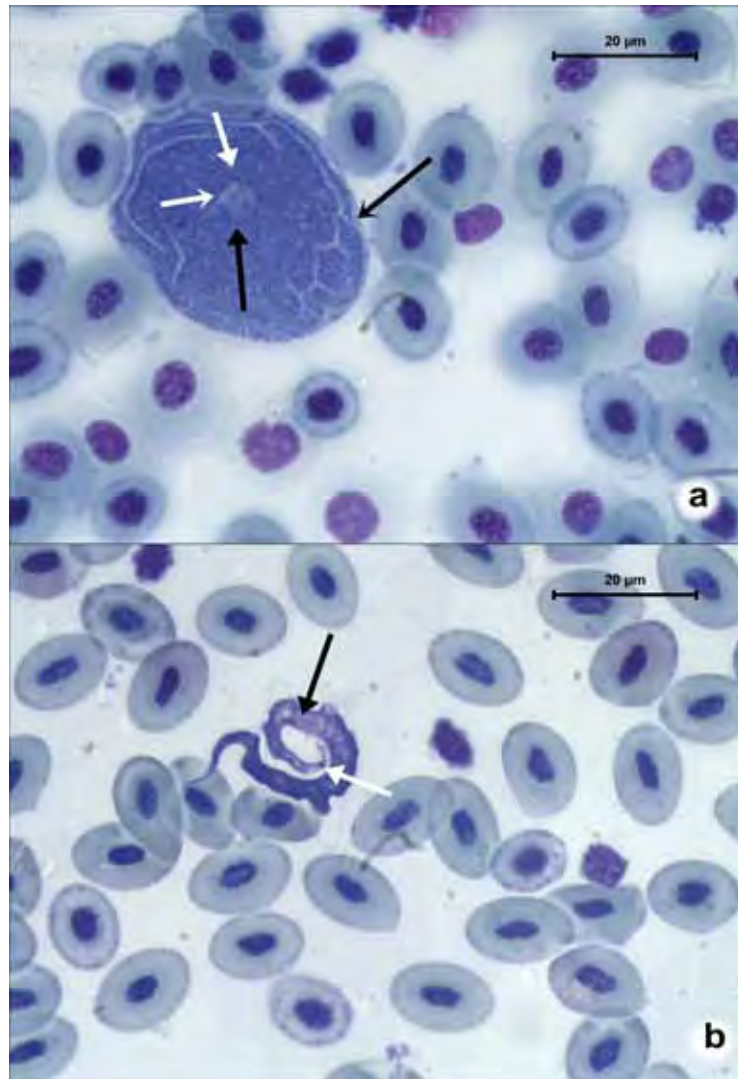


Figura 2. (a e b) - *Trypanosoma* sp. observado em *Leptodactylus podicipinus*. Seta cheia (preta) indica o núcleo, seta vazada (preta) as nervuras, seta cheia (branca) o cinetoplasto e a seta vazada (branca) o flagelo.

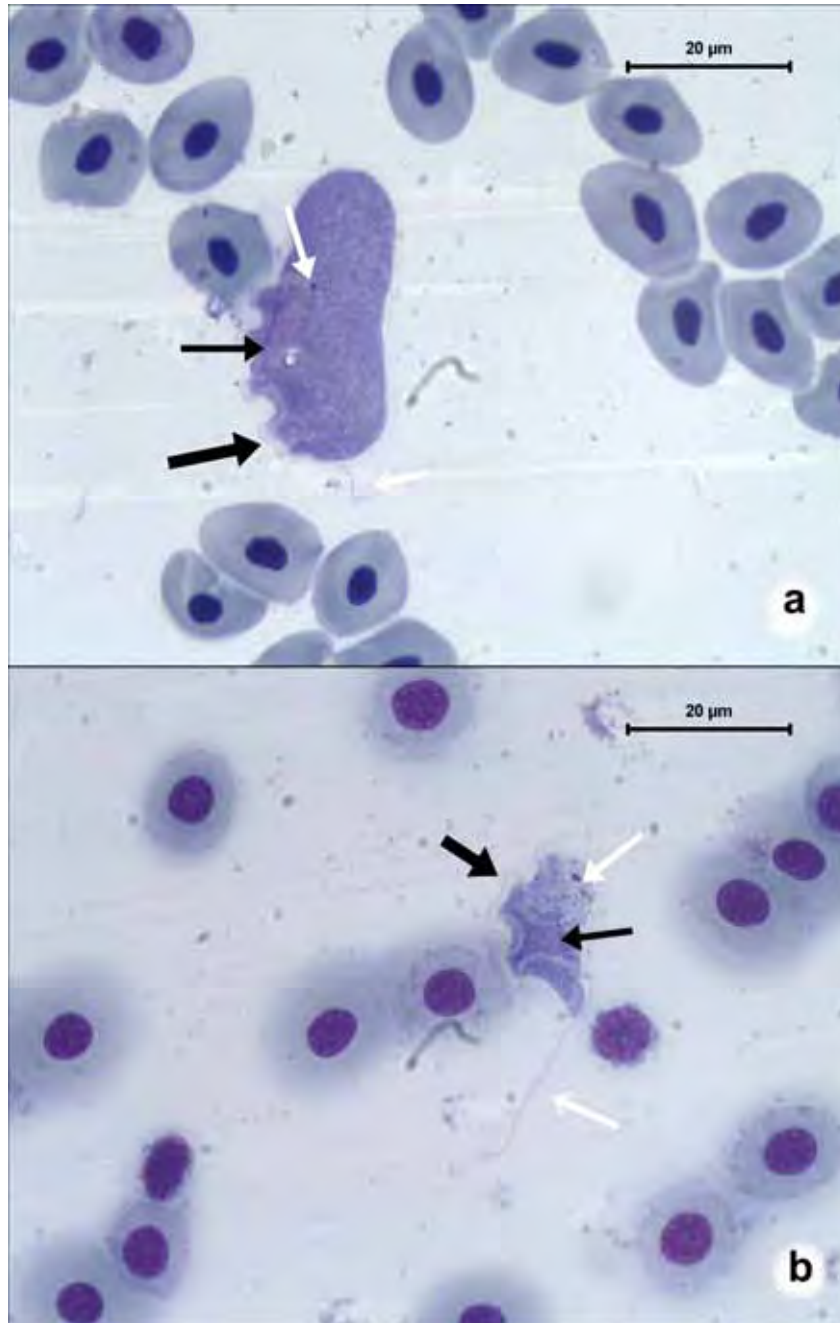


Figura 3. (a e b) - *Trypanosoma* sp. observado em *Leptodactylus podicipinus*. A seta fina (preta) indica o núcleo, seta cheia (branca) o cinetoplasto, seta grossa (preta) a membrana ondulante e a seta vazada (branca) o flagelo.

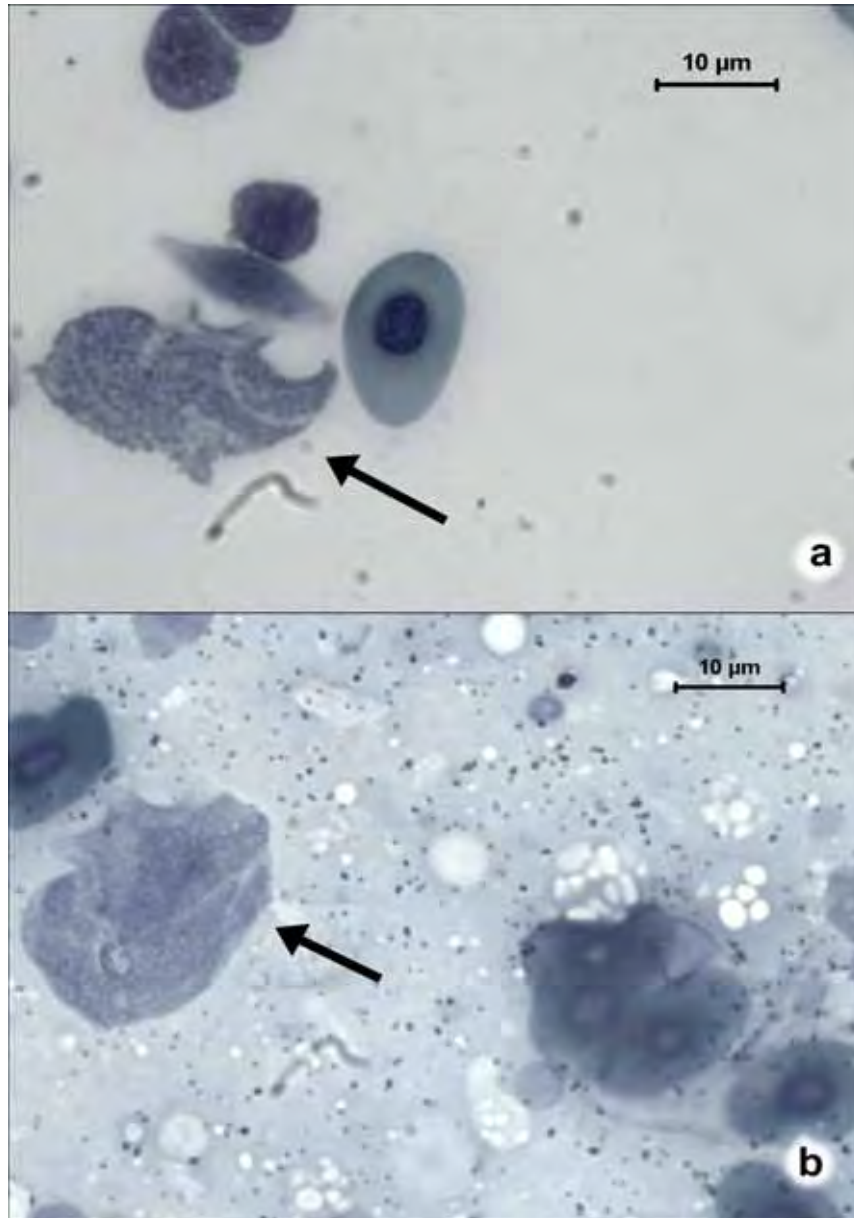


Figura 4. *Trypanosoma* sp. observados em *Leptodactylus podicipinus*. (a) sangue; (b) rim. A seta indica o tripanossoma.

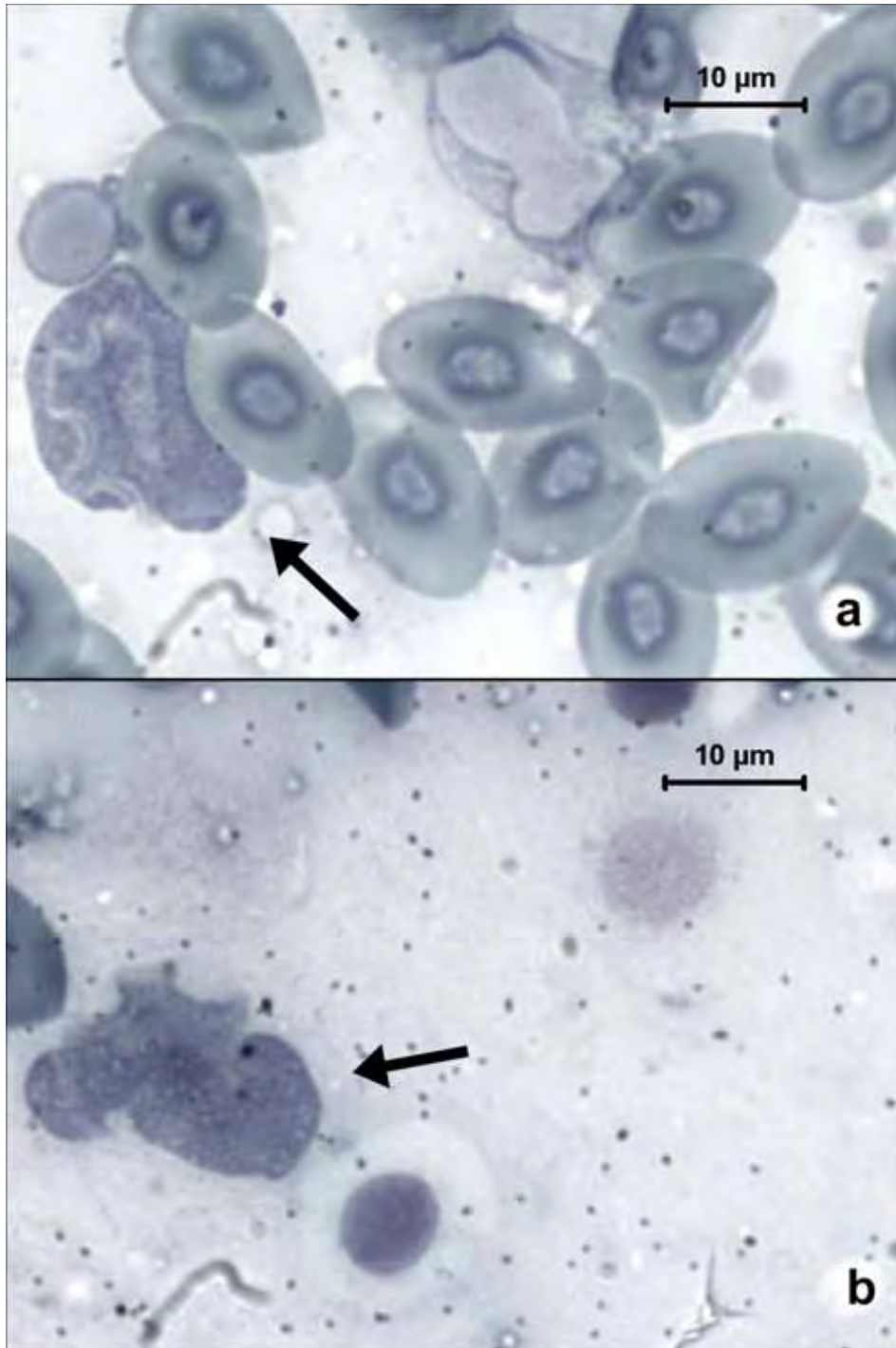


Figura 4. *Trypanosoma* sp. observados em *Leptodactylus podicipinus*. (a) sangue; (a) rim; (b) fígado. A seta indica o tripanossoma.



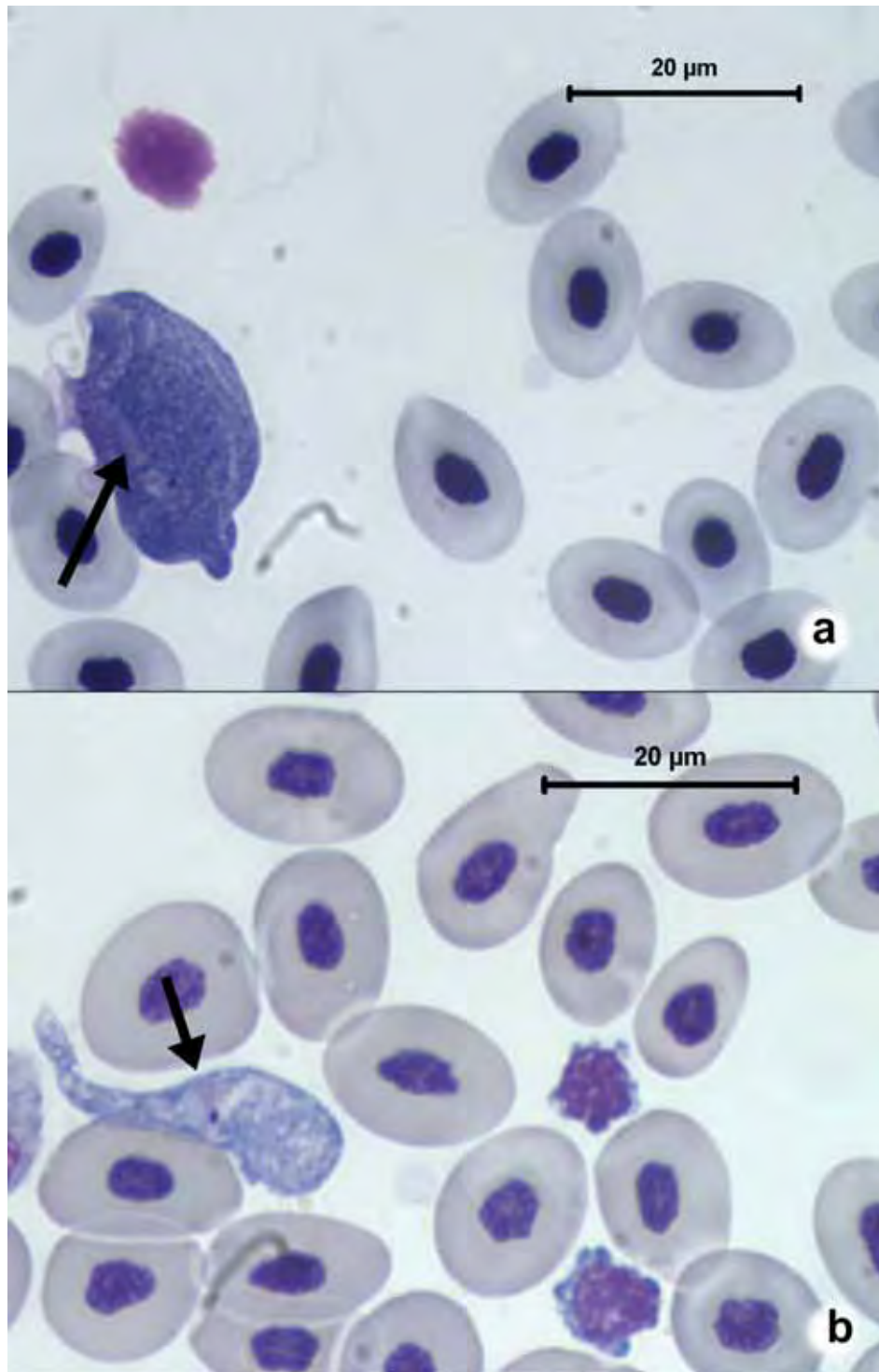


Figura 5. *Trypanosoma* sp. observados em *Leptodactylus chaquensis* (a e b). A seta indica o núcleo.

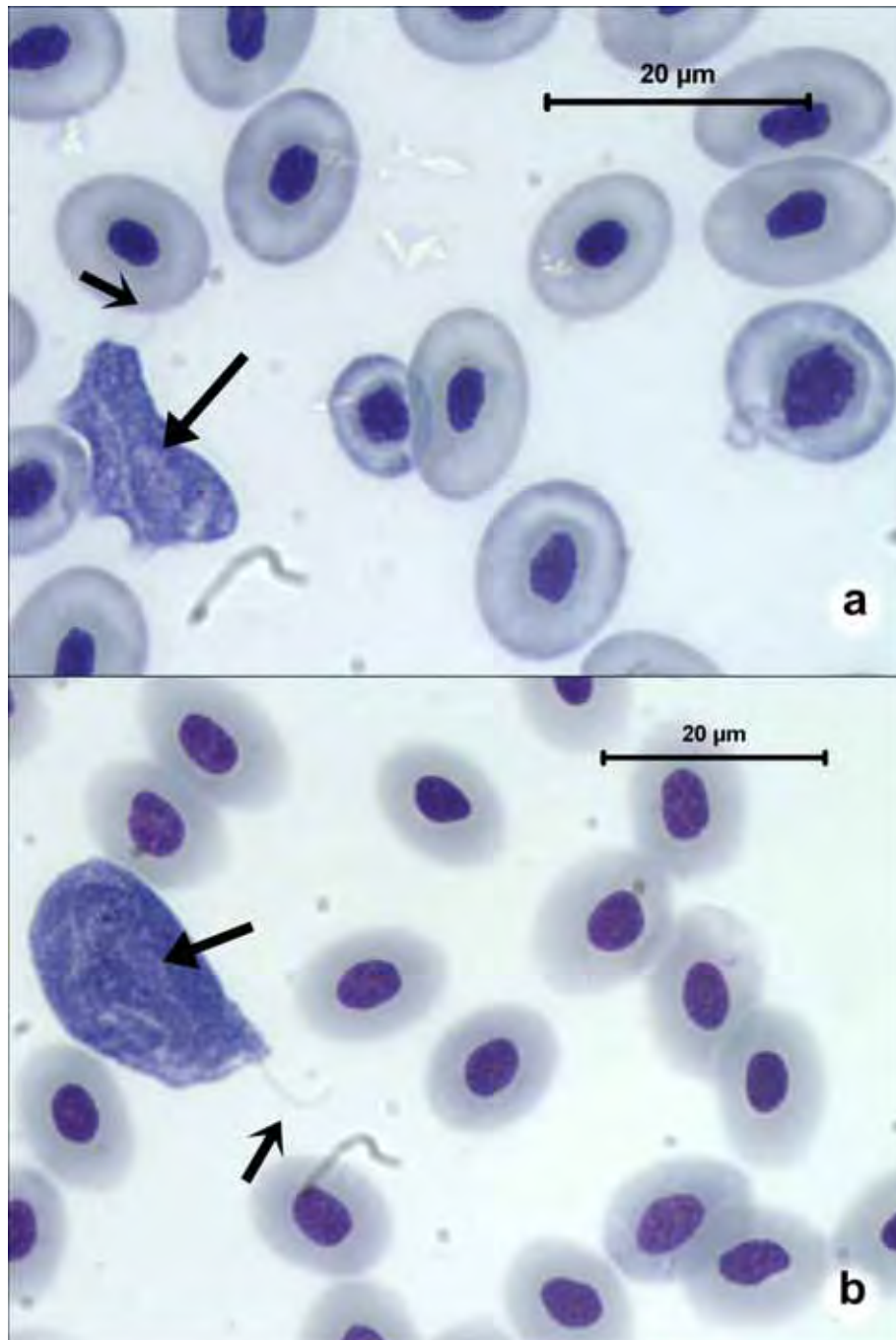


Figura 6. *Trypanosoma* sp. observados em *Leptodactylus chaquensis* (a e b). A seta cheia indica o núcleo e a seta vazada o flagelo.



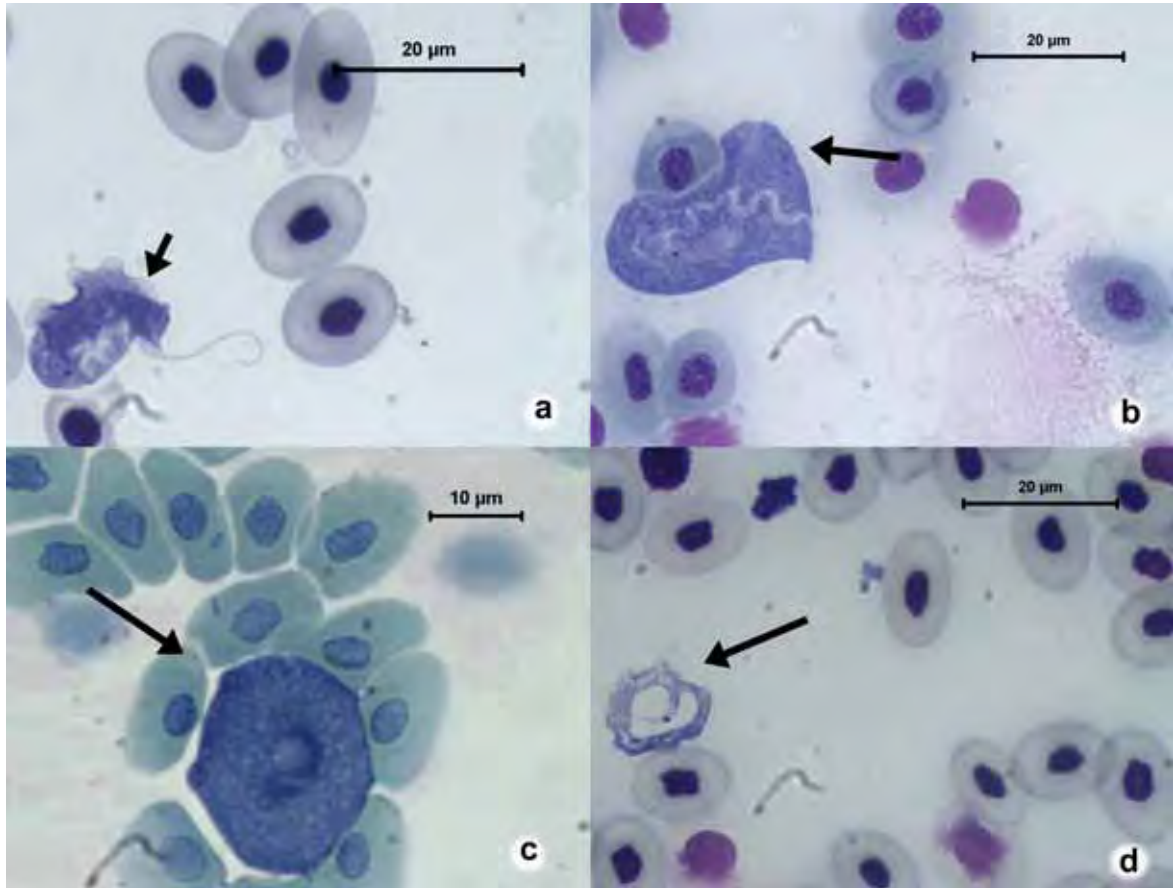


Figura 7. *Trypanosoma* sp. observado no sangue de *Leptodactylus chaquensis* (a, b, c e d). A seta indica o tripanossoma.

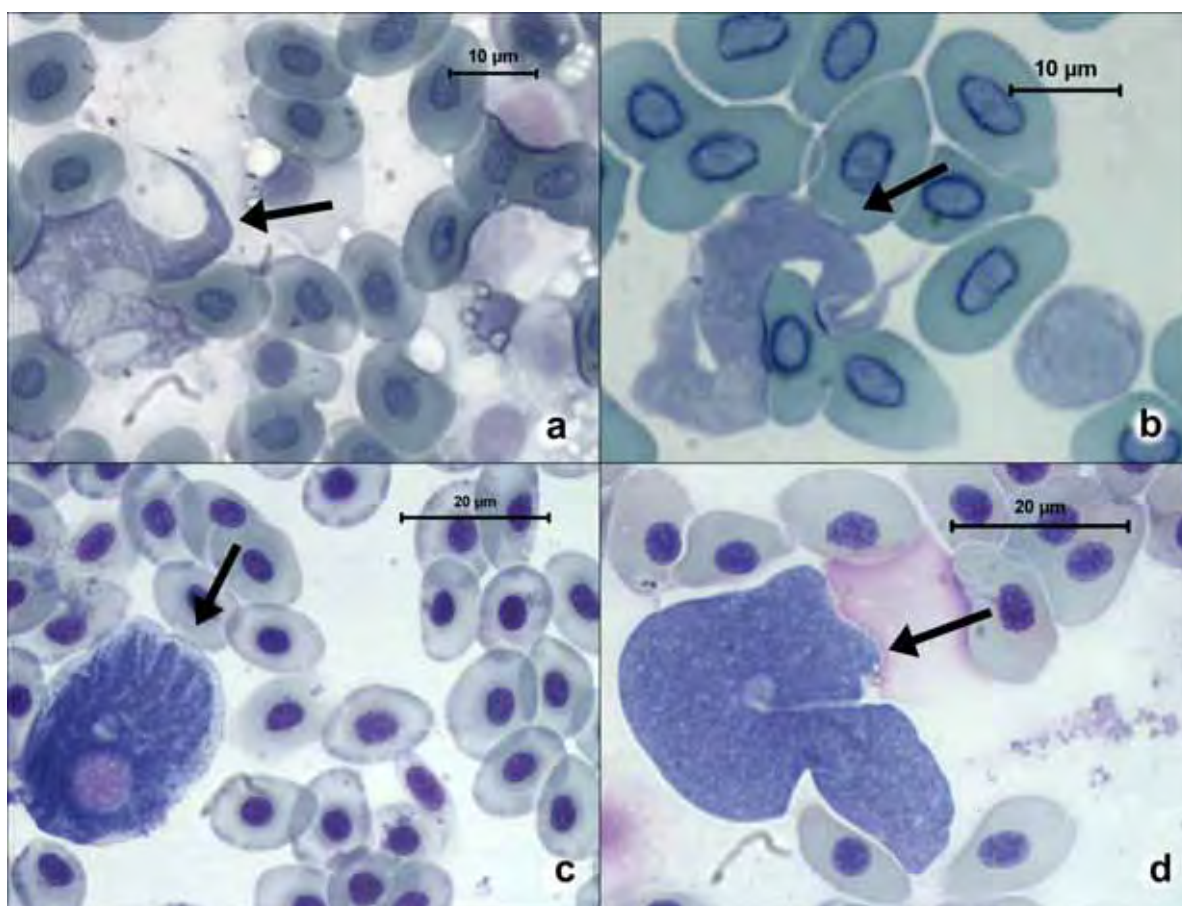


Figura 8. *Trypanosoma* sp. observado no sangue de *Leptodactylus chaquensis* (a, b, c e d). A seta indica o tripanossoma.

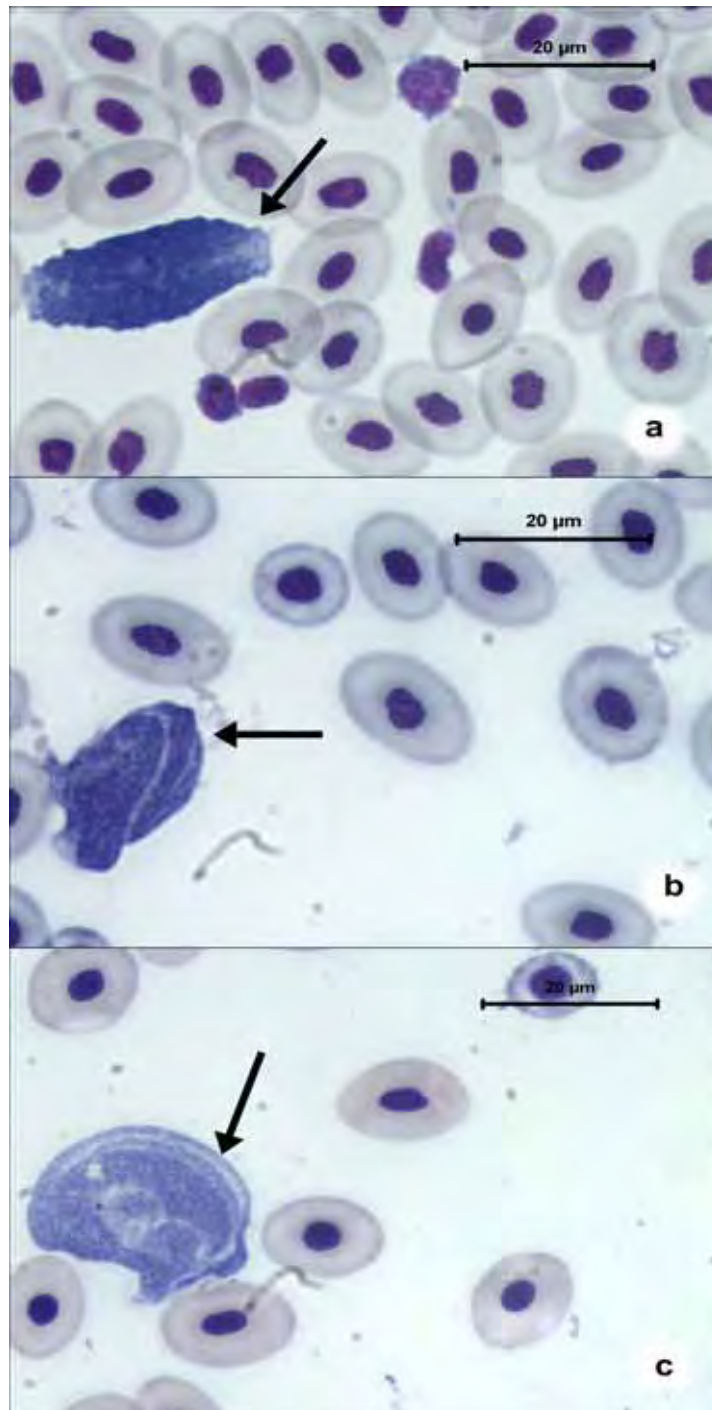


Figura 9. *Trypanosoma* sp. observado no sangue de *Leptodactylus chaquensis* (a, b e c). A seta indica o tripanossoma.

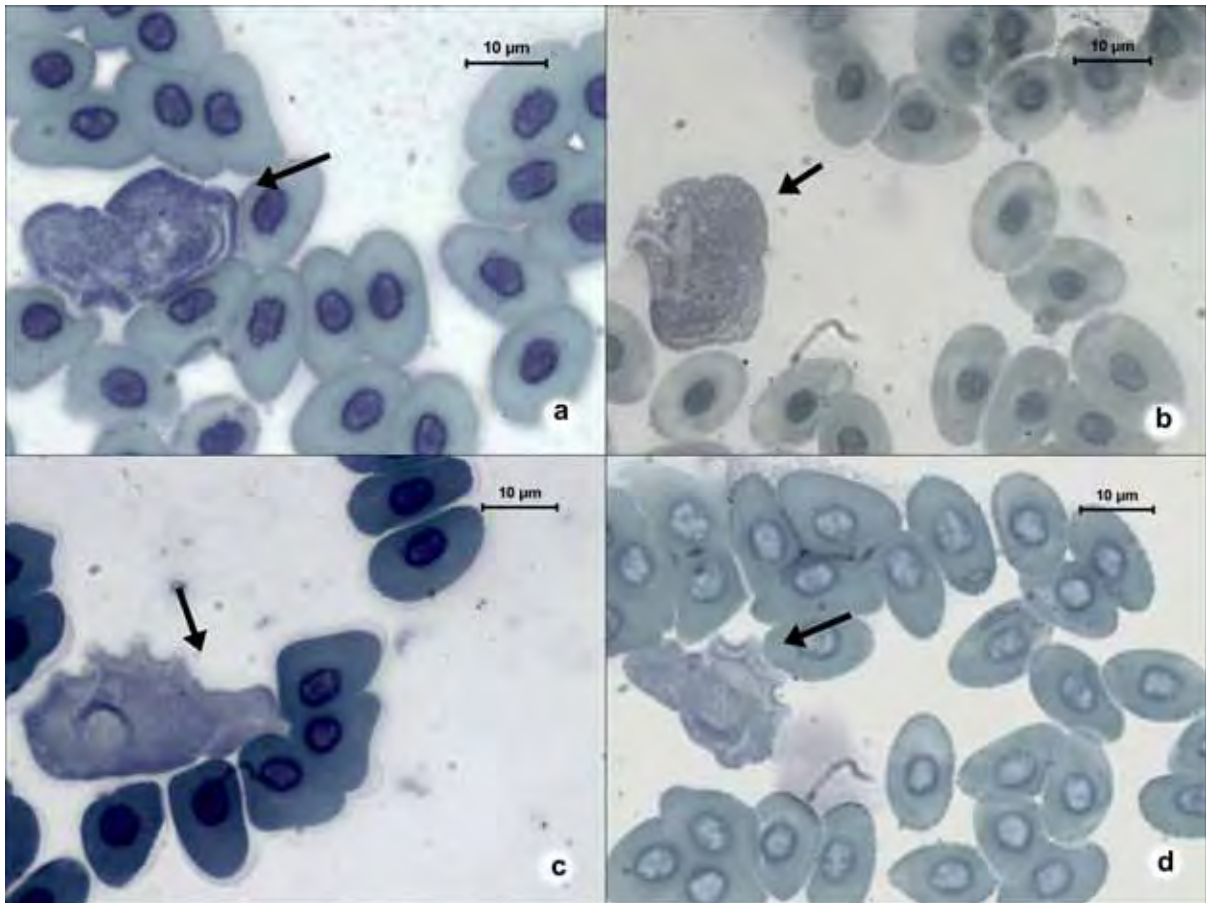


Figura 10. *Trypanosoma* sp. observado no sangue de *Leptodactylus podicipinus* (a, b, c e d). A seta indica o tripanossoma.

Tabela 3. Parâmetros morfométricos de *Trypanosoma* sp. observados em *L. chaquensis* e *L. podicipinus*.

MORFOMETRIA DO PARASITA														
Animal Parasitado	AP (µm <sup>2</sup> )	CP (µm)	LP (µm)	LMO (µm)	ANP (µm <sup>2</sup> )	A-N (µm)	P-N (µm)	K-A (µm)	K-P (µm)	K-N (µm)	K-N <sub>p</sub> (µm)	D-F (µm)	CMO (µm)	CF (µm)
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	340,38	36,57	16,11	12,79	19,15	21,36	16,09	33,92	8,05	11,20	10,04	97,20	47,21	15,21
	± 201,42	± 19,42	± 8,28	± 6,41	± 9,96	± 14,90	± 8,49	± 25,41	± 5,04	± 6,58	± 6,60	± 43,73	± 29,32	± 7,84
Mínimo	54,60	13,57	2,92	2,95	4,98	6,61	6,00	2,77	1,87	4,05	1,71	39,46	17,28	2,77
máximo	a 981,54	a 90,97	a 39,18	a 33,00	a 61,19	a 54,75	a 49,59	a 79,40	a 32,70	a 24,71	a 21,26	a 176,32	a 137,16	a 28,39
cv (%)	59,17	53,10	51,4	50,11	52	69,76	52,76	74,91	62,61	58,75	65,74	44,99	62,11	51,55
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	319,23	32,46	15,94	15,50	21,92	13,94	11,92	18,22	9,57	6,59	9,27	45,21	47,06	15,21
	± 164,48	± 10,31	± 5,55	± 6,17	± 8,08	± 4,85	± 4,33	± 4,64	± 3,54	± 3,17	± 5,68	± 5,05	± 15,12	± 2,51
Mínimo	69,54	22,04	5,88	6,33	8,77	6,16	5,87	8,92	4,52	3,06	1,38	41,64	24,32	13,43
Máximo	a 782,62	a 56,47	a 29,53	a 27,05	a 30,23	a 19,80	a 18,67	a 22,42	a 15,37	a 9,19	a 14,03	a 48,78	a 76,34	a 16,98
cv (%)	51,52	31,76	34,82	39,81	36,86	34,79	36,33	25,47	37	48,10	61,27	11,17	32,13	16,50

AP: área do parasita; CP: comprimento do parasita; LP: largura do parasita; LMO: porção mais larga do parasita juntamente com a membrana ondulante; ANP: área do núcleo do parasita; A-N: distância da região anterior do parasita até o meio do núcleo; P-N: distância da região posterior do parasita até o núcleo; K-A: distância do cinetoplasto até a região anterior do parasita; K-P: distância do cinetoplasto até a região posterior do parasita; K-N: distância do cinetoplasto até o núcleo; K-N<sub>p</sub>: distância do cinetoplasto até a região posterior do núcleo; D-F: distância do parasita juntamente com o flagelo livre; CMO: comprimento da membrana ondulante; CF: comprimento do flagelo livre; cv: coeficiente de variação.



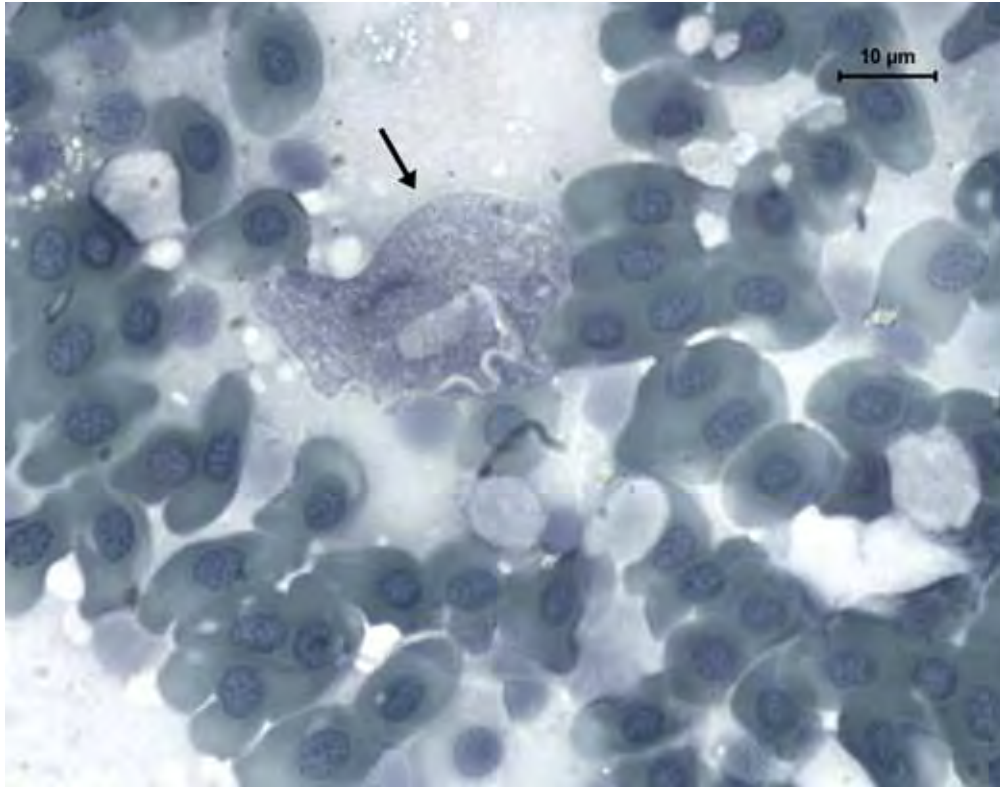


Figura 11. *Trypanosoma* sp. observado no baço de *Leptodactylus chaquensis* coletado na BEP. A seta indica o tripanossoma.

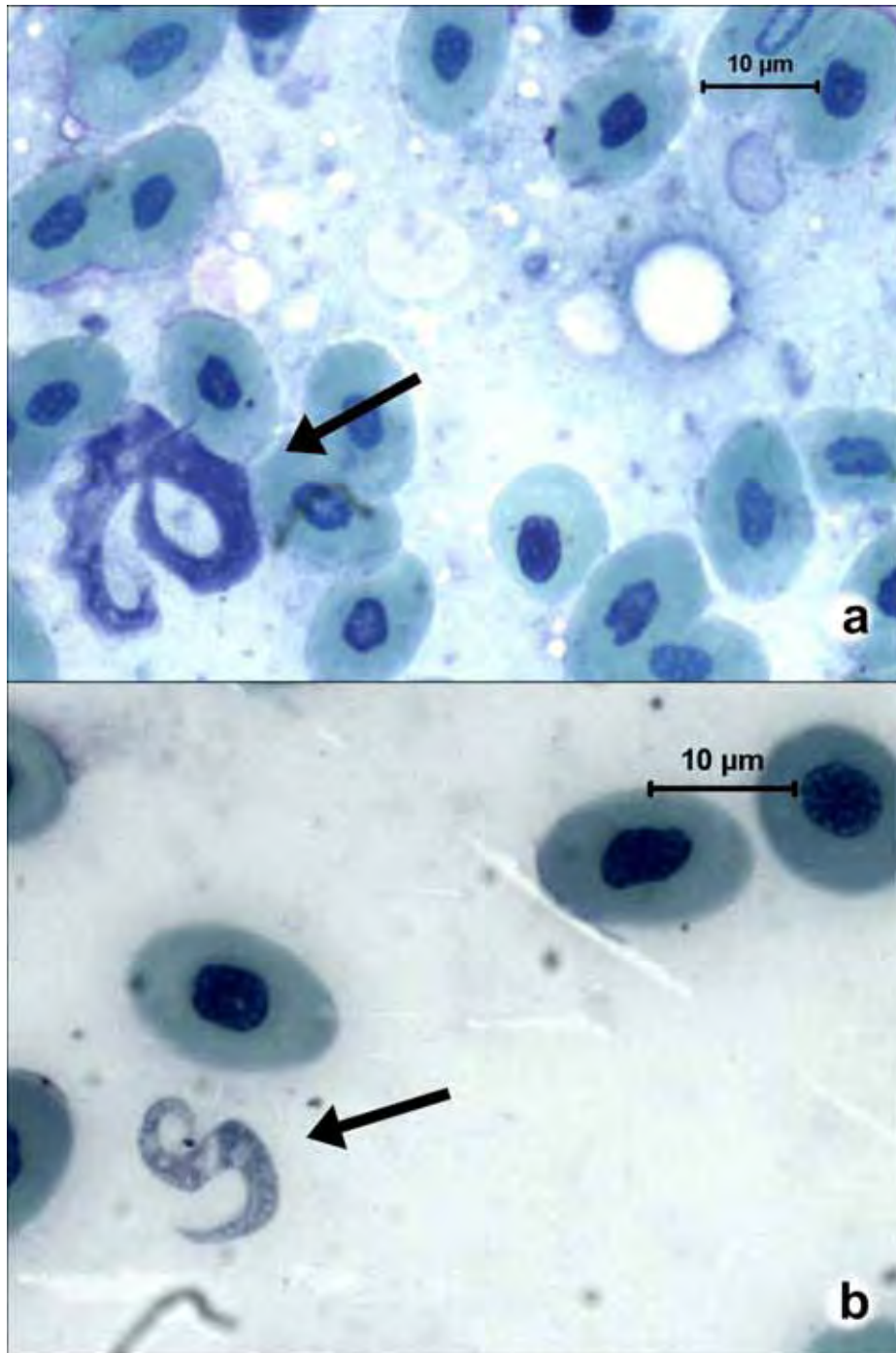


Figura 12. *Trypanosoma* sp. observado no rim (a) e sangue (b) de *Leptodactylus chaquensis* coletado na Faz. Nhumirim. A seta indica o tripanossoma.

#### 4.5. Caracterização de formas parasitárias teciduais

Dentre os 145 animais capturados, foram feitos 133 *imprints* dos órgãos (baço, fígado e rim) de 51 *L. chaquensis* e 82 *L. podicipinus*, onde encontrou-se 17 (12,78%) animais com tripanossoma (Tabela 4). Em *L. chaquensis* foram observados em 14 animais (27,45%), dois parasitas no baço, três no fígado e nove no rim. Enquanto que em *L. podicipinus* foram encontrados em três animais (3,66%), um parasita no fígado e dois no rim.

Tabela 4. Ocorrência de *Trypanosoma* sp. observados no baço, fígado rim das rãs *L. chaquensis* e *L. podicipinus*.

---

ANUROS	ANIMAIS POSITIVOS	PARASITA	ÓRGÃO		
			BAÇO	FÍGADO	RIM
<i>Leptodactylus chaquensis</i>	14	<i>Trypanosoma sp.</i>	2	3	9
<i>Leptodactylus podicipinus</i>	3	<i>Trypanosoma sp.</i>	-	1	2

---

#### 4.6. Oligonucleotídeos e Caracterização molecular

A utilização dos oligonucleotídeos 609F e 706R não foram capazes neste estudo de amplificar sequências de *Trypanosoma* sp. no tamanho do fragmento desejado de 900 pb, apesar de terem sido feitas diluições de 5 vezes e 10 vezes do DNA com a intenção de diminuir a quantidade de DNA expresso do hospedeiro, já que estes anuros possuem hemácia nucleada e isto poderia interferir na amplificação do DNA do parasita. Além disso, foram feitas várias tentativas de mudanças de temperatura e de mudanças na concentração dos produtos da reação de PCR.



Apesar de nossas amostras terem sido contaminadas, a amplificação foi conseguida através da técnica de PCR com os oligonucleotídeos IR1 e 5.8 R, amplificando um fragmento de tamanho aproximado de 500pb (Figura 12).

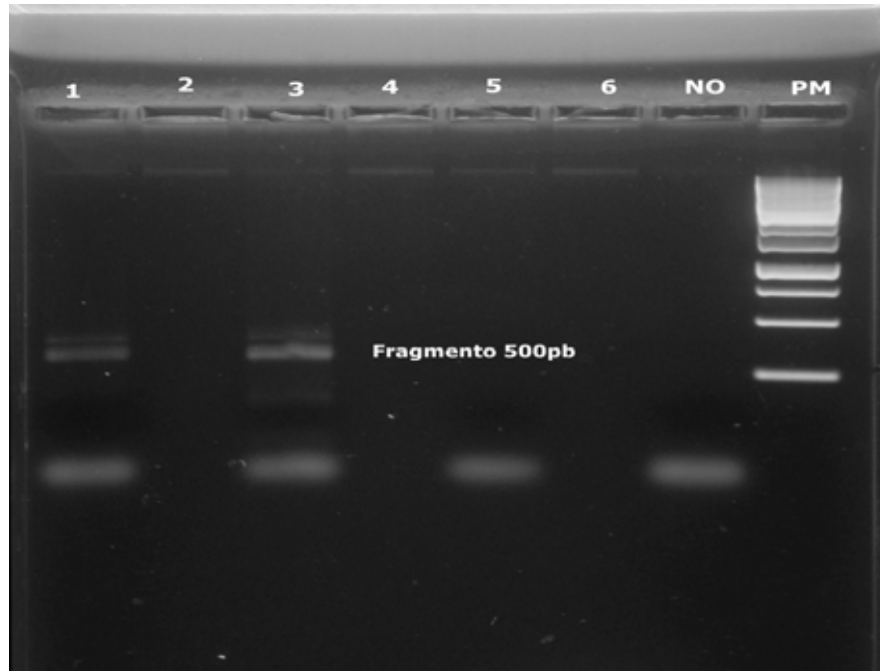


Figura 12. Visualização em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR do gene 18S rRNA de *Trypanosoma* sp. amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos IR1 e 5.8R. Poços 1 e 3; NO: controle negativo; PM: peso molecular (1Kb) de 1000pb.

## 5. DISCUSSÃO

Tripanossomas são parasitas comumente encontrados em anuros, sanguessugas e dípteros de vários continentes. (Barta e Desser, 1989; Desser, 2001). De acordo com alguns pesquisadores, a morfologia variável do tripanossoma no sangue se deve a influências exógenas, como a temperatura, a maturidade e a densidade da população de hospedeiros, além da influência do fator poluição (Bardsley e Harmsen 1973; Mackenzie 1999; Silva et al. 2005). Embora não tenhamos caracterizado nos pontos de coleta a influência destes fatores externos sobre o hospedeiro e conseqüentemente sobre o parasita, nós relatamos uma grande

variabilidade de formas em ambos locais. Algumas formas encontradas foram semelhantes às descritas por Miyata (1978) como *Trypanosoma nagasakiense* (Figura 5a, 7a e 7b); *Trypanosoma chattoni* (Figura 2a e 7c); *Trypanosoma* sp. E (Figura 7d) e *Trypanosoma tsukamotoi* ou *Trypanosoma rugosa* (Figura 8c e 8d), além de outras formas que não encontraram correspondência com os tripanossomas anteriormente relatados (Figura 8a, 8b, 9 e 10).

Ao compararmos as formas de tripanossomas deste trabalho ao anteriormente desenvolvido por nós nas mesmas espécies de hospedeiros, observamos que os parâmetros morfométricos da AP, CP e LP foram maiores, ou seja, as formas atuais são bem mais largas e compridas.

A proximidade de características dos parasitas de nossa pesquisa com outras já descritas não faz com que possamos afirmar que sejam as mesmas espécies. Pois, estes flagelados estão distribuídos por todo o mundo e diferenças morfométricas e morfológicas são encontradas em populações de mesma espécie de rã e entre diferentes espécies de hospedeiros (Barta e Desser, 1984). Além disso, tripanossomatídeos que tem ciclo de vida digenético sofrem uma pressão evolucionária maior do que aqueles com ciclo monogenético, assim, as pressões evolucionárias em dois hospedeiros diferentes são variáveis e cumulativas (Hoare, 1972).

Ao observarmos os pontos de coleta, verificamos que as duas espécies de anuros tiveram uma prevalência maior para *Trypanosoma* sp. na Faz. Nhumirim, mas, ao compararmos a prevalência entre os animais, verificamos que *L. chaquensis* estava mais parasitado nas duas áreas de coleta do que *L. podicipinus*, tendo ocorrido a taxa de 100% de prevalência para *L. chaquensis* na base de Nhumirim. Talvez, os resultados encontrados demonstrem que os anuros estejam sendo mais parasitados por sanguessugas, do que por insetos e, por isso, a prevalência de tripanossoma foi maior nestes animais, já que estes anuros foram coletados dentro d'água, na época de reprodução. Outra explicação seria o comportamento alimentar do possível vetor, a sanguessuga. Este invertebrado, ao se fixar no hospedeiro, com o estímulo da alimentação, desencadearia a liberação dos tripanossomas dos órgãos para a circulação periférica, aumentando com isso a parasitemia (Bardsley e Harmsen, 1973).

De acordo com os valores produzidos pela estatística foi demonstrado que os locais de coleta tiveram influência sobre a prevalência do parasita quando se estudaram as duas

espécies de anuros em conjunto, contudo, quando se observa *L. chaquensis* e *L. podicipinus* isoladamente em relação aos locais de coleta são encontrados resultados diferentes. Talvez a diferença observada esteja relacionada à área que o parasita pode ocupar dentro do hospedeiro. *L. chaquensis* é maior que *L. podicipinus*, além disso, estes animais dificilmente hospedam apenas uma espécie de parasita, ou ainda, a área corporal de exposição aos vetores invertebrados talvez influencie na prevalência do flagelado e pode ser que exista neste caso a especificidade vetor-hospedeiro.

Toda a discussão acima demonstra que existe uma estrutura complexa entre ambiente, vetor, hospedeiro e parasita que merece ser investigada com mais cuidado.

As formas de tripanossomas para *L. chaquensis* encontradas na Faz. Nhumirim eram menores em relação às formas encontradas na BEP e, além disso, possuíam pouca variabilidade morfológica. Na BEP houve uma maior variabilidade de formas, ocorrendo desde formas maiores e largas com extremidades arredondadas, formas de circulares a ovais, até formas estreitas e alongadas, mas o que predominou foi a morfologia de tripanossomas maiores (Figura 11). Na Faz. Nhumirim houve pouca variação, mostrando formas largas, formas bem pequenas, mas predominando formas alongadas e estreitas (Figura 12). No outro hospedeiro, *L. podicipinus* não foi possível fazer a comparação entre os locais, pois as observações feitas pela análise microscópica no ponto de coleta da Faz. Nhumirim mostraram apenas duas formas do parasita.

Em relação ao pleomorfismo do parasita observado em nossa pesquisa, isto talvez se deva a uma adaptação específica destas formas ao ambiente dentro do hospedeiro, como por exemplo, uma adaptação à presença de hormônios ou a presença de anticorpos, dentre outros fatores (Bardsley e Harmsen, 1973). Embora estas características ainda não tenham sido desvendadas para todas as formas de tripanossoma de anuros (Bardsley e Harmsen, 1973), há evidências que alterações do ambiente, como a temperatura, modificariam a fisiologia do anuro e conseqüentemente as formas do parasita (Bardsley e Harmsen, 1973).

Quanto aos tripanossomas que observamos nos órgãos, podemos explicar através do experimento realizado por Southworth, Mason e Seed (1968). Segundo estes autores, o encontro do parasita nestes órgãos estaria ligado à influência do fotoperíodo na rã, ou seja, em períodos de escuro a tendência dos parasitas era de migrarem para o baço, fígado e rim, já em períodos de claro a tendência era de encontrá-los na circulação sanguínea. Isto se justifica, pois as rãs de nosso experimento foram coletadas no período noturno, mas foram

necropsiadas no período diurno, talvez devido a esta variação uma parte dos tripanossomas tenha migrado para a circulação.

Ressaltamos que os parasitas observados nos tecidos estavam no sangue, extracelularmente, e não dentro das células teciduais, não sendo, portanto, outra forma do parasita.

## 6. CONCLUSÃO

A prevalência entre as duas espécies de hospedeiros em ambos locais de coleta foi alta. A diferença significativa de positividade em *L. podicipinus* talvez reflita a influência de diferentes vetores ou a influência do tamanho do hospedeiro, entre outros fatores. A pleomorfia dos tripanossomas encontrados pode indicar diferentes fases do parasita ou até diferentes espécies.

O diagnóstico molecular teve um resultado positivo, apesar de não termos conseguido repeti-lo para todas as amostras a técnica se mostrou eficiente para detecção destes protozoários.

## 7. REFERÊNCIAS

- AYALA, S.C. Trypanosomes in wild California sandflies and extrinsic stages in *Trypanosoma bufophlebotomi*. **J. Protozool.**, v.18, p.433-436, 1971.
- BARDSLEY, J.E.; HARMSEN, R. The trypanosomes of anura. In: DAWES, B. (ed.). **Advance Parasitology**. London: Academic Press, 1973. v.7, p.1-73.
- BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. **J. Wildlife Dis.**, v. 20, n. 3, p.180-189, 1984.
- BARTA, J.R.; BOULARD, Y.; DESSER, S.S. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern north american ranids in the context of host phylogeny. **Trans. Am. Microsp. Soc.**, v.108, p.6-20, 1989.
- BARROW, J.H. The biology of *Trypanosoma diemyctyli* (Tobey). I. *Trypanosoma diemyctyli* in the leech, *Batracobdella picta* (Verrill). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v.72, p. 197-216, 1953.
- COSTA NETO, P.L.O. Estatística. Edgard Blucher LTDA (ed)., São paulo, 1994, 263p.
- CRANS, W.J. The blood feeding habits of *Culex territans* Walker. **Mosq. News**. v. 30, n. 3, p. 445-447, 1970.

- DESSER, S.S.; MCLVER, S.B.; JEZ, D. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. **Int. J. Parasitol.**, v. 5, p. 50-59, 1975.
- DESSER, S.S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. Academic Press, 1993. v. 4, p. 247-272.
- DESSER, S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **J. Parasitol.**, v.87, n.1, p.152-160, 2001.
- DIAMOND, L.S. Study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of anura. **Wildlife Dis.**, v.44, p.1-77, 1965.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.
- FENG, L.S.; CHAO, C.S. The development of *Trypanosoma bocagei* in *Phlebotomus squamirostris*. **Chin. Med. J.**, v.62, p.210-217, 1943.
- FRANÇA, C.; ATHIAS, M. Recherches sur les trypanomes des amphibiens. I. Les trypanosomes de la *Rana esculenta*. **Arch. de Inst. Bacteriol. (Camara Pestana)**, v.1, p.127-165, 1906.
- HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the salivaria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.91, p.37-49, 1998.
- HEALY, K.B.; CRANS, W.; GAUGLER, R. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). **J. Parasitol.**, v. 95, n. 2, p. 381-387, 2009.
- HOARE, C.A. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell, 1972. 749p.
- KUMAR, S.K.; TAMURA, I.B.; JAKOBSEN, I.; NEI, M. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**. v. 17, p.1244-1245, 2001.
- LEAL, D.D.M.; O'DWYER, L.H.; RIBEIRO, V.C.; SILVA, R.J.; FERREIRA, V.L.; RODRIGUES, R.B. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States – Brasil. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, n. 2, p. 199-206, 2009.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; TAKEDA, G.F.; SHAW, J.J.; TEIXEIRA, M.M. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v.128, p. 283-294, 2004.

MACKENZIE, K. Parasites as pollution indicators in marine ecosystems a proposed early warning system. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 38, p. 955-959, 1999.

MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Phylogenetic position of the giant trypanosomes *Trypanosoma chanttoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. **J. Parasitol.**, v. 88, n. 3, p. 566-571, 2002.

MIYATA, A. Anuran trypanosomes in Kyushu and Rhyukyu island, with descriptions of six new species. **Trop. Med.**, v.20, p.51-80, 1978.

MCGHEE, R.B.; COSGROVE, W.B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiol. Rev.**, v. 44, n. 1, p. 140-173, 1980.

POLIZER, M.; LASTÓRIA, G.; RONDON, M.A.C. Características físicas da região do Passo do Lontra. In: **I Simpósio Brasileiro de Recursos hídricos do Centro Oeste, Brasília, 2000**. Disponível em:

< [www.abrh.org.br/novo/i\\_simp\\_rec\\_hidric\\_centrooeste\\_bsb10.pdf](http://www.abrh.org.br/novo/i_simp_rec_hidric_centrooeste_bsb10.pdf) > Acesso em: 10/11/2012.

RODELA, L.G. 2006. Unidades de Vegetação e pastagens nativas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. 252p. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2006, São Paulo.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v 4, p.406-25, 1987.

SCORZA, J.V.; DAGERT, C. Sobre la sinonimia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. **Bol. Venez. Lab. Clin.**, v.3, p.29-36, 1958.

SILVA, V.; VALENZUELA, A.; RUIZ, P.; OYARZÚN, C. *Trypanosoma humboldti* en *Schroederichthys chilensis* (Cohodrichthyes, Elasmobranchii, Scyliorhinidae) como indicador no destructivo de contaminación. **Gayana**, v.69, n.1, p.160-165, 2005.

SORIANO, B.M.A.; ALVES, M.J.M. Boletim agrometeorológico ano 2002 para a sub-região da Nhecolândia, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 2005. 29p.

SOUTHWORTH, G.C.; MASON, G.; SEED, J.R. Studies on frog trypanosomiasis. 1 a 24-hour cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. **J. Parasitol.**, v. 54, n. 2, p. 255-258, 1968.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.C.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids. Res.**, v. 11, p. 4673-80, 1994.

WERNER, J.K. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. **J. Parasitol.**, v. 79, n. 3, p. 356-363, 1993.

WOO, P.T.K. The life cycle of *Trypanosoma chrysemydis*. **Can. J. Zool.**, v.47, p.1139-1151, 1969.

ŽIČHUS, T. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zool. Lituanica*, v.12, n.2, p.197-202, 2002.

**OBSERVAÇÃO DE *Lankesterella* sp. E *Dactylosoma* sp. NO SANGUE e MYXOZOA NOS RINS DE *Leptodactylus chaquensis* E *Leptodactylus podicipinus* PROVENIENTES DO PANTANAL, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.**

Denise Dutra Menezes Leal<sup>1✉</sup>, Carine Spenassatto<sup>2</sup>, Vanda Lucia Ferreira<sup>3</sup>, Reinaldo José da Silva<sup>2</sup>, Paulo Eduardo Martins Ribolla<sup>2</sup>, Karina dos Santos Paduan<sup>2</sup>, Lucia Helena O'Dwyer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Email: lealdenise@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 79070-900, Mato Grosso do Sul, Brasil.



Os anuros podem ser parasitados por diferentes hemoparasitas, entre eles, hemococcídios do Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiida. Dentre as espécies que podem ser observadas estão as pertencentes ao gênero *Lankesterella*. Neste gênero encontram-se espécies cujo ciclo de vida inclui merogonia, gametogonia e esporogonia ocorrendo nos tecidos do hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasita é feita por vetores como sanguessuga ou mosquitos. A forma do parasita encontrada no sangue de vertebrados são os esporozoítos (Desser, 1993, 2001). Outro gênero que pode ser observado é *Dactylosoma* (Apicomplexa Eucoccidiida) cujas espécies ocorrem nos eritrócitos. Seu ciclo é desconhecido, embora as sanguessugas sejam suspeitas de serem os vetores (Barta, Boulard e Desser, 1989).

Os myxosporeos são protozoários pertencentes ao Filo Myxozoa, parasitas de anfíbios e répteis e peixes, encontrados na cloaca do hospedeiro, mas esporos e trofozoítos são observados nos rins destes animais. Os trofozoítos maduros geralmente possuem formas que variam de arredondadas a ovais, o endoplasma possui grânulos finos, contendo um núcleo vegetativo, dois esporos em desenvolvimento e glóbulos de gordura de vários tamanhos e números (Kudo, 1922). Existem várias espécies neste Filo, porém, a classificação baseada somente na morfologia é incerta (Gunter e Adlard, 2010).

Foram estudados anuros das espécies *Leptodactylus podicipinus* e *Leptodactylus chaquensis* que foram coletados nos meses de abril, novembro e dezembro de 2008 e janeiro de 2009, no Pantanal, Mato Grosso do Sul.

A captura dos exemplares foi realizada com a mão, colocando os animais em sacos plásticos e levados ao laboratório, para posteriormente serem eutanasiados com uma dose elevada de anestésico (Tiopental Sódico).

A captura dos animais foi realizada sob a aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) n° 1608, localizada no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) n° 16696-1.

O sangue foi retirado através de punção cardíaca, utilizando-se EDTA como anticoagulante. Deste sangue realizaram-se esfregaços sanguíneos que posteriormente foram fixados em metanol por 3 minutos e corados com May-Gruenwald-Giemsa (10%) por 30 minutos e examinados em microscópio óptico, aumento de 1000x, para o diagnóstico de

hemoparasitas. Durante a necrópsia, *imprint* de órgãos (fígado, baço, rim) foram confeccionados. Estas lâminas foram fixadas e coradas como descrito acima.

Foram coletados 145 anuros, 68 *L. chaquensis* e 77 *L. podicipinus*. Em um espécime de *L. podicipinus* (1,3%) foram observados parasitas do gênero *Lankesterella*, que se assemelharam muito com aqueles encontrados por Barta, Boulard e Dessler (1989) (Figura 1).

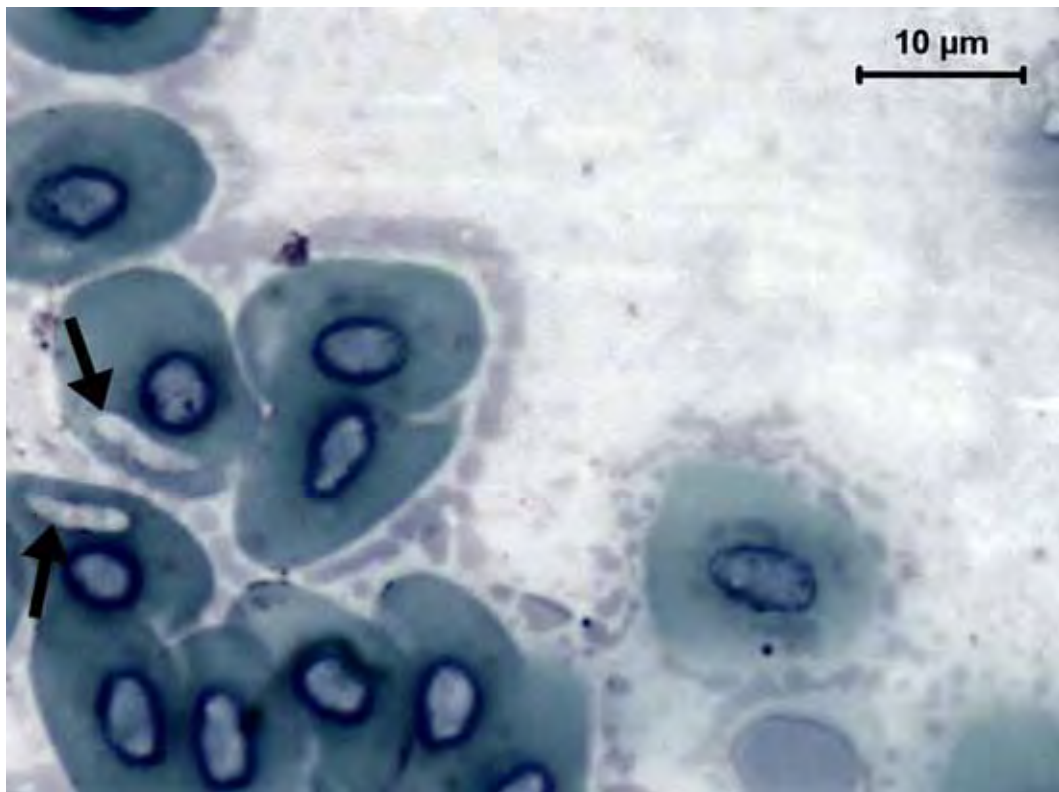


Figura 1. *Lankesterella* sp. (seta) observado no sangue de *Leptodactylus podicipinus*.

No sangue de um *L. chaquensis* (1,45%) foram encontrados esquizontes primários de *Dactylosoma* sp. (Figura 2) e gamontes (Figura 3), os quais foram muito semelhantes aos encontrados por Barta, Boulard e Desser (1989).

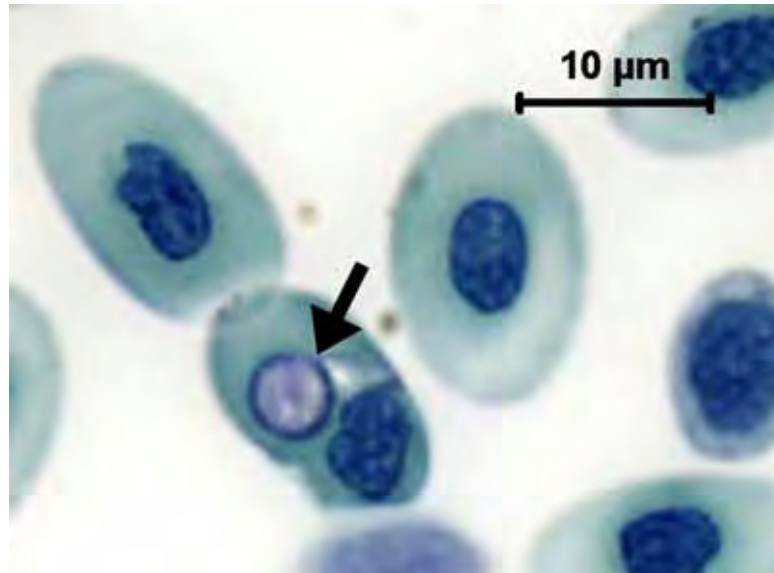


Figura 2: Esquizonte de *Dactylosoma* sp. (seta) observado no sangue de *Leptodactylus chaquensis*.

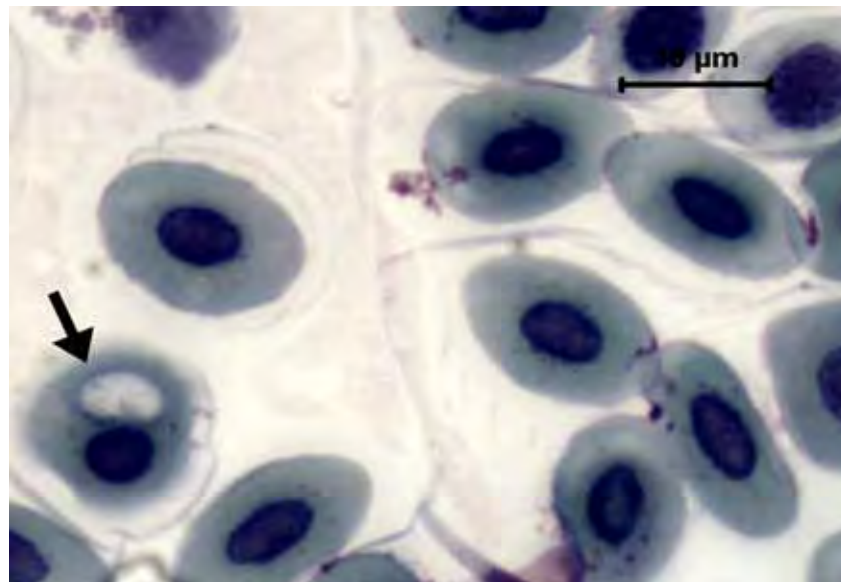


Figura 3. Gamonte de *Dactylosoma* sp. (seta) observado no sangue de *Leptodactylus chaquensis*.

Foram observados trofozoítos de Myxozoa nos rins de um *L. chaquensis* (1,45%) que eram muito semelhantes ao descrito por Kudo (1922) como sendo *Leptotheca* sp. (Figura 4).

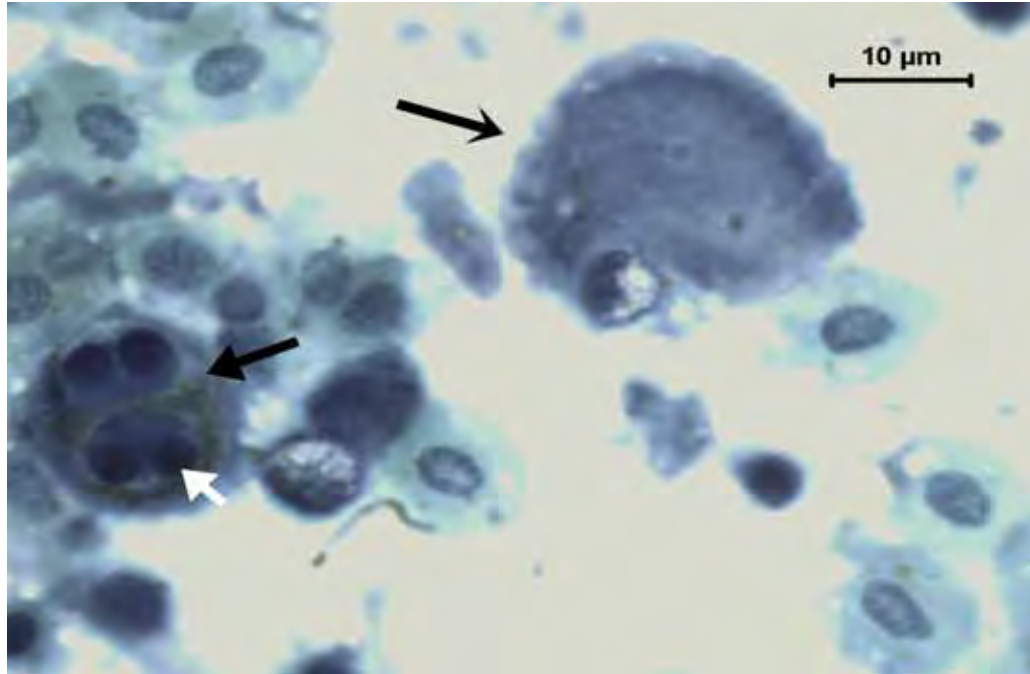


Figura 4. Myxozoa observado no rim de *Leptodactylus chaquensis*. Seta preta (vazada) indica o trofozoíto jovem; seta preta (cheia), o trofozoíto maduro; seta branca, o esporo.

Os anuros são parasitados por grande diversidade de protozoários, sanguíneos e tissulares, que são pouco estudados no Brasil. São necessários esforços no sentido de caracterizar estes parasitas morfológicamente e geneticamente, estudar sua prevalência e verificar seu potencial patogênico nestes animais.

## REFERÊNCIAS

BARTA, J.R.; BOULARD, Y.; DESSER, S.S. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern north american ranids in the context of host phylogeny. **Trans. Am. Microsp. Soc.**, v.108, p.6-20, 1989.

DESSER, S.S. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In KREIER, J.P. **Parasitic Protozoa**. Academic Press, 1993. v. 4, p. 247-272.

DESSER, S.S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. **J. Parasitol.**, v.87, n.1, p.152-160, 2001.

GUNTER, N., ADLAR, R. The demise of *Leptotheca* Thelohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thelohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). **Syst. Parasitol.** v. 75, p. 81–104, 2010.

KUDO, R. On the protozoa parasitic in frogs. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v.40, p.59-76, 1922