

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INVESTIGAÇÃO DE HEMOSPORÍDEOS E
HEMOGREGARINAS (APICOMPLEXA) EM *Podocnemis
expansa* E *Phrynops geoffroanus***

Juliana Paula de Oliveira

Médica Veterinária

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INVESTIGAÇÃO DE HEMOSPORÍDEOS E
HEMOGREGARINAS (APICOMPLEXA) EM *Podocnemis
expansa* E *Phrynops geoffroanus***

Juliana Paula de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Karin Werther

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutora em Medicina
Veterinária. Área: Patologia Animal**

2017

O48i Oliveira, Juliana Paula de
Investigação de hemosporídeos e hemogregarinas (Apicomplexa) em *Podocnemis expansa* e *Phrynops geoffroanus*/ Juliana Paula de Oliveira. -- Jaboticabal, 2017
xix, 58p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Karin Werther

Banca examinadora: Estevam Guilherme Lux Hoppe, Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira, Marcos Rogério André, Nádia Regina Pereira Almosny

Bibliografia

1. Cágado-de-barbicha. 2. Hemogregarinas 3. Hemosporídeos. 4. Reptilia. 4. Tartaruga-da-Amazônia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619: 616.993: 598.13

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: julepaulavet@hotmail.com

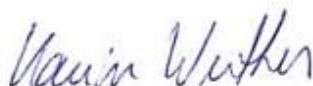
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INVESTIGAÇÃO DE HEMOSPORÍDEOS E HEMOGREGARINAS (APICOMPLEXA)
EM *Podocnemis expansa* E *Phrynos geoffroanus*

AUTORA: JULIANA PAULA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: KARIN WERTHER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



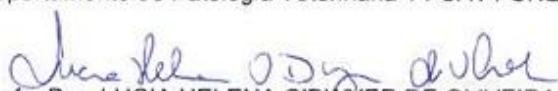
Profa. Dra. KARIN WERTHER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. NADIA REGINA PEREIRA ALMOSNY (Participação por Videoconferência)
UFF / Niterói, RJ



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. LUCIA HELENA O'DWYER DE OLIVEIRA
Departamento de Parasitologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 16 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PAULA DE OLIVEIRA – Nascida em 17 de maio de 1984, em Caçador, Santa Catarina. Ingressou em julho de 2002 no curso de Medicina Veterinária no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) no Câmpus de Lages, onde se graduou em julho de 2007. Durante a graduação, entre janeiro e dezembro de 2006, foi bolsista de extensão da UDESC na área de Meio Ambiente (medicina veterinária de animais selvagens). Atuou como médica veterinária em clínica de pequenos animais na Boutique Canina Gesser Ltda. Me., em Brusque-SC, entre novembro de 2007 e julho de 2008. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, na área de Medicina de Animais Selvagens, pela Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), Câmpus de Jaboticabal, durante o período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. Realizou pós-graduação, nível mestrado, em Medicina Veterinária, na área de concentração - Patologia Animal, na FCAV-Unesp, intitulado “Detecção de *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. em *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha) em ambiente urbano”, durante o período de março de 2011 a julho de 2013, com bolsa Capes de 19 meses. Em agosto de 2013, iniciou pós-graduação, nível doutorado, em Medicina Veterinária, na área de concentração - Patologia Animal, na FCAV-Unesp, com bolsa Capes de 32 meses. Durante a residência e a pós-graduação, auxiliou nos projetos de extensão da Unesp (Proex-Unesp) intitulados “Exames anatomopatológicos em animais selvagens” e “Manejo de animais selvagens de estimação”, criados em 2010 e 2011, respectivamente; e encerrados em dezembro de 2015. De abril de 2011 a dezembro de 2015 atuou na comissão organizadora do Grupo de Estudos de Animais Selvagens (GEAS) da FCAV-Unesp. Iniciou curso de especialização em Homeopatia Veterinária pelo Instituto Homeopático François Lamasson de Ribeirão Preto-SP, em agosto de 2015, com previsão de término em julho de 2017.

A vida é uma dança...

Quando uma porta se fecha, outra se abre; quando um caminho termina, outro começa... nada é estático no Universo, tudo se move sem parar e tudo se transforma sempre para melhor.

Habitue-se a pensar desta forma: tudo que chega é bom, tudo que parte também. É a dança da vida... dance-a da forma como ela se apresentar, sem apego ou resistência.

Não se apavore com as doenças... elas são despertadores, têm a missão de nos acordar. De outra forma permaneceríamos distraídos com as seduções do mundo material, esquecidos do que viemos fazer neste planeta. O universo nos mandou aqui para coisas mais importantes do que comer, dormir, pagar contas...

Vemos para realizar o Divino em nós. Toda inércia é um desserviço à obra divina. Há um mundo a ser transformado, seu papel é contribuir para deixá-lo melhor do que você o encontrou. Recursos para isso você tem, só falta a vontade de servir a Deus servindo aos homens.

Não diga que as pessoas são difíceis e que convivência entre seres humanos é impossível. Todos estão se esforçando para cumprir bem a missão que lhes foi confiada. Se você já anda mais firme, tenha paciência com os seus companheiros de jornada. Embora os caminhos sejam diferentes, estamos todos seguindo na mesma direção, em busca da mesma luz.

E sempre que a impaciência ameaçar a sua boa vontade com o caminhar de um semelhante, faça o exercício da compaixão. Ele vai ajudá-lo a perceber que na verdade ninguém está atrapalhando o seu caminho nem querendo lhe fazer nenhum mal, está apenas tentando ser feliz, assim como você.

Quando nos colocamos no lugar do outro, algo muito mágico acontece dentro de nós: o coração se abre, a generosidade se instala dentro dele e nasce a partir daí uma enorme compreensão acerca do propósito maior da existência, que é a prática do AMOR. Quando olhamos uma pessoa com os olhos do coração, percebemos o parentesco de nossas almas.

Somos uma só energia, juntos formamos um imenso tecido de luz... Não existem as distâncias físicas. A Física Quântica já provou que é tudo uma ilusão. Estamos interligados por fios invisíveis que nos conectam ao Criador da vida. A minha tristeza contamina o bem-estar do meu vizinho, assim como a minha alegria entusiasma alguém do outro lado do mundo. É impossível ferir alguém sem ser ferido também, lembre-se disso.

O exercício diário da compaixão faz de nós seres humanos de primeira classe.

André Luiz (psicografada por de Chico Xavier)

Dedico,

Em forma de prece ...

A Deus que me ilumina, me abençoa e guia;

*À família que em meus pensamentos sempre
irão estar, lhes estendo um abraço todos os dias;*

Aos meus pais, Sergio e Leyza, que sempre me incentivam e nos momentos de necessidade me fornecem suporte e amor;

Ao meu marido, Fabiano, parceiro para tantos momentos, que compartilha comigo tantas emoções e me apoia com imenso carinho e liberdade;

Aos irmãos que meus pais me deram Rodrigo, Daniela, Fernanda e Carolina, e às irmãs que a vida me deu, Vivianne, Jeovana, Ellen e Joana Aurora, nosso amor supera a distância e a saudade;

Aos meus queridos tios que sempre vibraram por mim, Alady Moura, Nilse, Claudio, Sheila, Dalmo, Jocely, Veroni e Valdir;

Aos meus avós que com afeto e ternura me recordo de nossos momentos, Ary, Myres (*in memoriam*), Diahyr (*in memoriam*), Omar Claro (*in memoriam*);

À família que ganhei, que me destinam tanto carinho e bom ânimo, sogros, Vera e Joatan; cunhados, Juliano, Luciano, Jeovana e Thatiana; sobrinhos, Juan, Henrique, Julia Helena, João Gabriel e Amanda; avódrasta, Marcia e suas filhas, Karine e Gabriela;

*Aos amigos que Jaboticabal me presenteou nos
oito anos que aqui permaneci e que tornaram
meus dias mais proveitosos e agradáveis;*

Às Fadas Madrinhas, grandes amigas, Aline, Denise e Helenara, são grandes companheiras, confidentes e conselheiras;

Aos meus Anjos, prezados amigos de total confiança, que em momentos de minha ausência foram os guardiões de meus companheiros de quatro patas, Henrique, Mariana, Nilton, Henzo, Julia Maria, Lívia, Giulia, Camila, Ana Carolina, Thatiana, Alessandra, Pedro, Mariele, Priscila, Elaine e as queridas Fadas Madrinhas;

*Rogo a Deus que proteja minha família, amigos
e a mim, que assim seja.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, pela vida e pelas oportunidades oferecidas.

À FCAV/Unesp, por disponibilizar este programa de Pós-graduação, fornecer suporte laboratorial, estrutural, técnico e bibliográfico de ótima qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio à pesquisa 2015/22851-8.

À Profa. Karin Werther, pela orientação neste projeto e demais atividades realizadas, pelos ensinamentos, paciência e exemplo de determinação, persistência, didática e respeito.

Ao Prof. Marcos Rogério André, pelo incentivo e colaboração no caminho do aprendizado da biologia molecular e parasitologia. Seu amor pela ciência, exemplo de dedicação e eficiência, inspiram a manter o foco.

Aos docentes vinculados à pós-graduação da FCAV, em especial Prof. Antonio Sergio Ferraudó (Geoprocessamento em saúde pública e saúde animal), Prof. Marcos Rogério André (Diagnóstico molecular das parasitoses) e Prof. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda (Filogenia molecular), pelo empenho dedicado às respectivas disciplinas, que contribuiu na compreensão dos temas e possibilitou a execução das etapas correspondentes neste trabalho.

Ao Prof. José Roberto Ferreira Alves Júnior e à pesquisadora Ana Paula Gomes Lustosa pela grandiosa colaboração na obtenção das amostras de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia) e por todo apoio fornecido.

Aos docentes Prof. Marcos Rogério André e Profa. Rosangela Zacarias Machado, que disponibilizaram o apoio laboratorial.

Aos docentes Prof. José Maurício Barbanti Duarte e Prof. Marcos Rogério André, que contribuíram na etapa de exame de qualificação.

Aos docentes Prof. Estevam Guilherme Lux Hoppe, Profa. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira, Prof. Marcos Rogério André e Profa. Nádia Regina Pereira Almosny, que realizaram as melhorias na etapa da defesa desta tese.

À técnica Francisca de Assis Ardisson pelo excelente trabalho no processamento dos materiais fixados para a confecção das lâminas.

Aos parceiros de pós-graduação que colaboraram nas diversas etapas de execução deste trabalho. Nos momentos de captura e colheita de amostras dos *Phrynops geoffroanus* (cágados-de-barbicha): Alanna do Socorro Lima da Silva, Aline Eyko Kawanami e Denise Granato Chung. Na etapa de processamento laboratorial de biologia molecular e análises filogenéticas: Keyla Carstens Marques de Sousa, Mayara de Cássia Luzzi, Priscila Ikeda, Luiz Ricardo Gonçalves, Jyan Lucas Benevenuto e Mariele de Santi. Na avaliação histopatológica, Ana Carolina Ortegal Almeida. Na construção de mapas, Alessandra Bertassoni da Silva.

Aos estagiários do Serviço de Medicina e Patologia de Animais Selvagens e aos integrantes do Grupo de Estudos de Animais Selvagens da FCAV/Unesp, que com tanta atenção e interesse participaram das necropsias, colaborando não só para a obtenção de amostras, mas também para meu aperfeiçoamento didático.

Por fim, agradeço aos meus pais, Leyza Paloschi de Oliveira e Sergio Omar de Oliveira, e a meu marido, Fabiano Cesar Sá, pelo auxílio material e suporte espiritual em mais este projeto.

SUMÁRIO

	PÁGINA
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ix
AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA - SISBIO.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
LISTAS DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Testudines sul americanos (Chelidae e Podocnemididae).....	2
2.2. Hemoparasitas do Filo Apicomplexa em testudines.....	5
2.3. Ciclo biológico de hemogregarinas e hemosporídeos que parasitam testudines.....	7
2.4. Testudines e pesquisa de hemogregarinas e hemosporídeos.....	9
2.4.1. Testudines e pesquisa de hemogregarinas.....	10
2.4.2. Testudines e pesquisa de hemosporídeos.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Animais e locais do estudo.....	14
4.1.1. <i>Phrynops geoffroanus</i> (cágados-de-barbicha).....	14
4.1.2. <i>Podocnemis expansa</i> (tartarugas-da-Amazônia).....	16
4.2. Inspeção de ectoparasitas e colheita de amostras biológicas.....	18
4.3. Processamento das amostras.....	19
4.3.1. Avaliação de parasitemia e morfologia de hemoparasitas.....	19
4.3.2. Exames histopatológicos.....	20
4.3.3. Detecção de material genômico de hemoparasitas.....	21

4.3.3.1. Extração de DNA e controle de qualidade do material genômico.....	21
4.3.3.2. Detecção e caracterização molecular de hemoparasitas...	22
4.3.3.2.1. Reações de amplificação para Hemosporídeos (gene Citocromo <i>b</i>).....	22
4.3.3.2.2. Reações de amplificação para Hemogregarinas (gene 18S <i>r</i> RNA).....	24
4.3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	26
4.3.3.4. Reação de reamplificação.....	26
4.3.4. Reação de sequenciamento.....	26
4.3.4.1. Purificação dos amplicómeros.....	26
4.3.4.2. Quantificação de DNA dos amplicómeros.....	27
4.3.4.3. Reação de Sequenciamento.....	27
4.3.5. Análise das sequências.....	28
4.4. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Avaliação de parasitemia e exames histopatológicos.....	30
5.1.1. Análise de extensões sanguíneas e cortes histológicos de <i>Phrynosops geoffroanus</i>	30
5.1.2. Análise de extensões sanguíneas de <i>Podocnemis expansa</i>	31
5.2. Controle de qualidade da extração de DNA.....	32
5.2.1. Controle endógeno da reação e quantificação do material genômico extraído de amostras de <i>Phrynosops geoffroanus</i>	32
5.2.2. Controle endógeno da reação e quantificação do material genômico extraído de amostras de <i>Podocnemis expansa</i>	33
5.3. Pesquisa de material genômico e caracterização de hemoparasitas.	33
5.3.1. Reações de amplificação para hemosporídeos.....	33
5.3.1.1. Amplificação baseada no gene Citocromo <i>b</i> – amostras biológicas de <i>Phrynosops geoffroanus</i>	34
5.3.1.2. Amplificação baseada no gene Citocromo <i>b</i> – amostras biológicas de <i>Podocnemis expansa</i>	34


5.3.2. Reações de amplificação para hemogregarinas.....	34
5.3.2.1. Amplificação baseada no gene 18S rRNA – amostras de biológicas <i>Phrynops geoffroanus</i>	34
5.3.2.2. Avaliação baseada no gene 18S rRNA – amostras de biológicas <i>Podocnemis expansa</i>	35
6. DISCUSSÃO.....	39
6.1. Ectoparasitas: hospedeiros definitivos.....	39
6.1.1. Investigação de ectoparasitas (vetores) em <i>Phrynops geoffroanus</i>	39
6.1.2. Investigação de ectoparasitas (vetores) em <i>Podocnemis expansa</i>	40
6.2. Investigação de hemosporídeos em testudines: por métodos morfológicos e moleculares.....	41
6.3. Investigação de hemogregarinas em testudines: por métodos morfológicos e moleculares.....	41
7. CONCLUSÃO.....	43
8. REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICES.....	57
Apêndice A.....	58

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que os Protocolos nºs 7842/11 e 2935/17 do projeto intitulado "Pesquisa de agentes zoonóticos e tóxicos em cágados de vida livre", sob a responsabilidade da Profª Drª Karin Werther, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de março de 2017.

Jaboticabal, 02 de março de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28440-1	Data da Emissão: 30/05/2011 09:20
Dados do titular	
Nome: Juliana Paula de Oliveira	CPF: 047.224.079-08
Título do Projeto: PESQUISA DE Salmonella spp. E ANTICORPOS ANTI-Leptospira spp. EM CAGADOS DE VIDA LIVRE EM JABOTICABAL/SP	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura, Transporte e Colheita de materiais biológicos de Cagados de Vida Livre	07/2011	02/2013
2	Processamento de materiais biológicos de Cagados de Vida Livre, água e sedimento dos córregos e lago	07/2011	02/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Todos os exemplares de tartarugas aquáticas a serem capturadas no âmbito do presente estudo serão devolvidos aos locais de onde foram capturados, após a manutenção temporária, por três dias, nas dependências da UNESP-Jaboticabal. Portanto, na prática, o presente estudo não contempla a COLETA dos animais, tendo em vista que para os efeitos do SISBIO, a coleta implica na retirada definitiva de animais da natureza. Essa ressalva é para respaldar a pesquisadora, quando da entrega de relatório.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Felipe Jorge da Silva	Desenvolvimento de técnica laboratorial	312.036.108-90	339232924 SSP-SP	Brasileira
2	Kaline Barros Barboza	Participação na captura, transporte e coleta de material	228.226.788-55	27630633-8 SSP-SP	Brasileira
3	JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES JUNIOR	Participação na captura, transporte e coleta de material	892.530.781-20	4054719 DGPC-GO	Brasileira
4	Aline Kawanami	Participação na captura, transporte e coleta de material	326.770.618-13	284615985 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59788578





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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28440-1	Data da Emissão: 30/05/2011 09:20
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Juliana Paula de Oliveira	CPF: 047.224.079-08
Título do Projeto: PESQUISA DE Salmonella spp. E ANTICORPOS ANTI-Leptospira spp. EM CÁGADOS DE VIDA LIVRE EM JABOTICABAL/SP	
Nome da Instituição: UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

5	karin werther	Participação na captura, transporte e coleta de material	532.920.309-00	7647442 SSP-SP	Brasileira
---	---------------	--	----------------	----------------	------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	JABOTICABAL	SP	Avenida Carlos Berchieri - Centro	Fora de UC
2	JABOTICABAL	SP	Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Trachemys aditrix, Acanthochelys radiolata, Trachemys scripta, Phrynops vanderhaegel, Phrynops geoffroanus, Trachemys dorbigni, Hydromedusa tectifera, Hydromedusa maximiliani, Phrynops hogel, Acanthochelys spixii
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Acanthochelys spixii, Trachemys aditrix, Hydromedusa maximiliani, Hydromedusa tectifera, Phrynops geoffroanus, Acanthochelys radiolata, Trachemys dorbigni, Trachemys scripta, Phrynops vanderhaegel, Phrynops hogel
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Trachemys dorbigni (*Qtde: 10), Phrynops vanderhaegel (*Qtde: 8), Acanthochelys spixii (*Qtde: 8), Hydromedusa tectifera (*Qtde: 8), Trachemys aditrix (*Qtde: 10), Acanthochelys radiolata (*Qtde: 8), Phrynops hogel (*Qtde: 10), Hydromedusa maximiliani (*Qtde: 8), Phrynops geoffroanus (*Qtde: 20), Trachemys scripta (*Qtde: 10)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Hydromedusa tectifera, Phrynops vanderhaegel, Acanthochelys spixii, Trachemys dorbigni, Acanthochelys radiolata, Trachemys aditrix, Hydromedusa maximiliani, Trachemys scripta, Phrynops hogel, Phrynops geoffroanus
5	Marcação de animais silvestres in situ	Hydromedusa maximiliani, Hydromedusa tectifera, Phrynops vanderhaegel, Acanthochelys radiolata, Phrynops geoffroanus, Phrynops hogel, Trachemys scripta, Trachemys aditrix, Acanthochelys spixii, Trachemys dorbigni

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue, Regurgitação/conteúdo estomacal, Fezes
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Funil trap, Puça, Outros métodos de captura/coleta (anzol oxidável sem fígua, redes e tarrafas), Coleta manual, Captura manual
3	Método de marcação (Répteis)	Pintura de escamas, Outros métodos de marcação (placa plástica numerada aderida ao casco), Microchip

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	Ensino e Pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 59788578





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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13447-6	Data da Emissão: 22/01/2015 16:31	Data para Revalidação*: 21/02/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ANA PAULA GOMES LUSTOSA	CPF: 633.493.451-15
Título do Projeto: Estudo da ecologia reprodutiva e diversidade genética de <i>Podocnemis expansa</i> nas áreas de proteção de quelônios no Rio Araguaia/GO.	
Nome da Instituição: Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios	CNPJ: 08.829.974/0014-09

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de dados em campo	09/2014	12/2014
2	Manejo Reprodutivo de <i>Podocnemis expansa</i>	09/2014	12/2014
3	Análise Laboratorial	01/2015	06/2015
4	Relatório parcial	04/2015	05/2015
5	Relatório final	06/2015	07/2015

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	VERA LUCIA FERREIRA LUZ	Análise de Dados	174.674.895-87	1404787 SSP-GO	Brasileira
2	MARCOS EDUARDO COUTINHO	Análise de Dados Genéticos	541.126.486-34	M759844 SSP-MG	
3	RAFAEL ANTONIO MACHADO BALESTRA	Coleta de material e análise de dados	712.189.551-04	4034439 DGPC-GO	Brasileira
4	PAULO ROBERTO DE JESUS FILHO	Pesquisador	120.647.277-44	1876780 SSP-ES	Brasileira
5	LILIAN FREITAS BASTOS	Pesquisadora	015.540.541-17	4894325 DGPC-GO	Brasileira
6	JOSÉ ROBERTO FERREIRA ALVES JUNIOR	Pesquisador	892.530.781-20	4054719 DGPC-GO	Brasileira

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

Código de autenticação: 48816796





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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13447-6	Data da Emissão: 22/01/2015 16:31	Data para Revalidação*: 21/02/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: ANA PAULA GOMES LUSTOSA	CPF: 633.493.451-15
Título do Projeto: Estudo da ecologia reprodutiva e diversidade genética de <i>Podocnemis expansa</i> nas áreas de proteção de quelônios no Rio Araguaia/GO.	
Nome da Instituição : Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios	CNPJ: 08.829.974/0014-09

7	RAFAEL MARTINS VALADÃO	Pesquisador	050.946.066-62	338258280 SSP-MG	Brasileira
---	------------------------	-------------	----------------	------------------	------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO MIGUEL DO ARAGUAIA	GO	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL MEANDROS DO RIO ARAGUAIA	UC Federal
2	BRASILIA	DF	EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS - CENARGEN	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Podocnemis expansa
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Podocnemis expansa
3	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Podocnemis expansa
4	Marcação de animais silvestres in situ	Podocnemis expansa

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Ovos, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Captura manual
3	Método de marcação (Répteis)	Corte de escudos marginais, Rádio transmissor externo

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios	
2	EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA	Laboratório de Genética Animal

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

Código de autenticação: 48816796



INVESTIGAÇÃO DE HEMOSPORÍDEOS E HEMOGREGARINAS (APICOMPLEXA)

EM *Podocnemis expansa* E *Phrynops geoffroanus*

RESUMO – Testudines atuam como hospedeiros intermediários para hemogregarinas (*Haemogregarina* spp. e *Hemolivia* spp.) e hemosporídeos (*Haemoproteus* spp. e *Haemocystidium* spp.). Esses hemoprotozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa são parasitas heteroxenos que afetam principalmente hemácias. Sua presença, intracitoplasmática, em extensões sanguíneas de répteis, pode ser eventualmente observada. A identificação morfológica não é suficiente para a classificação de espécie, sendo recomendada a utilização de métodos moleculares. Com o objetivo de pesquisar a presença de hemogregarinas e hemosporídeos em *Phrynops geoffroanus* (cágados-de-barbicha) e *Podocnemis expansa* (tartarugas-da-Amazônia) ambos de vida livre, foram utilizados métodos morfológicos e moleculares. Nas extensões sanguíneas coradas e em cortes histológicos (de fígado, pulmão, baço e coração de *P. geoffroanus*) foi investigada a presença de hemoparasitas. A partir de amostras de sangue e de tecidos foi realizada a pesquisa de material genômico de hemoparasitas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (cPCR), com base nos genes 18S rRNA (hemogregarinas) e Citocromo *b* (hemosporídeos). Em extensões sanguíneas de 100% (7/7) de *P. expansa* foram observadas estruturas sugestivas para hemogregarinas. Observou-se amplificação de fragmentos baseados no gene 18S rRNA para 100% (7/7) de *P. expansa*. As análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança (MV) e Bayesiana foram obtidas de sequências de amostras sanguíneas de *P. expansa*. Tais sequências agruparam-se em um clado monofilético e posicionaram-se em um ramo próximo às sequências do gênero *Haemogregarina* obtidas de testudines aquáticos da América do Norte, Ásia, Europa e África. Tal situação instiga a investigação molecular de mais sequências de hemogregarinas, provenientes de testudines aquáticos de países sul americanos geograficamente próximos, a fim de colaborar na afirmação mais robusta do surgimento de um novo clado do gênero *Hemogregarina*.

Palavras chave: cágado-de-barbicha; hemogregarinas; hemosporídeos; Reptilia; tartaruga-da-Amazônia

INVESTIGATION OF HEMOSPORIDIA AND HEMOGREGARINES (APICOMPLEXA)

IN *Podocnemis expansa* AND *Phrynops geoffroanus*

ABSTRACT – Testudines act as intermediate hosts for hemogregarines (*Haemogregarina* spp. and *Hemolivia* spp.) and hemosporidia (*Haemoproteus* spp. and *Haemocystidium* spp.). These haemoprotozoans belongs to the phylum Apicomplexa are heteroxenous parasites that affect erythrocytes. Their presence in reptiles' blood extensions can eventually be observed. Morphological identification is not enough for the classification, so molecular methods are recommended. In order to investigate the presence of hemogregarines and hemosporidia in free-living *Phrynops geoffroanus* (geoffroy's side-necked turtle) and *Podocnemis expansa* (giant Amazon turtle), morphological and molecular methods were used. The presence of hemoparasites was investigated at stained blood smears and histological slides (liver, lung, spleen and heart from *P. geoffroanus*). Genomic material of hemoparasites was detected by Polymerase Chain Reaction (cPCR), based on the 18S rRNA genes (hemogregarines) and Cytochrome *b* genes (hemosporidia). Hemogregarines-like structures were observed in stained blood smears from 100% (7/7) *P. expansa*. Amplification of fragments based on 18S rRNA gene was observed at 100% (7/7) *P. expansa* samples. Maximum Likelihood and Bayesian phylogenetic analyzes were obtained from sequences from *P. expansa* blood samples. These sequences were grouped into a monophyletic clade and clustered close *Haemogregarina* genus sequences, obtained from fresh water turtles from North America, Asia, Europe and Africa. This situation put forward molecular investigation of more sequences of hemogregarines from freshwater turtles from geographically close South American countries, with the view to collaborate in a robust affirmation of the emergence of a new clade of the genus *Hemogregarina*.

Keywords: geoffroy's side-necked turtle; hemogregarines; hemosporidia; Reptilia; giant Amazon turtle

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Celsius

CITES - Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

cPCR - reação em cadeia da polimerase qualitativa ou reação em cadeia da polimerase convencional DNA - ácido desoxirribonucleico

g - gramas

IUCN - International Union for Conservation of Nature

Kg - quilogramas

µL - microlitro

min – minuto(s)

mL - mililitro

mm - milímetros

mM - milimolar

pb - pares de base

PM - peso molecular

q.s.p. - quantidade suficiente para

S - sul

seg - segundos

U/ µL - Unidade por microlitro

v/v - volume por volume

W - oeste

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA	
Tabela 1	Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemosporídeos com base no gene mitocondrial Citocromo <i>b</i> , referências e o tamanho de fragmentos que flanqueiam.....	23
Tabela 2	Condições térmicas de ciclagem das reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemosporídeos com base no gene mitocondrial Citocromo <i>b</i>	24
Tabela 3	Relação de oligonucleotídeos iniciadores dos protocolos de reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemogregarinas baseadas no gene 18S rRNA.....	25
Tabela 4	Resultados dos procedimentos e dos exames das amostras biológicas de <i>Phrynops geoffroanus</i> (cágado-de-barbicha) e <i>Podocnemis expansa</i> (tartaruga-da-Amazônia) quanto a investigação de hemogregarinas (HG) e hemosporídeos (HP)..	30
Tabela 5	Análise morfométrica (Médias, desvio padrão e intervalo de valores das dimensões) das células parasitadas e não parasitadas por gametócitos de hemogregarinas, observados nos sete indivíduos de <i>Podocnemis expansa</i> (tartaruga-da-Amazônia) de vida livre naturalmente infectados.....	32
Tabela 6	Valores de concentração (ng/μL) e absorbância obtidos na mensuração por espectrofotometria de material genômico extraído de amostras de <i>Phrynops geoffroanus</i> (cágado-de-barbicha) que mostraram-se positivas no controle endógeno da cPCR (intron nuclear R35).....	33
Tabela 7	Relação de material genômico extraído de amostras de sangue e tecidos de <i>Phrynops geoffroanus</i> (cágado-de-barbicha) que amplificaram fragmento de aproximadamente 581 pb, em protocolo baseado no gene 18S rRNA que utilizou os oligonucleotídeos iniciadores HepR300/HepR900.....	35
Tabela 8	Dados de material genômico extraído de amostras de sangue de tartarugas-da-Amazônia (<i>Podocnemis expansa</i>) que amplificaram fragmentos baseados no gene 18S rRNA, amplicmeros purificados correspondentes (% e n) e mensuração em espectrofotômetro [Média±Desvio padrão (Mediana)].....	36

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1	Distribuição geográfica de <i>Phrynos geoffroanus</i> (cágado-de-barbicha) na América do Sul, ilustrada em cor vermelha (VAN DIJK et al., 2014)...	3
Figura 2	Distribuição geográfica de <i>Podocnemis expansa</i> (tartaruga-da-Amazônia), na América do Sul foi ilustrada em cor vermelha (VAN DIJK et al., 2014).....	4
Figura 3	Representação das fases do ciclo biológico de hemogregarinas. Onde (a) ilustra esporocisto, (b) esporozoítos, (c) meronte ou esquizonte, (d) merozoíto pré-eritrocítico, (e) macromeronte, (f) merozoíto e (g) gametócito intra-eritrocitário (imagem adaptada de ŠIROKÝ et al., 2007).....	8
Figura 4	Região da captura de <i>Phrynos geoffroanus</i> . Representação cartográfica, no detalhe no topo à esquerda a localização do estado de São Paulo (verde) no Brasil e no topo à direita em laranja o município de Jaboticabal e em azul o Córrego Cerradinho. Imagem de satélite do município de Jaboticabal-SP, com destaque em azul para o percurso do Córrego Cerradinho (A - C) e o trecho considerado para o estudo (B - C), que representa 1,9 Km do córrego [software ArcGIS versão 10.4 (Esri, 2016). ESRI. 2016. ArcGIS for Desktop. Ver. 10.1. Redlands (CA): Environmental System Research Institute, Inc.].....	15
Figura 5	Representação cartográfica do local de captura. Detalhe no topo à esquerda a localização do estado de Goiás no Brasil e abaixo o contorno do município de São Miguel do Araguaia e o Rio Araguaia. Figura Principal: Imagem de satélite da área entre Mato Grosso (MT) e Goiás (GO). Em vermelho a extensão do Rio Araguaia que foi percorrida, a estrela branca corresponde a localização da Base do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) no Distrito de Luiz Alves [software ArcGIS versão 10.4 (Esri, 2016). ESRI. 2016. ArcGIS for Desktop. Ver. 10.1. Redlands (CA): Environmental System Research Institute, Inc.].....	17
Figura 6	Punção do seio venoso vertebral cervical de <i>Phrynos geoffroanus</i> (cágado-de-barbicha), com o uso de agulha 25 x 0,8 mm acoplada à seringa de 3 mL, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012 (OLIVEIRA et al., 2016).....	18
Figura 7	Fotomicrografia de extensão sanguínea de <i>Podocnemis expansa</i> (tartaruga-da-Amazônia), corada pelo método de Rosenfeld, observada em objetiva de imersão. Presença de gametócitos de hemogregarinas intracelulares em hemácias (setas).....	31
Figura 8	Estimativa das relações filogenéticas inferidas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (MV) e o modelo evolutivo TVM+G+I, baseada em fragmentos de 1.100 pb do gene 18S <i>rRNA</i> . Valores de suporte de clado para MV ($\geq 50\%$) acessados com 1.000 replicatas estão acima dos nodos relevantes. As sequências indicadas em negrito representam aquelas amplificadas no presente estudo e as identificações originais das amostras foram designadas (T1 a T5).	

	<i>Isospora suis</i> , <i>Sarcocystis</i> sp., <i>Eimeria sevilletensis</i> e <i>Theileria mutans</i> foram utilizados como grupo externo.....	37
Figura 9	Estimativa das relações filogenéticas inferidas utilizando a análise Bayesiana e o modelo evolutivo TVM+G+I, baseada em fragmentos de 1.100 pb do gene 18S <i>rRNA</i> . Valores de probabilidade posterior estão acima dos nodos relevantes acessados com 10^6 replicatas. As sequências indicadas em negrito representam aquelas provenientes deste estudo e as identificações originais das amostras foram designadas (T1 a T5). <i>Isospora suis</i> , <i>Sarcocystis</i> sp., <i>Eimeria sevilletensis</i> e <i>Theileria mutans</i> foram utilizados como grupo externo.....	38

1. INTRODUÇÃO

Registros de hemoparasitas em répteis são frequentemente relacionados a hemogregarinas e hemosporídeos descritos em lacertídeos, serpentes e testudines. A classificação morfológica dos hemoparasitas, quando realizada isoladamente, não é suficiente para o diagnóstico taxonômico. Para tanto, métodos moleculares se fazem necessários.

As pesquisas de detecção de material genômico de hemogregarinas em testudines são baseadas principalmente no gene 18S RNA ribossomal. Estudos sobre inferências filogenéticas de hemogregaríneos em testudines sul-americanos ainda são inexistentes, estão disponíveis apenas detecções de material genômico de hemogregarinas em testudines aquáticos sul-americanos cativos.

Já as detecções moleculares de hemosporídeos em testudines são predominantemente baseadas no gene mitocondrial Citocromo *b*. A caracterização filogenética de hemosporídeos em testudines sul-americanos foi realizada em testudines de água doce.

A caracterização filogenética mais robusta destes hemoparasitas em testudines necessita de sequências provenientes de diferentes espécies de répteis, oriundos de diversas localizações do globo. Tais informações possibilitariam avaliações de diversidade e distribuição de genótipos, associações de especificidade de hospedeiros, relações evolutivas destes agentes em testudines e inferências ecológicas e ambientais. Tendo em vista este enfoque, o presente estudo visa contribuir com novas sequências, para que tais relações sejam futuramente caracterizadas.

As inferências filogenéticas de hemoparasitas do Filo Apicomplexa em testudines, concentram-se em países da Europa, África, Oriente Médio e Ásia. As caracterizações realizadas em países americanos (Canadá, Nicarágua e Peru) são escassas. A investigação morfológica e caracterização filogenética de hemogregarinas se justifica em espécies de testudines aquáticos que possuem extensa distribuição geográfica na América do Sul, como *Phrynops Geoffroyanus* (cágado-de-barbicha) e *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Testudines Sul-Americanos (Chelidae e Podocnemididae)

Os testudíneos (Reptilia: Testudines), tradicionalmente denominados de quelônios (DUTRA, 2014), são animais pecilotérmicos, com o corpo protegido por um casco ósseo e apresentam crânio anápsido (LEGLER; GEORGES, 1993; ROSSI, 2006). Mundialmente, a ordem Testudines é constituída por 14 famílias, 90 gêneros, 442 táxons entre espécies (327) e subespécies (115) (VAN DIJK et al., 2014). Estima-se que 56 das espécies existentes ocorram na América do Sul (BOYER; BOYER, 2006) e 36 delas no Brasil, sendo duas espécies terrestres, cinco marinhas e 29 de água doce (BÉRNILS; COSTA, 2012).

Phrynops geoffroanus (cágado-de-barbicha) é uma espécie de testudine de água doce bastante comum (MOLINA, 2001), que ocorre em biomas diversos como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa. Sua distribuição geográfica se estende nas cinco regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sul e Sudeste) e em países da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai e Argentina) (RUEDA-ALMONACID et al., 2007; VAN DIJK et al., 2014) (Figura 1). Seu *habitat* são rios, córregos e lagos (RUEDA-ALMONACID et al., 2007), ambientes calmos com grande quantidade de matéria orgânica no fundo (SOUZA, 2004). Não está classificada como espécie ameaçada pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), nem incluída nos anexos da *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) (RUEDA-ALMONACID et al., 2007; VAN DIJK et al., 2014).



Figura 1. Distribuição geográfica de *Phrynos geoffroanus* (cágado-de-barbicha) na América do Sul, ilustrada em cor vermelha (VAN DIJK et al., 2014).

A massa corporal de *P. geoffroanus* adultos varia entre 0,6 a 4 Kg, tendo como média 2,5 Kg e pode chegar até 35 cm de comprimento (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007), sendo esta a maior medida atingida, geralmente, por fêmeas adultas (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Possui hábito onívoro (MOLINA, 2001) e quando habita rios urbanos e poluídos com descargas orgânicas, pode se alimentar basicamente de larvas e pupas de moscas da Família Chironomidae, resíduos domésticos, baratas, caramujos e restos de outros animais (SOUZA; ABE, 2000; 2001). Aspectos hematológicos (BRITES, 2002; FERRONATO et al., 2009; ZAGO et al., 2010), imunológicos (GENOY-PUERTO, 2008), efeitos metabólicos por contaminação (VENANCIO et al. (2013) e detecção de ectoparasitas e morfologia de hemoparasitas (BRITES; RANTIN, 2004) já foram pesquisados em *P. geoffroanus* de vida livre. A detecção molecular sem caracterização filogenética de hemogregarinas foi realizada apenas em *P. geoffroanus* de cativeiro (PESSOA, 2015; PESSOA et al., 2016).

Podocnemis expansa (tartaruga-da-Amazônia) é a maior espécie de testudine de água doce da América do Sul (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Sua ocorrência se estende do Brasil, Guiana Francesa, Guiana, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Trinidad (MOLINA, 2001; RUEDA-ALMONACID et al., 2007; VAN DIJK et al., 2014). No Brasil, sua distribuição engloba as regiões Norte e Centro-oeste (VAN DIJK et al., 2014) (Figura 2). De acordo com Rueda-Almonacid e colaboradores (2007), seu *habitat* abrange os biomas Amazônia e Cerrado, habitando águas das bacias do rio Amazonas, Essequibo e Orinoco e seus afluentes. A espécie está classificada como dependente de conservação para que não entre em risco de extinção pela IUCN e está incluída no anexo II da CITES.

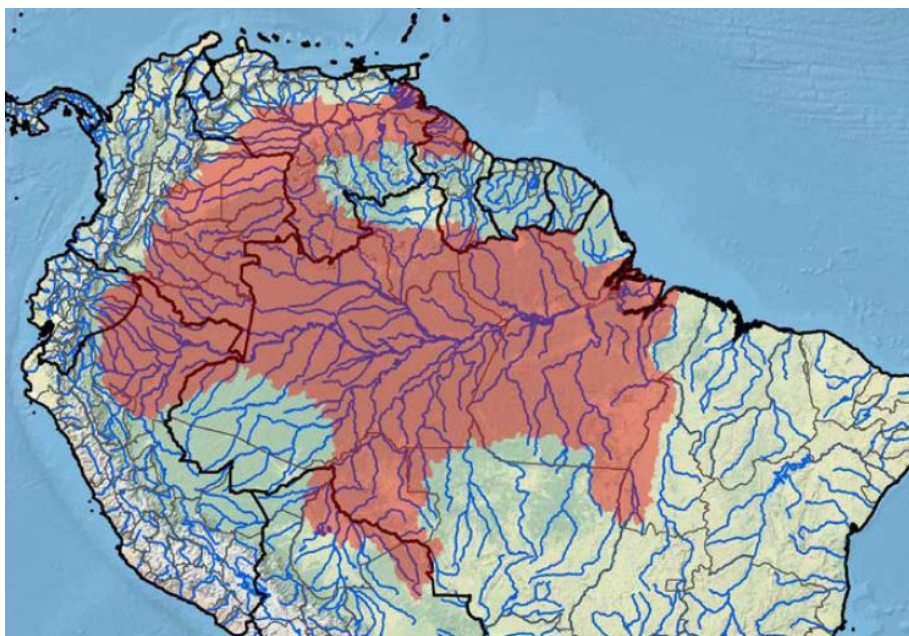


Figura 2. Distribuição geográfica de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia), na América do Sul foi ilustrada em cor vermelha (VAN DIJK et al., 2014).

A massa corporal de *P. expansa* adultos costuma ser entre 30 a 45 Kg, mas pode alcançar 60 Kg, ultrapassando os 90 cm de comprimento e 60 cm de largura. As fêmeas adultas possuem dimensões muito maiores que às de machos (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007; RUEDA-ALMONACID et al., 2007). A dieta é onívora (CUBAS; BAPTISTOTTE, 2007), porém é predominantemente herbívora, constituída por frutos, sementes, flores, folhas, caules tenros e esponjas de água doce (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

Quanto aos trabalhos publicados relacionados a *P. expansa* em cativeiro, foram encontradas pesquisas sobre aspectos hematológicos (OLIVEIRA-JÚNIOR; TAVARES-DIAS; MARCON; 2009) de *P. expansa* com e sem hemogregaríneos (PESSOA, 2015; PESSOA et al., 2016). Em outro trabalho, Picelli e colaboradores (2015), avaliaram a ocorrência e intensidade de parasitemia por hemogregarinas em *P. expansa* de vida livre e cativeiro. Na ocasião, nas *P. expansa* de vida livre (n 25) foi relatada a ausência de sanguessugas, supostamente relacionada ao período no qual foram realizadas as amostragens (entre outubro a dezembro de 2013), período das chuvas e elevação do leito d'água no Rio Javaés no Tocantins, próxima ao Parque Nacional do Araguaia (PICELLI et al., 2015). A detecção molecular de hemogregarinas foi realizada em *P. expansa* de cativeiro, apenas por reação de amplificação e sem caracterização molecular (PESSOA, 2015; PESSOA et al., 2016). Inferências filogenéticas foram realizadas para *Haemocystidium* (*Simondia*) spp. provenientes de *P. expansa* de vida livre no Peru (PINEDA-CATALAN et al., 2013).

2.2. Hemoparasitas do Filo Apicomplexa em testudines

Sabe-se que testudines, assim como outras espécies de répteis, são hospedeiros de hemoparasitas esporozoários intracelulares do Filo Apicomplexa, como hemogregarinas (Subordem Adeleorina: Famílias Haemogregarinidae e Karyolysidae) e hemosporídeos (Ordem Haemospororida: Família Haemoproteidae) (TELFORD JR., 2009).

O termo hemogregarina, é frequentemente usado em laudos de exames hematológicos, considerando a observação das extensões sanguíneas. Nesta técnica não é possível, apenas pela morfologia, chegar a classificação precisa de gênero (CAMPBELL, 2006b). As hemogregarinas comumente descritas em répteis pertencem aos gêneros *Hepatozoon*, *Haemogregarina*, *Karyolysus* e *Hemolivia*. *Haemogregarina* spp. (Família Haemogregarinidae) e já foram descritos em testudines de água doce (cágados) (JAKES et al., 2001; TELFORD JR. et al., 2009; DAVIS; STERRETT, 2011; PINEDA-CATALAN et al., 2013; ROSSOW et al., 2013; DVOŘÁKOVÁ et al., 2014; 2015; PICELLI et al., 2015; ARIZZA et al., 2016;

RAKSHSHANDEHROO; SHARIFIYAZDI; AHMADI, 2016). *Hemolivia* spp. (Família Karyolysidae) foram detectados em testudines aquáticos e terrestres (ŠIROKÝ; KAMLER; MODRÝ, 2004; ŠIROKÝ et al., 2007; HARRIS et al., 2013; KVIČEROVÁ et al., 2014).

Os gêneros dos hemosporídeos, também conhecidos pelo termo *malaria parasite* (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008), são *Plasmodium* spp. (Família Plasmodiidae), *Haemoproteus* spp. e *Haemocystidium* spp. (Família Haemoproteidae). *Haemoproteus* spp. foi descrito em testudines de água doce (JACOBSON, 2007; TELFORD JR., 2009) e terrestres (TELFORD JR., 2009; COOK; SMIT; DAVIES, 2010; ÖRKUN; GÜVEN, 2013; JAVANBAKHT et al., 2015); e *Haemocystidium* spp. já foram descritos em testudines de água doce [*Haemocystidium* (*Simondia*) spp.; PINEDA-CATALAN et al., 2013].

Os hemoprotzoários a serem investigados no presente trabalho (*Haemoproteus* spp., *Haemocystidium* spp., *Haemogregarina* spp. e *Hemolivia* spp.), são parasitas heteroxenos, possuem ciclo evolutivo típico dos coccídeos (TELFORD JR., 2009; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013) e geralmente parasitam as hemácias, e às vezes leucócitos, de répteis (JACOBSON, 2007). Os principais hospedeiros invertebrados (vetores) de hemogregarinas nos répteis terrestres são ácaros ixodides (carrapatos) (ŠIROKÝ; KAMLER; MODRÝ, 2004; ŠIROKÝ et al., 2007; JACOBSON, 2007; VILCINS et al., 2009; HERBERT et al.; 2010; HARRIS et al., 2013; KARADJIAN; CHAVATTE; LANDAU, 2015), ácaros mesostigmatas (HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ et al., 2014), mosquitos (TELFORD JR., WOZNIAK; BUTLER, 2001), moscas e percevejos (CAMPBELL, 2006a; JACOBSON, 2007). Nos répteis aquáticos os vetores de hemogregarinas parecem ser as sanguessugas (BRITES; RANTIN, 2004; JACOBSON, 2007; DVOŘÁKOVÁ et al., 2014; 2015; ARIZZA et al., 2016). Já para hemosporídeos em répteis terrestres e aquáticos, os vetores podem ser tabanídeos hematófagos (TELFORD JR., 2009). A coincidência de *habitats* dos hospedeiros e vetores é influenciado pelo inter-relacionamento de relevo, solo, clima, água, flora e fauna (NEVES, 2005).

A detecção de hemogregarinas em répteis não indica necessariamente que o animal esteja doente, representando apenas um achado casual (ALMOSNY; SANTOS, 2000; BRITES; RANTIN, 2004; ROSSOW et al., 2013). Nos exames

hematológicos de animais parasitados foram observadas diminuição das concentrações de proteínas séricas totais, globulinas e trombocitopenia em *P. geoffroanus* parasitados por hemogregarinas (PESSOA, 2015; PESSOA et al., 2016). As infecções por hemosporídeos podem causar redução de hemoglobina da hemácia infectada (CAMPBELL, 2006a; 2006b). A intensidade da afecção depende de vários fatores como: grau da resposta imune ou inflamatória desencadeada (NEVES, 2005), comprometimento do sistema imune (KNOTKOVA et al., 2005), idade e estado nutricional do hospedeiro, os órgãos atingidos (NEVES, 2005), estresse (ALMOSNY; SANTOS, 2000), número de formas infectantes presentes, virulência da amostra e associação de outras espécies de parasitas (NEVES, 2005).

2.3. Ciclo biológico de hemogregarinas e hemosporídeos que parasitam testudines

Durante o repasto sanguíneo, o hospedeiro invertebrado (vetor) se infecta com gametócitos presentes nas hemácias (ŠIROKÝ et al., 2007; JACOBSON, 2007; TELFORD JR., 2009; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013) (Figura 3, etapa “g”).

No intestino do vetor, os gametócitos se diferenciam em macro e microgametas (gametogonia); que se fundem (fase sexuada do ciclo), formando o zigoto (ŠIROKÝ et al., 2007; JACOBSON, 2007; TELFORD JR., 2009). Posteriormente, desenvolve-se o estágio esporogônico (esporogonia) com formação de oocistos contendo os esporocistos e dentro destes os esporozoítos (ŠIROKÝ et al., 2007; JACOBSON, 2007; TELFORD JR., 2009; KARADJIAN; CHAVATTE; LANDAU, 2015) (Figura 3, quadro preto e etapa “a”).

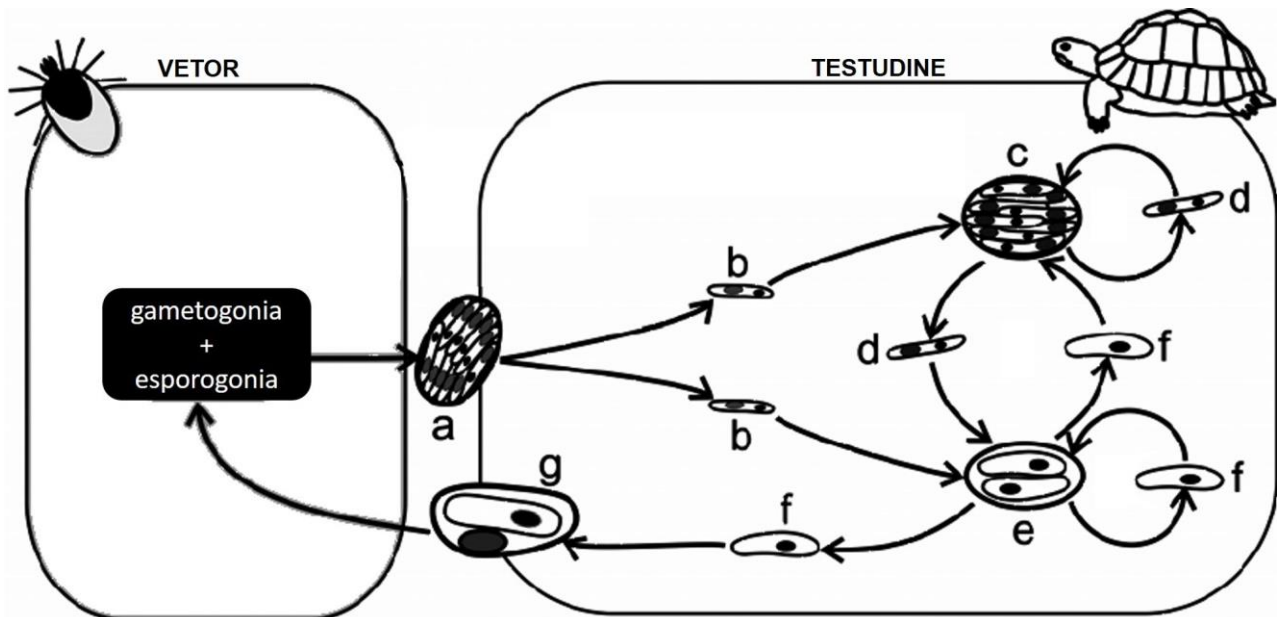


Figura 3. Representação das fases do ciclo biológico de hemogregarinas. Onde (a) ilustra esporocisto, (b) esporozoítos, (c) meronte ou esquizonte, (d) merozoíto pré-eritrocítico, (e) macromeronte, (f) merozoíto e (g) gametócito intra-eritrocitário (imagem adaptada de ŠIROKÝ et al., 2007).

O vetor inoculará nos hospedeiros vertebrados os esporozoítos por ocasião do repasto sanguíneo (Figura 3, etapa “b”). O hospedeiro vertebrado ao ingerir o vetor também pode infectar-se com os esporozoítos, como ocorre na infecção por *Hemolivia mauritanica* (ŠIROKÝ et al., 2007).

Os esporozoítos seguem por via sanguínea e penetram em células de tecidos (pulmões, fígado, baço e rins) do hospedeiro vertebrado e se tornam trofozoítos. Nos órgãos ocorre a fase de reprodução assexuada (estágio merogônico/esquizogonia) (JACOBSON, 2007; ŠIROKÝ et al., 2007; TELFORD JR., 2009; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; KARADJIAN; CHAVATTE; LANDAU, 2015).

No estágio merogônico há a formação de merontes ou esquizontes (Figura 3, etapa “c”) que originam diversos merozoítos pré-eritrocíticos (Figura 3, etapa “d”) (ŠIROKÝ et al., 2007; TELFORD JR., 2009; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013). Quando circulantes, os merozoítos (Figura 3, etapa “f”) invadem as hemácias e se dividem em merontes eritrocitários e macromerontes (Figura 3, etapa “e”), que originam mais merozoítos (ŠIROKÝ et al., 2007; TELFORD JR.; 2009; ROSSOW et al., 2013; KVIČEROVÁ et al., 2014; RAKHSHANDEHROO; SHARIFIYAZDI;

AHMADI, 2016). Quando ocorre a ruptura da hemácia, os merozoítos podem invadir outras hemácias para a formação de mais merontes ou darem origem aos gametócitos (Figura 3, etapa “g”) (ŠIROKÝ et al., 2007; TELFORD JR., 2009; PICELLI et al.; 2015).

2.4. Testudines e pesquisa de hemogregarinas e hemosporídeos

Hemogregarinas e hemosporídeos de testudines podem ser observados em extensões sanguíneas (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007), coradas com corante do tipo Romanowsky. A presença intracitoplasmática de gametócitos (CAMPBELL, 2006a; 2006b; ŠIROKÝ et al., 2007; SLOBODA et al., 2007; O'DWYER et al., 2013; PINEDA-CATALAN et al., 2013; PICELLI et al.; 2015) é observada, geralmente um gametócito por hemácia. Os gametócitos de hemogregarinas não possuem grânulos pigmentados e são em “formato de banana” (ŠIROKÝ; KAMLER; MODRÝ, 2004; CAMPBELL, 2006a; 2006b), já os de hemosporídeos apresentam grânulos de pigmentos refringentes (CAMPBELL, 2006a; 2006b; COOK; SMIT; DAVIES, 2010). As hemácias infectadas geralmente têm sua morfologia afetada, pois o gametócito ocasiona uma protuberância no citoplasma e pode ocorrer deslocamento do núcleo (JAKES et al., 2001; ŠIROKÝ et al., 2007; ROSSOW et al., 2013; DAVIS; STERRETT, 2011; PESSOA, 2015; PESSOA et al., 2016).

Nos cortes histológicos de órgãos corados com hematoxilina e eosina podem ser identificadas formas sugestivas de merozoítos e merontes (TELFORD JR., WOZNIAK; BUTLER, 2001; ŠIROKÝ et al., 2007; TELFORD JR., 2009). Apesar de répteis serem comumente parasitados por hemogregarinas e hemosporídeos, raramente são encontradas lesões em órgãos (JACOBSON, 2007). Em estudo de infecção experimental de *H. mauritanica* em *Testudo marginata* (tartaruga-de-esporas-africana), Široký e colaboradores (2007) observaram merontes em células do sistema retículo endotelial e hemácias, a maioria observada em órgãos parenquimatosos. Adicionalmente, descreveram as alterações patológicas atribuíveis a *H. mauritanica* como brandas e limitadas ao fígado e rins.

A avaliação taxonômica morfológica é realizada pela combinação da morfologia de gametócitos em hemácias dos testudines com a avaliação de estágios

do desenvolvimento parasitário ou fases esporogônicas no vetor (ŠIROKÝ; KAMLER; MODRÝ, 2004; JACOBSON, 2007). Esta técnica colaborou na elaboração de ciclos biológicos próprios de testudines (ŠIROKÝ et al., 2007) e na identificação de vetores participantes do ciclo (ŠIROKÝ; KAMLER; MODRÝ, 2004; ŠIROKÝ et al., 2007; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; TELFORD JR. et al, 2009; HARRIS et al., 2013; KARADJIAN; CHAVATTE; LANDAU, 2015; ARIZZA et al., 2016). Apesar de útil, esta metodologia não é confiável (BRITES, 2002; TELFORD JR. et al., 2009) e nem suficiente para o diagnóstico taxonômico (PINEDA-CATALAN et al., 2013; HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ et al., 2014), sendo necessária a utilização de métodos moleculares (UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004; PINEDA-CATALAN et al., 2013), como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de tecidos oriundos de biópsia ou necropsia e amostras de sangue (JOHNSON; ORIGGI; WELLEHAN JR., 2007).

2.4.1. Testudines e pesquisa de hemogregarinas

Investigações moleculares de hemogregarinas em répteis são baseadas principalmente no gene 18S RNA ribossomal e iniciaram a partir da década de 90, com estudo em serpentes e testudines terrestres (WOZNIAK; TELFORD JR.; MCLAUGHLIN, 1994). Na década seguinte, caracterizações filogenéticas de hemogregarinas foram realizadas com amostras de sangue obtidas de lagartos e serpentes (PERKINS; KELLER, 2001; UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004). Entre 2013 a 2016 caracterizações filogenéticas de hemogregarinas foram obtidas de amostras de testudines e vetores (HARRIS et al., 2013; DVOŘÁKOVÁ et al., 2014; 2015; KVIČEROVÁ et al., 2014; ARIZZA et al., 2016; RAKHSHANDEHROO; SHARIFIYAZDI; AHMADI, 2016). *Hemolivia* spp. foram caracterizadas filogeneticamente a partir de amostras de testudines de água doce na Nicarágua, testudines terrestres na Grécia e em países no Oriente Médio (Turquia, Síria e Iraque) (KVIČEROVÁ et al., 2014); e em carrapatos colhidos em testudines terrestres da Argélia (HARRIS et al., 2013). Foram realizadas inferências filogenéticas de *Haemogregarina* spp. em testudines de água doce no Canadá (BARTA et al., 2012), em países no Oriente Médio (Turquia, Síria e Irã) (DVOŘÁKOVÁ et al., 2014; RAKHSHANDEHROO; SHARIFIYAZDI; AHMADI, 2016),

no norte da África (Marrocos, Argélia) (DVOŘÁKOVÁ et al., 2014), no Sudeste da Ásia (Vietnam, Indonésia, Tailândia e China) (DVOŘÁKOVÁ et al., 2015) e alguns países europeus (Bulgária e Itália) (DVOŘÁKOVÁ et al., 2014; ARIZZA et al., 2016). Pesquisas foram realizadas sobre inferências filogenéticas de hemogregaríneos em testudines no continente americano apenas em testudines de água doce cativos provenientes da Nicarágua (KVIČEROVÁ et al., 2014) e de vida livre oriundos do Canadá (BARTA et al., 2012).

No que diz respeito a filogenia de hemogregaríneos em testudines na América do Sul, nada ainda foi estabelecido, apenas a detecção de material genômico de hemogregarinas, por fotodocumentação em gel de agarose, em amostras de testudines de água doce de cativeiro no Brasil (PESSOA, 2015; PESSOA et al., 2016). Pessoa e colaboradores (2016) observaram prevalência de 67,52% (52/77) em *P. geoffroanus* e de 63,63% (14/22) em *P. expansa* de hemogregarinas nas extensões sanguíneas; e amplificação de fragmentos baseados no gene 18S rRNA em amostras de 23,07% (12/77) *P. geoffroanus* e de 13,64% (3/22) *P. expansa*; foram positivos em ambos os testes 18,18% (12/66) dos animais (*P. geoffroanus* e *P. expansa*).

2.4.2. Testudines e pesquisa de hemosporídeos

A detecção de material genômico de hemosporídeos, com base no gene mitocondrial citocromo *b*, foi inicialmente pesquisada a partir de amostras de primatas (CREASEY et al., 1993; ESCALANTE et al., 1998), aves (BENSCH et al., 2000; PERKINS; SCHALL, 2002; HELLGREN; WALDENSTRÖM; BENSCH, 2004) e lagartos (PERKINS; SCHALL, 2002; VARDON; WARGO; SCHALL, 2005). Inferências filogenéticas de hemosporídeos em répteis oriundos do continente Americano ainda são predominantemente relacionadas a *Plasmodium* spp. em lagartos (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; FALK; MAHLER; PERKINS, 2011; FALK, 2013).

Pineda-Catalan e colaboradores (2013) propuseram uma nova classificação morfológica e filogenética para *Haemocystidium (Simondia) pacayae* e *H. (S.) peltoccephali* encontrados em extensões sanguíneas de 9,56% (13/136) de *Podocnemis unifilis* (tracajá) e 12,5% (12/96) de *P. expansa* de vida livre no Peru.

Quanto às análises por técnicas moleculares, observaram-se infecções isoladas e mistas de *Haemocystidium* (*Simondia*) spp.. Javanbakht e demais pesquisadores (2015) relataram que tanto na técnica morfológica, quanto na molecular, 19,73% (160/811) das amostras sanguíneas de testudines terrestres (*Testudo graeca* e *T. horsfieldii*) de vida livre (oriundos do Afeganistão, República da Georgia, Irã e Turquia) apresentaram positividade para *Haemoproteus anatolicum* e *H. caucásica*. Örkun e Güven (2013) caracterizaram morfológica e molecularmente de *H. anatolicum* em *T. graeca* de vida livre oriundos da Anatólia, na Turquia.

Apesar de já existirem algumas caracterizações filogenéticas de hemosporídeos em testudines aquáticos e terrestres de vida livre (ÖRKUN; GÜVEN, 2013; PINEDA-CATALAN et al., 2013; JAVANBAKHT et al., 2015), ainda são raras as contribuições sobre inferências filogenéticas de hemosporídeos em testudines sul-americanos (PINEDA-CATALAN et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este estudo foi proposto com objetivo de investigar a presença de hemogregarinas e hemosporídeos em *Phrynops geoffroanus* (cágados-de-barbicha) e *Podocnemis expansa* (tartarugas-da-Amazônia) de vida livre de dois ambientes diversos, utilizando métodos morfológicos e moleculares.

3.2. Objetivos específicos

A partir das amostras biológicas (sangue e tecidos) de *P. geoffroanus* e *P. expansa* de vida livre:

- Verificar a presença e intensidade de hemoparasitas nas extensões sanguíneas coradas e em cortes histológicos de fígado, baço, pulmão e coração (de animais que vieram a óbito);
- Investigar a presença DNA e traçar inferências filogenéticas de hemogregarinas (*Haemogregarina* spp. e *Hemolivia* spp.) e hemosporídeos (*Haemoproteus* spp. e *Haemocystidium* spp.).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e locais do estudo

4.1.1. *Phrynops geoffroanus* (cágados-de-barbicha)

A captura ativa dos 83 animais foi realizada com puçás, no período de fevereiro a maio de 2012, no Córrego Cerradinho (Figura 4), no município de Jaboticabal (21°15'22"S e 48°18'58"W), nordeste do Estado de São Paulo (IBGE, 2017) em área de transição entre os biomas Cerrado e mata atlântica. O Córrego Cerradinho, possui sua nascente na zona rural e possui um percurso de aproximadamente 11 Km (BORGES, GALBIATTI, FERRAUDO, 2003). Inicialmente, na região rural ele é tangenciado por propriedades rurais e praticamente não apresenta mata ciliar. No trecho urbano o córrego é parcialmente contido nas suas laterais por meio de mureta formada por pedras.

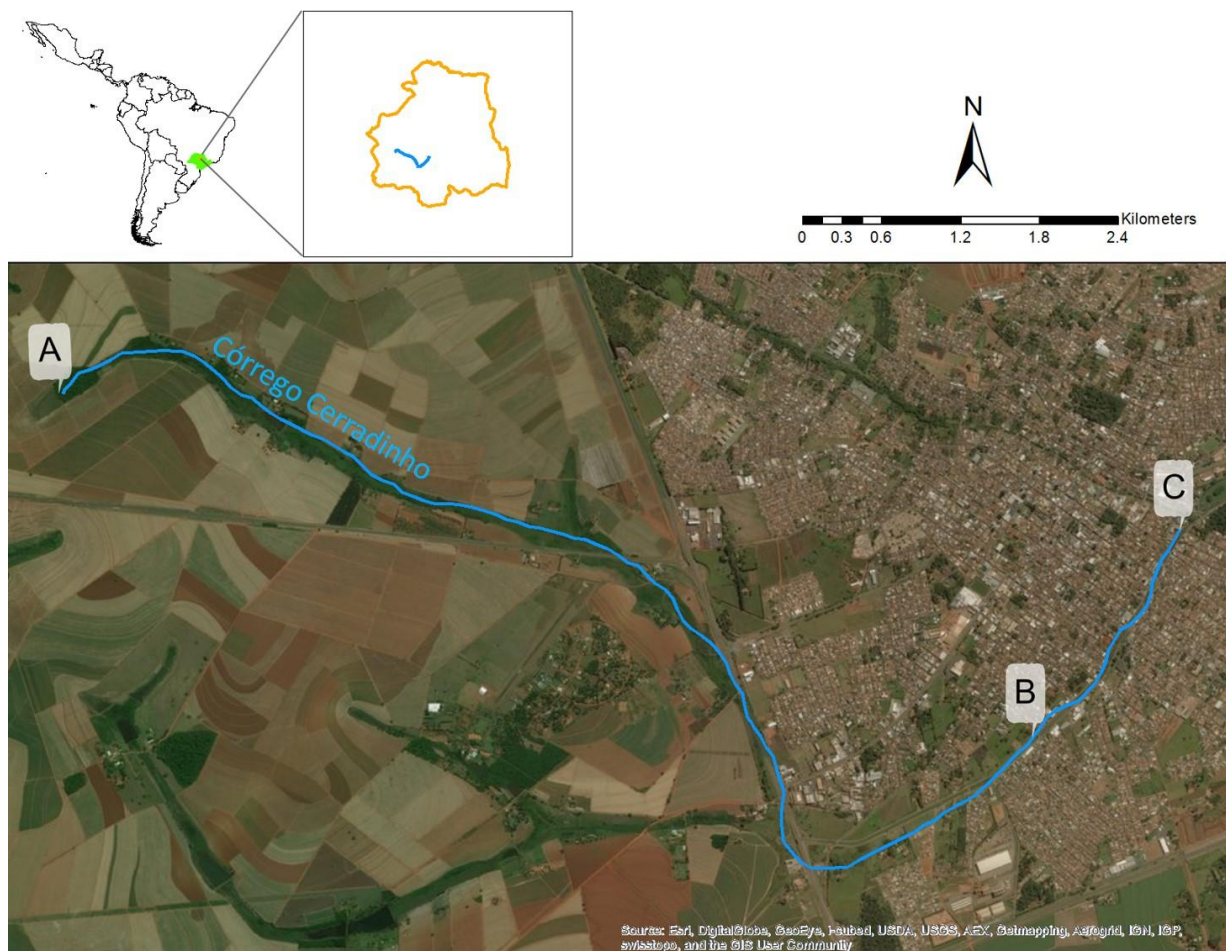


Figura 4. Região da captura de *Phrynops geoffroanus*. Representação cartográfica, no detalhe no topo à esquerda a localização do estado de São Paulo (verde) no Brasil e no topo à direita em laranja o município de Jaboticabal e em azul o Córrego Cerradinho. Imagem de satélite do município de Jaboticabal-SP, com destaque em azul para o percurso do Córrego Cerradinho (A - C) e o trecho considerado para o estudo (B - C), que representa 1,9 Km do córrego [software ArcGIS versão 10.4 (Esri, 2016). ESRI. 2016. ArcGIS for Desktop. Ver. 10.1. Redlands (CA): Environmental System Research Institute, Inc.].

Os animais foram transportados em caixas plásticas até a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista (FCAV/Unesp), para seu manejo, que constituiu em: colheita de material biológico, marcação individual com microchip subcutâneo e identificação externa não

invasiva (placa plástica numerada colada na carapaça). Posteriormente, foram recolocados no Córrego, no mesmo local de origem.

No decorrer da etapa de capturas dos *P. geoffroanus* observou-se, no mês de abril de 2012, alta mortalidade de peixes e testudines e algumas aves. Amostras de fígado de *P. geoffroanus* que vieram a óbito foram avaliadas pelo CEATOX-FMVZ/Unesp, Câmpus de Botucatu-SP, o qual identificou composto de carbamatos como causa da intoxicação e mortalidade. Na mesma ocasião em que foram encontrados os animais mortos, não se observou insetos, geralmente presentes em abundância no local. Dos animais que vieram a óbito, foram colhidas amostras de órgãos (fígado, baço, pulmão e coração) que foram utilizadas para o presente estudo.

A obtenção das amostras biológicas e demais procedimentos em *P. geoffroanus* foram devidamente autorizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp nº 2935/17 (páginas ix) e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente nº 28440-1 (páginas x e xi).

4.1.2. *Podocnemis expansa* (Tartarugas-da-Amazônia)

A captura dos sete animais foi realizada em outubro de 2014 na Área de Proteção Ambiental (APA) Meandros do Araguaia (13°17'49.0"S 50°36'16.5"W a 13°30'00.0"S 50°43'29.51"W), em uma das bases do Centro Nacional de Manejo e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (13°13'02.1"S 50°34'37.8"W). Esta área do bioma Cerrado, está localizada no noroeste de estado de Goiás, próxima ao Distrito de Luiz Alves, Município de São Miguel do Araguaia-GO, Brasil (Figura 5) e inclui o Rio Araguaia com seus lagos (braços do rio) e a abundante mata ciliar ao redor. Os animais foram capturados por meio de "cambuins", que é um sistema de iscas/anzóis presas em pedaço de isopor, técnica amplamente utilizada na região para captura de testudines aquáticos (ALVES JÚNIOR, 2013).

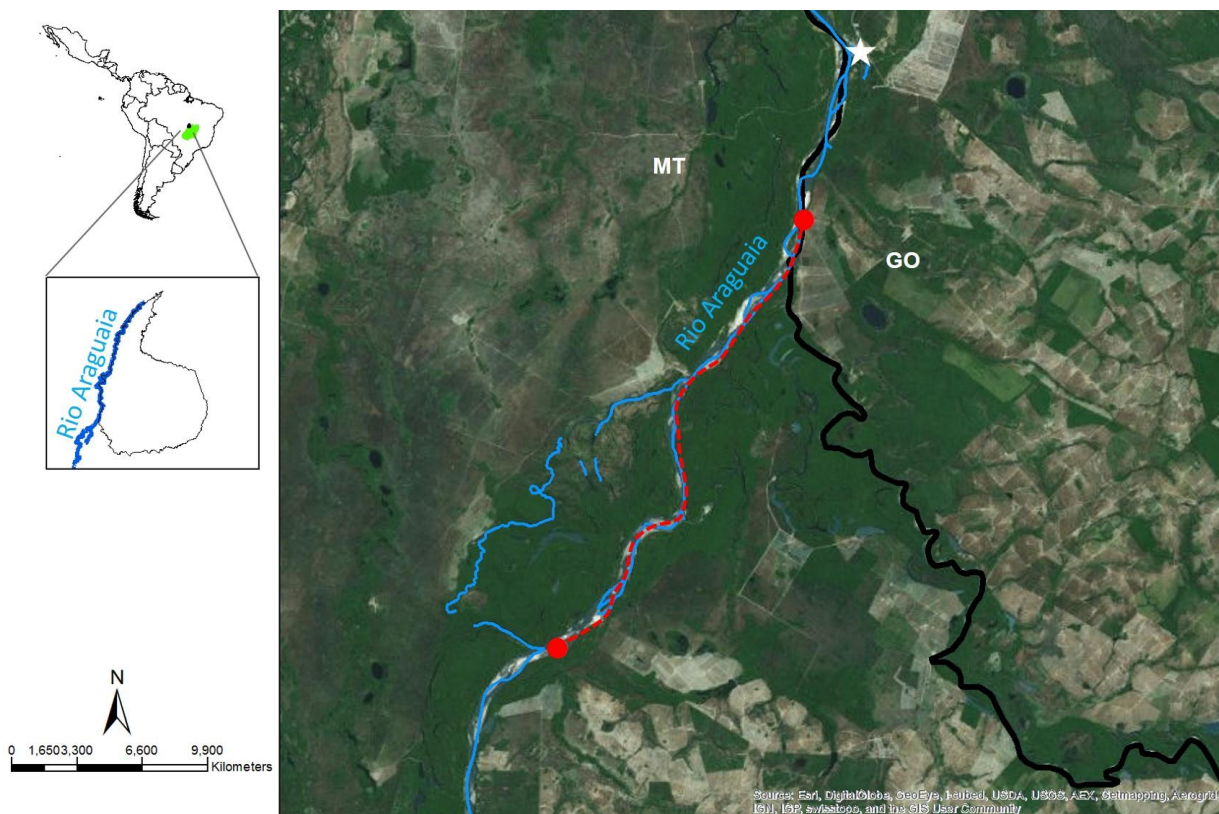


Figura 5. Representação cartográfica do local de captura. Detalhe no topo à esquerda a localização do estado de Goiás no Brasil e abaixo o contorno do município de São Miguel do Araguaia e o Rio Araguaia. Figura Principal: Imagem de satélite da área entre Mato Grosso (MT) e Goiás (GO). Em vermelho a extensão do Rio Araguaia que foi percorrida, a estrela branca corresponde a localização da Base do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) no Distrito de Luiz Alves [software ArcGIS versão 10.4 (Esri, 2016). ESRI. 2016. ArcGIS for Desktop. Ver. 10.1. Redlands (CA): Environmental System Research Institute, Inc.].

A obtenção das amostras biológicas e demais procedimentos em *P. expansa*, foram devidamente autorizadas, pela CEUA da FCAV-Unesp nº 2935/17 (página ix) e SISBIO do ICMBio do Ministério do Meio Ambiente nº 13447-6 (páginas xii e xiii).

4.2. Inspeção de ectoparasitas e colheita de amostras biológicas

Os 83 *P. geoffroanus* e os sete *P. expansa* foram contidos manualmente e submetidos ao exame físico, de acordo com Werther (2014), para verificar a presença de ectoparasitas.

Posteriormente foram colhidas amostras de sangue de no máximo, 1% da massa corporal (CAMPBELL, 2006a), utilizando agulhas hipodérmicas 13 x 0,45 mm, 25 X 0,7 mm ou 25 X 0,8 mm descartáveis, acopladas a seringas descartáveis de 1 ou 3 mL, dependendo do tamanho do indivíduo. Em *P. geoffroanus* as amostras de sangue foram obtidas por punção do seio venoso vertebral cervical (AVILA JUNIOR; SANTOS; PACHALY, 2007), posicionada dorso-caudalmente ao crânio (Figura 6). Em *P. expansa*, o acesso foi pela veia coccígea dorsal (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013), na região do terço médio da cauda.



Figura 6. Punção do seio venoso vertebral cervical de *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha), com o uso de agulha 25 x 0,8 mm acoplada à seringa de 3 mL, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP, 2012 (OLIVEIRA et al., 2016).

Foram colhidas alíquotas de sangue com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para realização de técnicas moleculares, que foram armazenadas em microtubos plásticos a -80°C . Adicionalmente, foram colhidas amostras sem anticoagulante que foram utilizadas para confecção de extensões

sanguíneas, que após secas foram fixadas e coradas pelo método de Rosenfeld (CAMPBELL, 2006a) para pesquisa de hemoparasitas (CAMPBELL, 2006a; ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

Dentre os 83 *P. geoffroanus* dos quais foram colhidas amostras de sangue em EDTA para pesquisa de hemoparasitas, 31 vieram a óbito após acidente ambiental e foram necropsiados nas instalações do Departamento de Patologia Veterinária (DPVe) da FCAV/Unesp, seguindo os protocolos de Matushima (2007) e Terrell e Stacy (2007). Durante a necropsia foram colhidos fragmentos de fígado, baço, pulmão e coração, armazenados individualmente em microtubos plásticos de 2 mL e mantidos a -20°C, para posterior extração do DNA e investigação de material genômico dos hemoparasitas. Paralelamente foram colhidas amostras dos órgãos, fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, para posterior processamento histopatológico. Por fim, o restante do fígado foi reservado a -20°C para futuras pesquisas toxicológicas, uma vez que houve mortalidade em decorrência da contaminação ambiental.

4.3. Processamento das amostras

A extensões sanguíneas foram coradas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-Unesp.

A confecção de lâminas histopatológicas e as técnicas moleculares relacionadas à reação em cadeia da polimerase qualitativa (cPCR) foram realizadas no Laboratório de Histopatologia e Imunoparasitologia, respectivamente, localizados no DPVe da FCAV-Unesp.

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) do Departamento de Tecnologia da FCAV/Unesp.

4.3.1. Avaliação da parasitemia e morfologia de hemoparasitas

As extensões sanguíneas sem anticoagulante coradas pelo método tipo Rosenfeld (CAMPBELL, 2006a) foram avaliadas em microscópio de luz (Olympus BX-43) acoplado a uma câmera (Olympus DP73). A parasitemia foi realizada pela

inspeção de 2×10^3 hemácias sob magnificação de 400x (PICELLI et al., 2015). Em caso de nenhum hemoparasita ser observado, foi conduzida a avaliação de um total de 5×10^3 hemácias (HARRIS; MAIA; PERERA, 2011; RAKHSHANDEHROO; SHARIFIYAZDI; AHMADI, 2016). Quando, ainda assim, nenhum parasita era detectado por essa metodologia, a extensão sanguínea era considerada negativa.

A avaliação morfológica de hemoparasitas foi realizada seguindo as características morfológicas de hemoparasitas descritas por Telford Jr. (2009), pela avaliação de 20 campos, sob objetiva de imersão. O registro fotográfico e a morfometria [média de tamanho (μm), comprimento *versus* largura e desvio padrão] das células parasitadas e gametócitos, assim como a descrição das alterações causadas pelos parasitas nas células infectadas foram analisadas por sistema computadorizado de análise e mensuração de imagem utilizando o *software* Olympus cellSens™ *microscope imaging Standard*.

4.3.2. Exames histopatológicos

A partir dos fragmentos dos órgãos de *P. geoffroanus*, fixados em formol 10% por 24 horas, foram confeccionadas as lâminas histológicas, que foram posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (JECKEL NETO, 2007). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus BX-43) acoplado a uma câmera (Olympus DP73), em aumento de 100x e 400x. Durante a análise histopatológica foram consideradas a localização, a distribuição e a intensidade das alterações em fígado, baço, pulmão e coração. Concomitantemente, foram investigadas estruturas sugestivas de merontes e merozoítos nos tecidos e gametócitos em hemácias; e quando presentes, seria realizada a morfologia (TELFORD JR.; WOZNIAK; BUTLER, 2001; TELFORD JR., 2009), o registro fotográfico em objetiva de imersão e mensuração utilizando o *software* Olympus cellSens™ *microscope imaging Standard*.

4.3.3. Detecção de material genômico de hemoparasitas

A fim de evitar possível contaminação por *amplicons*, os processos de extração de DNA, preparação da reação, amplificação e eletroforese foram realizados em diferentes salas.

4.3.3.1. Extração de DNA e controle de qualidade do material genômico

A extração de DNA das amostras de sangue em EDTA (10 µL) e de tecidos congelados (10 mg de baço e 25 mg dos demais órgãos) foi realizada individualmente, com o *QIAmp DNeasy Blood & Tissue Kit (50)* (protocolos 1a e 1c do cat. nº 69504; QIAGEN®, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Cada alíquota de DNA extraído foi identificada e mantida a -20°C até realizar a cPCR.

Com o intuito de checar a qualidade da extração de DNA e estimar a presença de inibidores, as alíquotas de DNA genômico tiveram sua concentração e a absorvância (relações 260/280 e 260/230nm) mensuradas em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, EUA).

Também a fim de verificar a qualidade do material genômico extraído, foram realizadas reações de cPCR que amplificam um fragmento de aproximadamente 1,2 kb do intron nuclear R35 (oriundo da impressão digital do RNA da proteína 35), que identifica a Família Chelidae (FUJITA et al., 2004), como controle endógeno da cPCR. Os ensaios de amplificação foram realizados utilizando uma reação de volume total de 25 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, tampão da PCR 1x (PCR Buffer 10x - 100 nM Tris-Cl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dNTP) (Life Technologies®, USA), 2 mM Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador [R35EX1 (5'-ACGATTCTCGCTGATTCTTGC -3') e R35EX2 (5'-GCAGAAACTGAATGTCTCAAAGG -3')] (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte-MG), 1 U *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen® TM Life Technologies, USA) e água ultra-pura (*Nuclease-Free Water*, Promega®, USA) esterilizada q.s.p.. A reação de amplificação foi conduzida em termociclador (T100™ *Thermal Cycler*, BioRad®,

USA) e os ciclos de amplificação foram realizados conforme Fujita et al. (2004): desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 36 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 90 segundos e extensão a 72°C por dois minutos; seguidos por extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram utilizados controle positivo (*P. expansa*) e negativo em cada reação (água ultra-pura esterilizada).

4.3.3.2. Detecção e caracterização molecular de hemoparasitas

As amostras de DNA positivas nos ensaios de reação de cPCR de controle endógeno da reação foram submetidas à reação de amplificação para hemosporídeos e hemogregarinas.

4.3.3.2.1. Reações de amplificação para Hemosporídeos (gene Citocromo *b*)

Para a análise molecular de hemosporídeos (*Haemoproteus* spp. e *Haemocystidium* spp.) baseada no gene mitocondrial Citocromo *b*, foram utilizados protocolos de *nested* PCR com poucas modificações (HELLGREN; WALDENSTRÖM; BENSCH, 2004; VARDÖ; WARGO; SCHALL, 2005; JAVANBAKHT et al., 2015). Os oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemosporídeos se basearam na porção 5' terminal do gene mitocondrial Citocromo *b* (CREASEY et al., 1993; ESCALANTE et al., 1998; BENSCH et al., 2000; PERKINS; SCHALL, 2002; HELLGREN; WALDENSTRÖM; BENSCH, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemosporídeos com base no gene mitocondrial Citocromo *b*, referências e o tamanho de fragmentos que flanqueiam.

cPCR	Oligonucleotídeos iniciadores		Referências	Fragmento
Reação A	HaemNFI	5'-CAT ATA TTA AGA GAA ITA TGG AG-3'	Hellgren, Waldenström e Bensch (2004)	
	HaemNR3	5'-ATA GAA AGA TAA GAA ATA CCA TTC-3'		
Nestcd Reação A	HAEMF	5'-ATG GTC CTT TCG ATA TAT GCA TG-3'	Bensch et al. (2000)	~480 pb
	HAEMR2	5'-GCA TTA TCT GGA TGT GAT AAT GGT-3'		
Reação B	DW2	5'-TAA TGC CTA GAC GTA TTC CTG ATT ATC CAG-3'	Perkins e Schall (2002)	
	DW4	5'-TGT TTG CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG-3'		
Nestcd Reação B	DW1	5'-TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG-3'	Perkins e Schall (2002)	~1,2 kb
	DW6	5'-GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG-3'		
Reação C	DW2	5'-TAA TGC CTA GAC GTA TTC CTG ATT ATC CAG-3'	Perkins e Schall (2002)	
	DW4	5'-TGT TTG CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG-3'		
Nestcd Reação C	DW1	5'-TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG-3'	Perkins e Schall (2002)	~673 pb
	DW3	5'-TGC TGT ATC ATA CCC TAA AG-3'		

Os ensaios de amplificação foram realizados utilizando uma reação de volume total de 25 µL (Apêndice A), contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra para a cPCR inicial e 1 µL do produto da amplificação na cPCR seguinte (*Nested*). Na “Reação A” e “*Nested* da Reação A” foram utilizados: tampão da PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP (Life Technologies®, USA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte-MG), 0,75 U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen® TM Life Technologies, USA) e água ultra-pura esterilizada q.s.p.. Já nas reações de amplificação das “Reação B”, “*Nested* da Reação B”, “Reação C” e “*Nested* da Reação C” foram utilizados tampão da PCR 1x; 0,2 mM de cada dNTP (Life Technologies®, USA); 2 mM de Cloreto de Magnésio, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*) (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte-MG), 1 U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen® TM

Life Technologies, USA) e água ultra-pura (*Nuclease-Free Water*, Promega®, USA) esterilizada q.s.p..

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (T100™ *Thermal Cycler*, BioRad®, USA), programado para realizar os ciclos conforme descritos na Tabela 2. Em cada reação foram utilizados controle negativo (água ultra-pura esterilizada) (*Nuclease-Free Water*, Promega®, USA) e positivo conhecido (*Haemoproteus* sp.; LUZZI et al., 2014a,b; WERTHER et al., 2014; 2016).

Tabela 2. Condições térmicas de ciclagem das reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemosporídeos com base no gene mitocondrial Citocromo *b*.

Identificação		Protocolo de amplificação			
cPCR	Primers*	Condições			Referência
		Desnaturação inicial	Nº de ciclos (Desnaturação, anelamento, extensão)	Extensão final	
Reação A	HaemNFI HaemNR3	94°C/3 min	20 ciclos (94°C/30 seg, 50°C/30 seg, 72°C/45 seg)	72°C/ 10min	Hellgren, Waldenström e Bensch (2004)
<i>Nested</i> Reação A	HAEMF HAEMR2	94°C/3 min	35 ciclos (94°C/30 seg, 50°C/30 seg, 72°C/45 seg)	72°C/ 10min	
Reação B	DW2 DW4	95°C/5 min	35 ciclos (94°C/20 seg, 60°C/20 seg, 72°C/90 seg)	72°C/ 5 min	Javanbakht et al. (2015)
<i>Nested</i> Reação B	DW1 DW6	95°C/5 min	40 ciclos (94°C/20 seg, 50°C/20 seg, 72°C/60 seg)	72°C/ 7 min	
Reação C	DW2 DW4	95°C/5 min	35 ciclos (94°C/20 seg, 60°C/20 seg, 72°C/90 seg)	72°C/ 5 min	Vardo, Wargo e Schall (2005)
<i>Nested</i> Reação C	DW1 DW3	94°C/5 min	40 ciclos (94°C/20 seg, 50°C/20 seg, 72°C/90 seg)	72°C/ 7 min	

* oligonucleotídeos iniciadores

4.3.3.2.2. Reações de amplificação para Hemogregarinas (gene 18S rRNA)

As amostras de DNA extraído foram submetidas à duas reações de cPCR distintas, baseados na sequência do gene 18S rRNA para identificar hemogregarinas.

O primeiro par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado foi HepF300 (5' - GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACG - 3') e HepR900 (5' - CAAATCTAAGAATTCACCTCTGAC - 3') (UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004) que

amplifica 581 pb. Os ensaios de amplificação foram realizados utilizando uma reação de volume total de 25 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, tampão da PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP (Life Technologies®, USA), 1,5 mM MgCl₂, 0,6 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (HepF300/HepR900) (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte-MG), 1 U *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen® TM Life Technologies, USA) e água ultra-pura (*Nuclease-Free Water*, Promega®, USA) esterilizada q.s.p..

O segundo par HEMO1 (5' - TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG - 3') e HEMO2 (5' - CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC - 3') (PERKINS; KELLER, 2001), flanqueia um fragmento de 900 pb. Os ensaios de amplificação foram realizados utilizando uma reação de volume total de 25 µL, contendo uma mistura de 5 µL do DNA-amostra, tampão da PCR 1x, 0,2 mM de cada dNTP (Life Technologies®, USA), 2,5 mM MgCl₂, 0,3 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (HEMO1/ HEMO2) (Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte-MG), 1,5 U *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen® TM Life Technologies, USA) e água ultra-pura (*Nuclease-Free Water*, Promega®, USA) esterilizada q.s.p..

A reação de amplificação foi conduzida em termociclador (T100™ *Thermal Cycler*, BioRad®, USA) e as condições térmicas de ciclagem de amplificação e referências estão descritas na Tabela 3. Em cada ensaio de cPCR foram utilizados controles negativo (água ultra-pura esterilizada) (*Nuclease-Free Water*, Promega®, USA) e positivo conhecido (*Hepatozoon* sp.; ANDRÉ et al., 2010).

Tabela 3. Relação de oligonucleotídeos iniciadores dos protocolos de reações de amplificação de fragmentos de DNA de hemogregarinas baseadas no gene 18S rRNA.

Identificação		Protocolo de amplificação			
Cpnr	Primers*	Condições			Referência
		Desnaturação inicial	Nº de ciclos (Desnaturação, anelamento, extensão)	Extensão final	
Reação 1	HepF300 HepR900	94°C/3 min	35 ciclos (94°C/45 seg, 56°C/60 seg, 72°C/60 seg)	72°C/ 10min	O'Dwyer et al. (2013)
Reação 2	HEMO1 HEMO2	94°C/3 min	35 ciclos (94°C/45 seg, 56°C/60 seg, 72°C/60 seg)	72°C/ 10min	Harris, Maia e Perera (2011)

* oligonucleotídeos iniciadores

4.3.3.3. Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos da amplificação da cPCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1% em tampão de corrida TEB 1x pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA), corado com brometo de etídio (0,04 µL/mL). A eletroforese foi realizada a 100V/150mA durante 70 minutos.

Para a determinação dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base ou 1kb DNA *Ladder* (Life Technologies®, Brasil), dependendo do tamanho do fragmento flanqueado no ensaio de cPCR. Os resultados analisados por fotodocumentação por meio de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (*ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software*, BioRad®, USA).

4.3.3.4. Reação de reamplificação

Os produtos da cPCR, referentes às amostras que apresentaram bandas visíveis na fotodocumentação, foram submetidos à reação de reamplificação.

As reações de reamplificação foram realizadas utilizando uma reação de volume total de 100 µL e seguiram a proporção de 4 x o volume dos ingredientes a reação de cPCR que a originou, com exceção do volume do DNA (produto da amplificação) que foi de 2 µL. As temperaturas e tempos de ciclagem foram mantidos.

4.3.4. Reação de sequenciamento

4.3.4.1. Purificação dos amplicómeros

Após a reação de reamplificação, foi realizada a purificação dos produtos da cPCR com o *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Fermentas®, São Paulo-SP), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3.4.2. Quantificação de DNA dos amplicómeros

A quantificação do material genômico total do produto purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop®, Thermo Scientific, EUA), por meio da mensuração da absorbância de cada amostra.

4.3.4.3. Reação de sequenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados purificados foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), no CREBIO da FCAV/Unesp.

Para o sequenciamento dos produtos foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de amplificação. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin-Elmer Applied Biosystems®). Foram utilizados 3,5 µL do Tampão 2,5 x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM MgCl₂), 0,5 µL de *Big Dye*, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultrapura e 1,5 µL de DNA. As amplificações foram realizadas inicialmente em termociclador (MJ Research-Inc) a 96°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento por 30 segundos (temperatura de anelamento variou de acordo com o protocolo de PCR para cada par de oligonucleotídeo iniciador) e extensão a 60°C por 4 minutos e mantida a 4°C por tempo indeterminado.

O processo de lavagem das amostras foi realizado adicionando-se 80 µL de isopropanol 75% em cada amostra. A placa foi selada com alumínio e, após incubação por 15 minutos em local escuro à temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de etanol 70% foram adicionados, e a placa novamente centrifugada, por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e a mesma quantidade de etanol 70% foi acrescida, repetindo o passo anterior. A placa foi centrifugada invertida (aceleração e desaceleração) e em seguida colocada na bomba de vácuo por 5 minutos para

completa secagem das amostras. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador (ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer - Applied Biosystems) em ambas direções (*forward e reverse*).

4.3.5. Análise das sequências

A qualidade dos eletroferogramas de ambas as direções obtidos por meio do sequenciamento dos produtos amplificados purificados foi visualmente analisada no programa BioEdit versão 7.0.5.3 (HALL, 1999) e pelo software Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A trimagem foi feita pelo programa PhredPhrap (EWING et al., 1998), que avaliou os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. A sequência consenso foi obtida utilizando o programa PhredPhrap (EWING et al., 1998).

A fim de adquirir fragmento com maior extensão de pares de bases nas sequências com base no gene 18S *r*RNA, foram combinadas as sequências consenso obtidas a partir dos oligonucleotídeos iniciadores HepR300/HepR900 e HEMO1/HEMO2 (HARRIS; MAIA; PERERA, 2011; MAIA; HARRIS; PERERA, 2011; HARRIS et al., 2013; O'DWYER et al., 2013; HARRIS; BORGES-NOJOSA; MAIA, 2015).

Com o propósito de analisar a identidade das sequências consenso obtidas, estas foram confrontadas com fragmentos gênicos previamente depositados no GenBank, com o auxílio da ferramenta BLASTn <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Posteriormente, as sequências do presente estudo salvas em modo "FASTA" foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do Genbank, utilizando o software MAFFT alinhamento múltiplo de sequências versão 7 <<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>> (KATOH; STANDLEY, 2013, 2016; YAMADA; TOMII; KATOH, 2016). *Eimeria sevilletensis* (número de acesso do Genbank AF311644), *Isospora suis* (U97523), *Sarcocystis* sp. (U97524) e *Theileria mutans* (FJ213586) foram incluídos como grupo externo próximo disponível para

hemogregarinas. As sequências alinhadas foram editadas manualmente no programa BioEdit versão 7.0.5.3 (HALL, 1999).

A escolha do modelo evolutivo e de substituição foi realizado utilizando o *software* IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015) pelo W-IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016), e a opção *Akaike Information Criterion* (AIC) a fim de selecionar o modelo evolutivo *best of fit*. As inferências filogenéticas por máxima verossimilhança (MV) foram realizadas, para sequências do gene 18S *rRNA*, utilizando o *software* IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015) pelo W-IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016), com modelo de substituição TVM, taxa de heterogeneidade foi Gama (G) e proporção de sítios invariáveis (I), utilizando 1.000 replicatas de suporte de clado. A análise Bayesiana foi realizada para sequências do gene 18S utilizando o *software* MrBayes 3.2.2 *on XSEDE* (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) via portal CIPRES *Science Gateway* (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010), com 10⁶ gerações e números de classes de substituição variando conforme o modelo evolutivo TVM+G+I, encontrado utilizando o *software* IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015) pelo W-IQ-TREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016). A edição das árvores filogenéticas, assim como o enraizamento (via grupo externo), foi realizada utilizando o *software* Treegraph 2.0.56-381 beta (STÖVER; MÜLLER, 2010). Os suportes dos cladogramas para a análise de MV foi estimado utilizando a análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) e a análise Bayesiana pela probabilidade posterior (HUELSENBECK et al., 2001).

4.4. Análise estatística

Para a comparação entre as proporções de resultados obtidos de hemácias normais e parasitadas foi utilizado o Teste t ou Mann Whitney, de acordo com a distribuição dos dados. As variáveis comprimento, largura e área de célula e núcleo das hemácias foram estudadas conjuntamente, com emprego de análise multivariada, pelo teste de Análise de Componentes Principais (PCA). As análises foram realizadas no programa estatístico SAS (versão 9.1; SAS Institute, Cary, NC, EUA). Adotou-se o nível de significância (p) de 5%.

5. RESULTADOS

Os achados dos diversos procedimentos (inspeção de ectoparasita, exame microscópico das extensões e cortes histológicos e biologia molecular) de cada uma das espécies de testudines do estudo foram relacionados resumidamente na Tabela 4:

Tabela 4. Resultados dos procedimentos e dos exames das amostras biológicas de *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha) e *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia) quanto a investigação de hemogregarinas (HG) e hemosporídeos (HP).

Metodologias	Amostras de hospedeiros vertebrados	
	<i>P. geoffroanus</i> (n 129)	<i>P. expansa</i> (n 7)
Inspeção de ectoparasitas	Ausente	Ausente
Extensão sanguínea	Negativo para HP e HG	Negativo para HP
		Positivo (n 7) para HG
Histopatologia	Negativo para HP e HG	-
Molecular	Amplificou DNA (n 9) para HP “Nested Reação B” (n 9)	Amplificou DNA (n 7) “Nested Reação B” (n 6) “Nested Reação C” (n 1)
	Amplificou DNA (n 61) para HG HepF300/HepR900 (n 61)	Amplificou DNA (n 7) HepF300/HepR900 (n 7) HEMO1/HEMO2 (n 6)
Filogenia	Sem sequências úteis de HP e HG	Sem sequências úteis de HP Caracterização (n 5) de HG

5.1. Avaliação de parasitemia e exames histopatológicos

5.1.1. Análise de extensões sanguíneas e cortes histológicos de *Phrynops geoffroanus*

Das extensões sanguíneas dos 83 *P. Geoffroanus* nenhuma estrutura semelhante a gametócitos foi observada, tampouco nos eritrócitos de vasos nos cortes histológicos dos 31 *P. Geoffroanus* que vieram a óbito.

Na avaliação histológica de fígado, baço, pulmão e coração dos 31 *P. Geoffroanus* necropsiados, não foram detectadas estruturas sugestivas de merontes ou merozoítos.

5.1.2. Análise de extensões sanguíneas de *Podocnemis expansa*

Foram observados gametócitos de hemogregarinas pela análise de extensões sanguíneas nas sete *P. expansa* (100%) avaliadas (Figura 7).

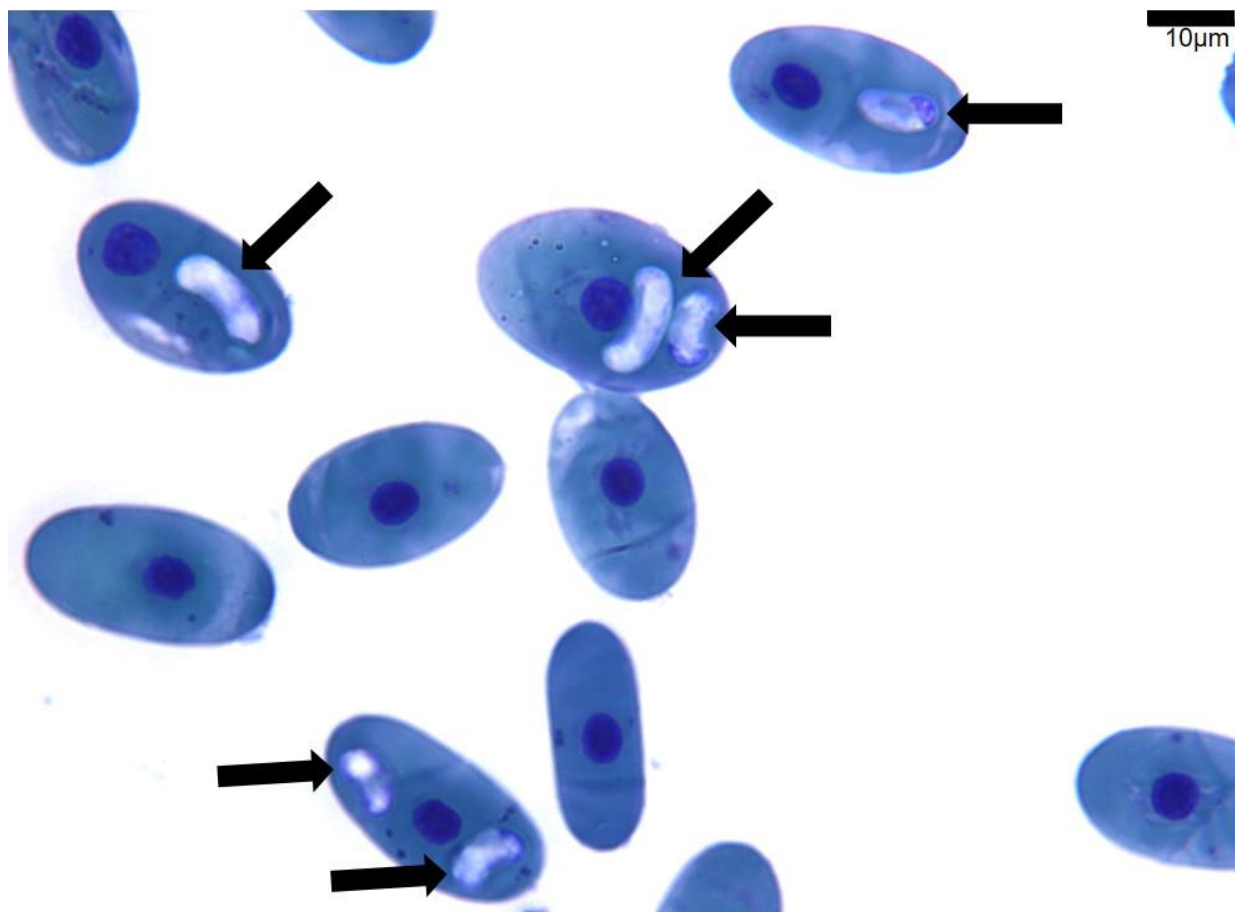


Figura 7. Fotomicrografia de extensão sanguínea de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia), corada pelo método de Rosenfeld, observada em objetiva de imersão. Presença de gametócitos de hemogregarinas intracelulares em hemácias (setas).

A parasitemia média entre as *P. expansa* foi de 1,62% (variando de ≤ 1 a 3%) por hemácia contada. Observou-se que os gametócitos intracelulares encontrados apresentavam comprimento médio de 7,82 μm com desvio padrão de $\pm 0,57$ (7,33 μm mínimo e 9,81 μm máximo de comprimento), largura de 4,43 μm $\pm 0,53$ (2,73-5,21) e área de 31,07 μm^2 $\pm 12,4$ (22,31-39,84).

Raramente uma hemácia albergava dois ou três gametócitos. Foi observado nenhum aumento ou distorção das células hospedeiras, causados pelos parasitas ($p > 0,05$). O núcleo das hemácias parasitadas poderia ou não estar deslocado lateral ou terminalmente. As características morfométricas das células parasitadas foram detalhadas na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre os dados morfométricos das hemácias normais e parasitadas ($p > 0,05$).

Tabela 5. Análise morfométrica (Médias, desvio padrão e intervalo de valores das dimensões) das células parasitadas e não parasitadas por gametócitos de hemogregarinas, observados nos sete indivíduos de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia) de vida livre naturalmente infectados.

Parâmetros morfométricos (μm)	Hemácias		
	Parasitadas	Não parasitadas	
Célula	Comprimento	23,98 \pm 1,56(21,62-24,14)	22,26 \pm 1,12(20,17-23,84)
	Largura	15,65 \pm 1,82(14,84-16,67)	15,33 \pm 0,99(13,65-17,31)
	Área	275,91 \pm 16,11(264,51-287,3)	272,89 \pm 21,09(227,48-317,73)
Núcleo	Comprimento	5,56 \pm 0,61(5,1-5,6)	5,48 \pm 0,45(4,16-6,31)
	Largura	4,92 \pm 0,73(4,4-5,44)	4,9 \pm 0,37(4,14-5,49)
	Área	20,65 \pm 2,35(18,99-22,31)	23,35 \pm 2,13(18,99-26,82)

5.2. Controle de qualidade da extração de DNA

5.2.1. Controle endógeno da reação e quantificação do material genômico extraído de amostras de *Phrynosoma geoffroanus*

Na aferição da qualidade do material genômico extraído das amostras de *P. geoffroanus*, verificou-se a amplificação de fragmentos de aproximadamente 1,2 kb

em 100% (n 83) das amostras de sangue. Dos órgãos colhidos dos 31 animais que vieram a óbito, observou-se amplificação de fragmentos de aproximadamente 1,2 kb em 45,16% (14/31) de fígado, 32,26% (10/31) de baço, 41,93% (13/31) de pulmão e 29,03% (9/31) de coração. Os valores referentes a avaliação da qualidade da extração de DNA e estimativa da presença de contaminantes constam na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de concentração (ng/ μ L) e absorvância obtidos na mensuração por espectrofotometria de material genômico extraído de amostras de *Phrynosops geoffroanus* (cágado-de-barbicha) que mostraram-se positivas no controle endógeno da cPCR (intron nuclear R35).

Amostras que amplificaram 1,2 kb do intron nuclear		Quantificação do DNA extraído [Média \pm Desvio padrão (Mediana)]		
		Concentração (ng/ μ L)	Relação 260/280	Relação 260/230
Sangue	n 83	32,4 \pm 38,7(18,7)	2,2 \pm 1,53(1,87)	1,77 \pm 0,82(1,85)
Fígado	n 14	35,2 \pm 79,9(8,5)	1,66 \pm 0,24(1,74)	0,89 \pm 0,48(0,78)
Baço	n 10	121,4 \pm 236,79(5,7)	3,51 \pm 4,42(1,87)	1,36 \pm 0,68(1,34)
Pulmão	n 13	8,5 \pm 6,9(6,6)	2,21 \pm 0,93(2,04)	0,92 \pm 0,57(0,82)
Coração	n 9	29,6 \pm 27,9(21,2)	1,75 \pm 0,19(1,84)	1,44 \pm 0,79(1,84)

5.2.2. Controle endógeno da reação e quantificação do material genômico extraído de amostras sangue de *Podocnemis expansa*

Do DNA extraído das amostras de sangue de *P. expansa* observou-se 100% (n 7) de amplificação correspondente ao controle endógeno da PCR (1,2 kb). Os valores da mensuração por espectrofotometria de material genômico extraído [média \pm desvio padrão(mediana)] corresponderam à: concentração [28,1 \pm 8,39(26,0)] e relação 260/280 [1,93 \pm 0,09(1,93)] e relação 260/230 [1,81 \pm 0,29(1,91)].

5.3. Pesquisa de material genômico e caracterização de hemoparasitas

5.3.1. Reações de amplificação para hemosporídeos

5.3.1.1. *Amplificação baseada no gene Citocromo b – amostras biológicas de Phrynosops geoffroanus*

As amostras de DNA de *P. geoffroanus* submetidas aos protocolos “Reação A” (HaemNFI/HaemNR3) + “*Nested* da Reação A” (HAEMF/HAEMR2) e “Reação C” (DW2/DW4) + “*Nested* da Reação C” (DW1/DW3) não apresentaram amplificação para hemosporídeos.

Já das amostras de *P. geoffroanus* submetidas “Reação B” (DW2/DW4) + “*Nested* da Reação B” (DW1/DW6) observou-se amplificação de fragmentos de aproximadamente 1,2 kb em 6,98% (9/129). Destas nove, sete eram oriundas de amostras de sangue e duas de tecido cardíaco, todas de indivíduos distintos. Todavia, não foi possível obter nenhuma sequência útil.

5.3.1.2. *Amplificação baseada no gene Citocromo b – amostras biológicas de Podocnemis expansa*

As amostras de *P. expansa* submetidas ao protocolo “Reação A” (HaemNFI/HaemNR3) + “*Nested* da Reação A” (HAEMF/HAEMR2) não apresentaram amplificação para hemosporídeos.

Já aquelas submetidas a “Reação B” (DW2/DW4) + “*Nested* da Reação B” (DW1/DW6) mostraram amplificação de fragmentos de aproximadamente 1,2 kb em 85,71% (6/7). Porém, não foi possível obter nenhuma sequência útil.

Em apenas uma das amostras submetidas ao “Reação C” (DW2/DW4) + “*Nested* da Reação C” (DW1/DW3) foi obtida amplificação de aproximadamente 670 pb, que correspondeu ao único animal negativo na “Reação B”. Entretanto, não foi possível obter sequência útil.

5.3.2. Reações de amplificação para hemogregarinas

5.3.2.1. *Amplificação baseada no gene 18S rRNA – amostras biológicas de Phrynosops geoffroanus*

Na cPCR que empregou o par de oligonucleotídeos iniciadores HepR300/HepR900, 47,29% (61/129) das amostras amplificaram fragmentos de aproximadamente 581 pb (Tabela 7). Quanto utilizados os oligonucleotídeos iniciadores HEMO1/HEMO2, nenhuma amplificação foi obtida.

Tabela 7. Relação de material genômico extraído de amostras de sangue e tecidos de *Phrynops geoffroanus* (cágado-de-barbicha) que amplificaram fragmento de aproximadamente 581 pb, em protocolo baseado no gene 18S rRNA que utilizou os oligonucleotídeos iniciadores HepR300/HepR900.

Oligonucleotídeos iniciadores	Identificação amostras					Total amplificação
	Sangue	Fígado	Baço	Pulmão	Coração	
HepR300/HepR900 (581 pb)	54,22% (45/83)	35,71% (5/14)	20,0% (2/10)	53,85% (7/13)	22,22% (2/9)	47,29% (61/129)

Verificou-se positividade na cPCR (HepR300/HepR900) para amostras biológicas de um mesmo animal, sendo duas amostras do mesmo indivíduo em oito *P. geoffroanus* (sangue e fígado *n* 3; sangue e pulmão *n* 4; sangue e coração *n* 1) ou três amostras de um mesmo testudine, fato observado em dois *P. geoffroanus* (sangue, baço e fígado). Todavia, não possível obter nenhuma sequência útil.

5.3.2.2. Amplificação baseada no gene 18S rRNA – amostras biológicas de *Podocnemis expansa*

Foi verificada a amplificação de fragmentos baseados no gene 18S rRNA em DNA extraído de todas as sete (100%) amostras de sangue de *P. expansa* submetido aos protocolos de cPCR, que utilizaram os oligonucleotídeos iniciadores HepR300/HepR900 (581 pb) e HEMO1/HEMO2 (900 pb). As informações detalhadas da positividade na cPCR e valores de quantificação dos amplicmeros purificados foram dispostas na Tabela 8.

Tabela 8. Dados de material genômico extraído de amostras de sangue de tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) que amplificaram fragmentos baseados no gene 18S rRNA, amplicómeros purificados correspondentes (% e n) e mensuração em espectrofotômetro [Média±Desvio padrão (Mediana)].

Oligonucleotídeos Iniciadores	Amplificados e purificados	Quantificação dos amplicómeros purificados		
		Concentração (ng/μL)	Relação 260/280	Relação 260/230
HepR300/HepR900	100% (7/7)	197,3±42,62(195,0)	1,87±0,01(1,87)	0,45±0,15(0,45)
HEMO1/HEMO2	85,71% (6/7)	118,5±1,79(0,46)	1,79±0,16(1,84)	0,46±0,23(0,37)

As sequências consenso obtidas dos oligonucleotídeos iniciadores HepR300/HepR900 e HEMO1/HEMO2 foram combinadas, obtendo-se assim cinco sequências de aproximadamente 1.100 pb. Sequências provenientes de dois *P. expansa* possuíam a uma das duas sequências consenso, impossibilitando a combinação de HepR300/HepR900 e HEMO1/HEMO2, e foram retiradas das análises filogenéticas.

As sequências combinadas (HepR300/HepR900 e HEMO1/HEMO2) foram confrontadas com sequências previamente depositadas no GenBank (BLASTn). Observou-se que as sequências do presente estudo apresentaram 98% de identidade: *Haemogregarina pellegrini* [KM887508 e KM887509], de *Malayemys subtrijuga* (Snail-eating Turtle) e *Platysternon megacephalum* (tartaruga-de-cabeça-grande), respectivamente; e *Haemogregarina sacaliae* [KM887507] de *Sacalia quadriocellata* (Four-eyed Turtle).

Na inferência filogenética de máxima verossimilhança (MV) foram encontrados cinco genótipos proximamente relacionados (em negrito na Figura 8), os quais formaram um grupo monofilético. Foi observado um grupo irmão à linhagem encontrada com suporte de clado de 85%, constituído por *Haemogregarina* spp. de testudines de água doce, incluindo *H. stepanowi*, *H. balli*, *H. sacaliae*, *H. pellegrini*. Separadamente relacionados outros clados formados por *Hepatozoon* spp. caracterizados em mamíferos e lagartos e por *Hemolivia* spp. encontrados em lagartos, testudines terrestres e aquáticos (de água doce).

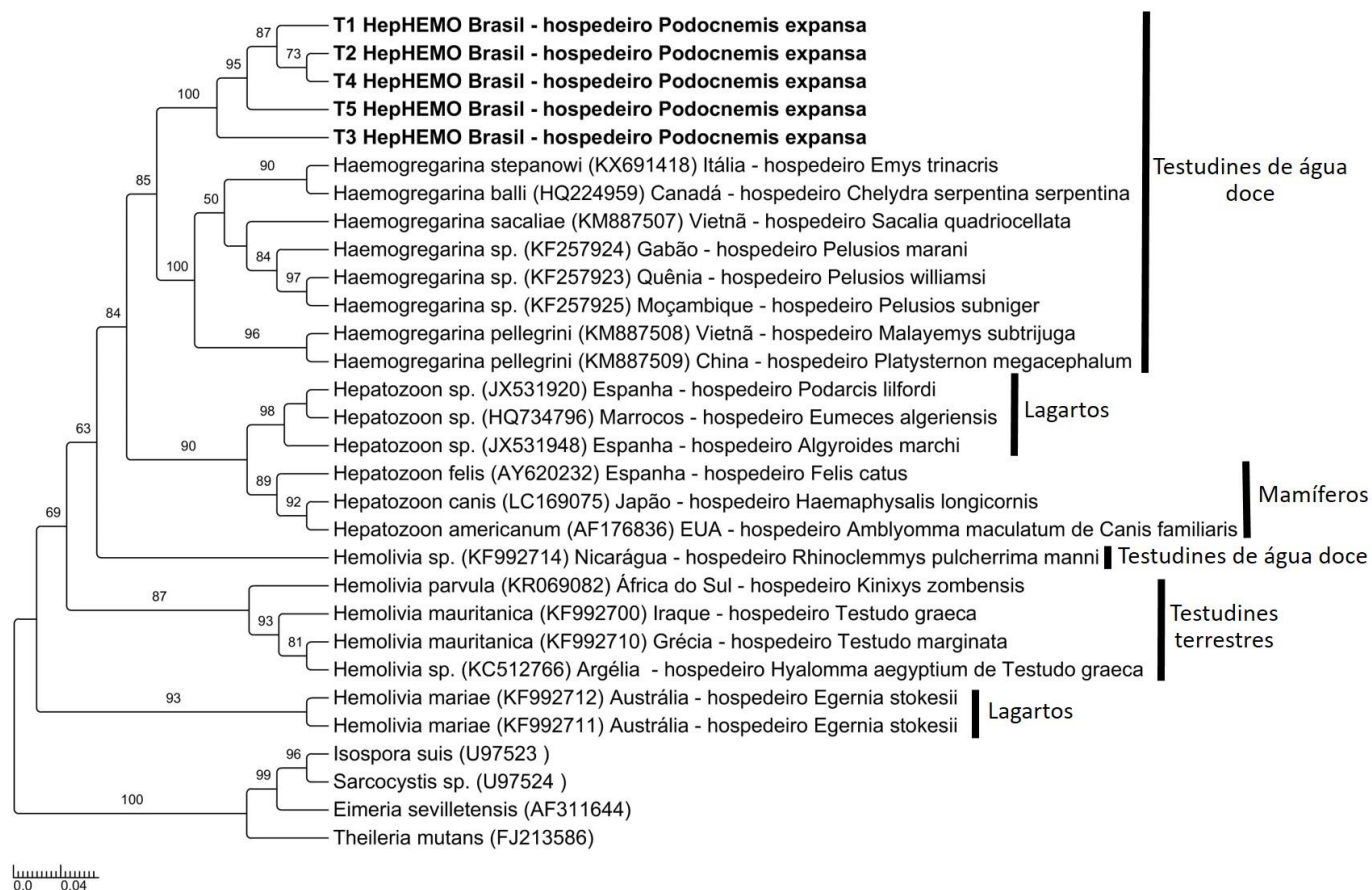


Figura 8. Estimativa das relações filogenéticas inferidas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (MV) e o modelo evolutivo TVM+G+I, baseada em fragmentos de 1.100 pb do gene 18S *rRNA*. Valores de suporte de clado para MV ($\geq 50\%$) acessados com 1.000 replicatas estão acima dos nodos relevantes. As sequências indicadas em negrito representam aquelas amplificadas no presente estudo e as identificações originais das amostras foram designadas (T1 a T5). *Isospora suis*, *Sarcocystis* sp., *Eimeria sevilletensis* e *Theileria mutans* foram utilizados como grupo externo.

Na análise probabilística bayesiana, as sequências de *P. expansa* (em negrito na Figura 9) agruparam-se em um grupo monofilético, porém, quatro sequências apresentaram uma politomia. Foi observada uma topologia semelhante à encontrada na inferência de MV, com um grupo irmão à linhagem encontrada, constituído por *Haemogregarina* spp. de testudines de água doce, apresentando probabilidade posterior de 74%.

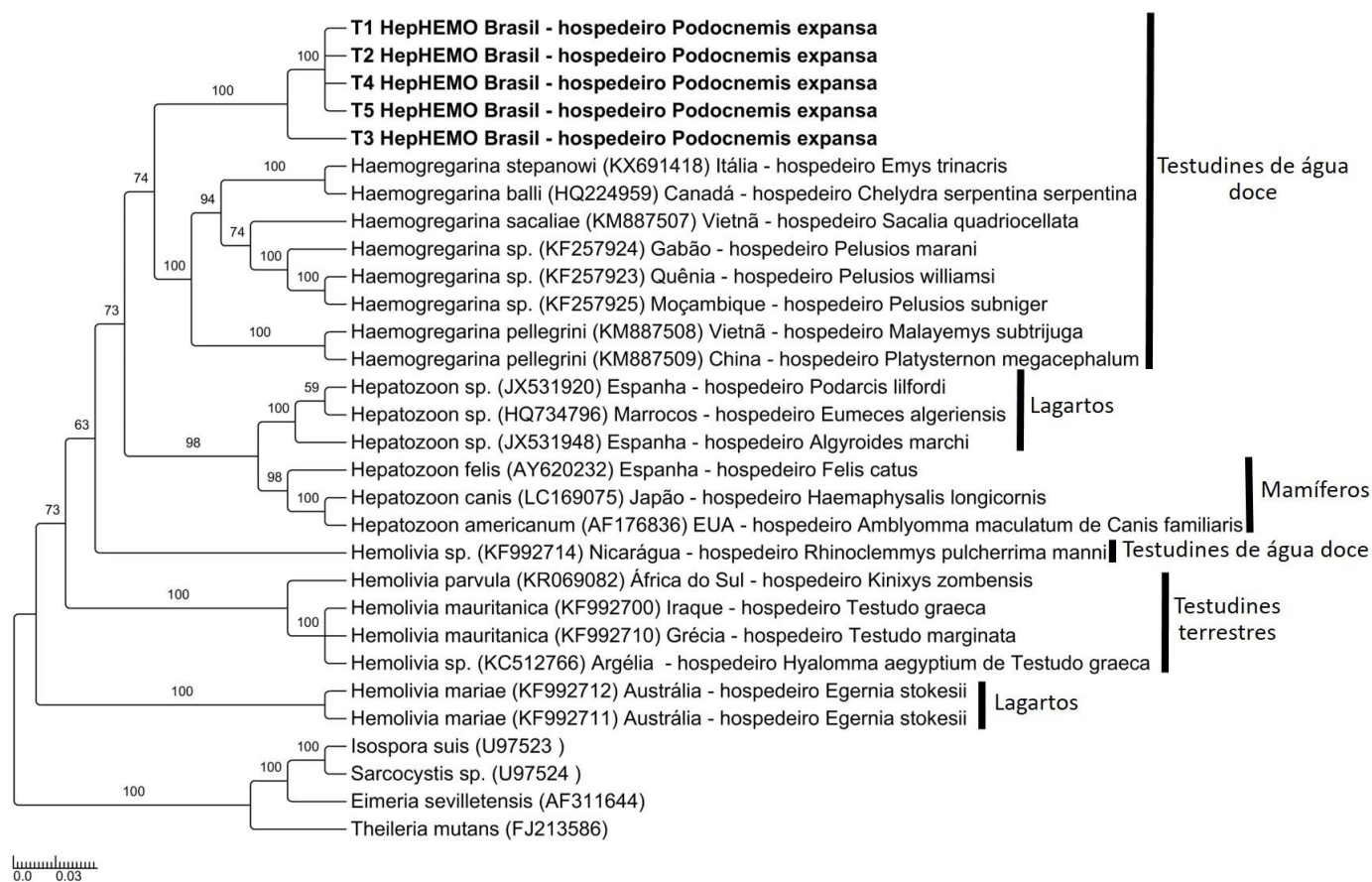


Figura 9. Estimativa das relações filogenéticas inferidas utilizando a análise Bayesiana e o modelo evolutivo TVM+G+I, baseada em fragmentos de 1.100 pb do gene 18S *rRNA*. Valores de probabilidade posterior estão acima dos nodos relevantes acessados com 10^6 replicatas. As sequências indicadas em negrito representam aquelas provenientes deste estudo e as identificações originais das amostras foram designadas (T1 a T5). *Isospora suis*, *Sarcocystis* sp., *Eimeria sevilletensis* e *Theileria mutans* foram utilizados como grupo externo.

6. DISCUSSÃO

6.1. Ectoparasitas: hospedeiros definitivos

6.1.1. Investigação de ectoparasitas (vetores) em *Phrynops geoffroanus*

Em *P. geoffroanus* de vida livre de área antropizada do presente estudo, não foi observada a presença de sanguessugas, nem outros possíveis vetores, durante o exame físico, assim como não foi possível a detecção de hemoparasitas nestes testudines. A contaminação do Córrego Cerradinho com produto do grupo químico dos carbamatos, que causou a grande mortalidade de animais, deve ter ocorrido devido a lavagem de equipamentos de pulverização de agrotóxicos, diretamente em curso d'água. O Córrego Cerradinho recebe impacto da ação antrópica, tanto por influência rural de prática agrícola e criação de animais, quanto da influência urbana de esgoto doméstico, entulhos, escoamento superficial, produtos químicos e animais domésticos (BORGES, GALBIATTI, FERRAUDO, 2003). Adicionalmente, em seus 11 Km de percurso observa-se escassas e isoladas faixas de mata ciliar. Sugere-se que a degradação ambiental pode ter ocasionado impacto sobre a biodiversidade de vertebrados, vetores e parasitas, influenciando a fauna parasitária destes testudines. A pesquisa de agentes etiológicos em testudines de água doce de ambiente antrópico é considerada uma relevante ação para melhor conhecimento dos animais e de seu *habitat* (BRITES, 2002).

Como sentinela ambiental, *Phrynops geoffroanus* pode sofrer importante influência da contaminação de efluentes industriais e domésticos, com impacto na saúde e na condição fisiológica (VENANCIO et al., 2013). Por sua vez, as sanguessugas podem servir de indicador de qualidade ambiental, pois podem exercer potencial significativo como biomonitores de contaminantes orgânicos no ambiente aquático (METCALFE; FOX; CAREY, 1988).

6.1.2. Investigação de ectoparasitas (vetores) em *Podocnemis expansa*

A detecção de hemoparasitas em *P. expansa* de vida livre do presente estudo, foi possível, tanto pelo método de extensão sanguínea, quanto da caracterização molecular de *Hemogregarina* sp.. Apesar de ter sido possível verificar a presença de hemoparasitas, a presença de ectoparasitas no momento da colheita não foi verificada. Em dados de campo, já foram observadas pequenas sanguessugas em *P. expansa* capturadas, entre dezembro a abril, que corresponde ao período de elevação do leito d'água do Rio Araguaia (LUSTOSA, 2017)*. A ausência de sanguessugas em *P. expansa* e presença de hemoparasitas já foi observada por Picelli e colaboradores (2015), que sugeriram que a presença de ectoparasitas esteja relacionada à influência climática, sazonalidade do ano e nível do leito do rio, etc. A captura de *P. expansa* coincidiu, com o fim da época de seca e início da estação de chuvas (PICELLI et al., 2015).

A presença de hemogregarinas em testudines aquáticos está intimamente relacionada aos vetores hospedeiros definitivos – as sanguessugas (DVOŘÁKOVÁ et al., 2014). Estudos que buscam a compreensão das etapas do ciclo de desenvolvimento e manutenção de hemoparasitas em testudines hospedeiros ainda são raros. Todavia já foi detectada presença de hemogregarinas, como *Hemolivia mauritanica*, em testudines terrestres mesmo após longos períodos sem ectoparasitas. Como no estudo em que foi detectado *H. mauritanica* em *T. marginata* originárias de vida livre na Grécia, porém há oito anos cativas e sem contato com vetores (carrapato *Hyalomma aegyptium*), foi proposto que a liberação consecutiva de merozoítos latentes nos órgãos e sua transformação em gametócitos, poderia explicar o longo período de parasitemia, devido à contínua e duradoura merogonia cíclica da hemogregarina nos órgãos parenquimatosos de *T. marginata*. Tal fenômeno colaboraria para que o hemoparasita supere o caráter sazonal na atividade do testudine e do vetor (ŠIROKÝ; KAMLER; MODRÝ, 2004).

* LUSTOSA, A. P. G. (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, Goiânia, GO). Comunicação pessoal, 2017.

6.2. Investigação de hemosporídeos em testudines: por métodos morfológicos e moleculares

Neste estudo, não foi detectada a presença de hemosporídeos pelo método morfológico a partir das amostras biológicas (sangue e tecidos) de nenhuma das espécies de testudines estudadas; tampouco foi possível confirmar por inferências filogenéticas. Pineda-Catalan et al. (2013) relataram que infecções mistas de *Haemoproteus* (*Simondia*) spp. prejudicaram a obtenção de sequências provenientes de quatro testudines aquáticos, o que resultou na exclusão de tais sequências das análises filogenéticas.

6.3. Investigação de hemogregarinas em testudines: por métodos morfológicos e moleculares

Dos indivíduos de *P. geoffroanus* de vida livre amostrados não foram observadas estruturas sugestivas de hemogregarinas por método morfológico, nem foi possível fazer a confirmação filogenética do DNA de hemogregarinas.

Quanto às amostras de *P. expansa* de vida livre, foi possível averiguar-se por métodos morfológicos e moleculares presença de hemogregarinas. Foi verificada uma maior ocorrência de amplificação para o par de oligonucleotídeos HepR300/HepR900 frente ao par HEMO1/HEMO2. Em outras pesquisas também observadas tal situação de ocorrência (HARRIS; MAIA; PERERA, 2011; MAIA; HARRIS; PERERA, 2011; HARRIS et al., 2013; O'DWYER et al., 2013; HARRIS; BORGES-NOJOSA; MAIA, 2015). Nos casos em que não foi possível obter a combinação das sequências de ambos os pares (HepR300/HepR900 + HEMO1/HEMO2) conduzida foi a exclusão da amostra das análises filogenéticas. Pois a extensão das sequências consenso isoladamente é considerada curta pode comprometer as inferências (HARRIS; MAIA; PERERA, 2011).

Amplicons de 18S rRNA de hemogregarinas provenientes de *P. expansa* de vida livre geraram sequências que possibilitaram a caracterização filogenética. Observaram-se hemoparasitas Apicomplexa do gênero *Hemogregarina*. As sequências de *Haemogregarina pellegrini* e *Haemogregarina sacaliae* que

apresentaram identidade (98%) às obtidas no presente estudo, empregando a ferramenta Blastn, provenientes de testudines de água doce do Vietnã [KM887507 e KM887508] e China [KM887509] (DVOŘÁKOVÁ et al., 2015). Tanto na inferência de máxima verossimilhança (MV) quanto na análise Bayesiana, as sequências de *P. expansa* se posicionaram proximamente (*cluster*) à *Haemogregarina* spp. de testudines de água doce de vida livre e cativeiro, provenientes da Canadá, Itália, Vietnã, China, Gabão, Quênia e Moçambique (BARTA et al., 2012; DVOŘÁKOVÁ et al., 2014; 2015; ARIZZA et al., 2016).

Foi possível observar que em ambas as análises de probabilidade filogenéticas, as sequências obtidas no presente estudo se posicionaram em clado distinto da única sequência de *Hemolivia* sp. obtida de testudine de água doce oriundo da América Central, *Rhinoclemmys pulcherrima manni* (*Painted wood Turtle*) [KF992714], por Kvičerová e colaboradores (2014). Tais autores relatam que apesar deste animal ser proveniente da Nicarágua, no período em que foram obtidas as amostras, o testudine estava em cativeiro, como animal de estimação, na República Checa. O que enfatiza a necessidade de mais pesquisas em testudines de vida livre, pois são poucos os estudos de hemoparasitismo em populações de répteis de vida livre (READEL; PHILLIPS; WETZEL, 2008). Tal situação instiga a investigação molecular de mais sequências de hemogregarinas, provenientes de testudines aquáticos de vida livre, de países Sul-Americanos geograficamente próximos, a fim de colaborar na afirmação mais robusta do surgimento de uma nova espécie do gênero *Hemogregarina*.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que foram realizadas esta pesquisa, propõe-se que:

- *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia) de vida livre estavam parasitadas por um novo genótipo do gênero *Hemogregarina*;
- Hemosporídeos e hemogregarinas não são frequentes em *Phrynosoma geoffroanus* (cágado-de-barbicha) na região deste Córrego sob as condições locais daquele período;
- A qualidade e preservação ambiental pode influenciar diretamente na diversidade animal, parasitária e de vetores.

8. REFERÊNCIAS

ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 939, 966.

ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. C. Laboratory in wild animals. In: FOWLER, M. E. **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa State University Press, 2000. p. 300-320.

ALVES JÚNIOR, J. R. F. **Leptospira spp. e Brucella spp. em tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) do vale do rio Araguaia - GO**. 2013. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; VARGAS, G. H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 134-138, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.014>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ARIZZA, V.; SACCO, F.; RUSSO, D.; SCARDINO, R.; ARCULEO, M.; VAMBERGER, M.; MARRONE, F. The good, the bad and the ugly: *Emys trinacris*, *Placobdella costata* and *Haemogregarina stepanowi* in Sicily (Testudines, Annelida and Apicomplexa). **Folia Parasitologica**, Praga, v. 63, p. 029, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14411/fp.2016.029>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

AVILA JUNIOR, R. H.; SANTOS, A. L. Q.; PACHALY, J. R. Contenções farmacológicas e Anestesia. In: VILANI R.G. D’O.C. (Ed.). **Grupo Fowler avanços na medicina de animais selvagens: medicina de répteis**. Curitiba: Grupo Fowler- Associação Paranaense de Medicina de Animais Selvagens, 2007. p. 174, 177.

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. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 59, n. 2, p. 171-180, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; ÖSTMAN, Ö.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences**, Londres, v. 267, p. 1583–1589, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1181>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. (org.). **Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2012. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/lista_repteis/ListaRepteis30Setembro2012-PORTUGUES.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2017.

BORGES, M. J.; GALBIATTI, J. A.; FERRAUDO, A. S. Monitoramento de qualidade hídrica e eficiência de interceptores de esgoto em cursos d'água urbanos da bacia hidrográfica do Córrego Jaboticabal. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 161-171, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21168/rbrh.v8n2.p161-171>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

BOYER, T. H.; BOYER, D. M.: Turtles, tortoises, and terrapins In: MADER, D. R. (Ed): **Reptile medicine and surgery**. Filadélfia: Saunders Elsevier, 2006. p. 78-99.

BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae) expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais**. 2002. 196 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

BRITES, V. L. C.; RANTIN, F. T. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha River. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 96, n. 1-3, p. 273-281, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/B:EMAS.0000031733.98410.3c>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de répteis. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006a. p. 248-263.

CAMPBELL, T. W. Hemoparasites. In: MADER D.R. (Ed.). **Reptile medicine and surgery**. 2nd ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006b. p. 801-805.

COOK, C. A.; SMIT, N. J.; DAVIES, A. J. Hemoproteids (Apicomplexa: Haemoproteidae) from South African Tortoises (Cryptodira: Testudinidae). **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1168-1172, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-2527.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

CREASEY, A. M.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C.; MOORE, D. J.; WILLIAMSON, D. H.; WILSON, R. J. M.; WALLIKER, D.; CARTER, R. Uniparental inheritance of the *mitochondrial* gene cytochrome b in *Plasmodium falciparum*. **Current Genetics**, Nova Iorque, v. 23, n. 4, p. 360–364, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00310900>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

CUBAS, P. H.; BAPTISTOTTE, C. Chelonia (tartaruga, cágado, jabuti). In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 86, 88.

DAVIS, A. K.; STERRETT, S. C. Prevalence of haemogregarine parasites in three freshwater turtle species in a population in Northeast Georgia, USA. **International Journal of Zoological Research**, v. 7, n. 2, p. 156-163, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3923/ijzr.2011.156.163>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

DUTRA, G. H. P. Testudines (tigre d'água, cágado, jabuti). In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 219-258.

DVOŘÁKOVÁ, N.; KVIČEROVÁ, J.; PAPOUŠEK, I.; JAVANBAKHT, H.; TIAR, G.; KAMI, H.; ŠIROKÝ, P. Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885. **Parasitology**, Londres, v. 141, n. 4, p. 522–530, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013001820>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

DVOŘÁKOVÁ, N.; KVIČEROVÁ, J.; HOSTOVSKÝ, M.; ŠIROKÝ, P. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. **Parasitology**, Londres, v. 142, n. 6, p. 816-26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182014001930>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ESCALANTE, A. A.; FREELAND, D. E.; COLLINS, W. E.; LAL, A. A. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 14, p. 8124-8129, 1998. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/95/14/8124.full>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

EWING, B., HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, Nova Iorque, n. 8, n. 3, p. 175-185, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.8.3.175>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

FALK, B. G. **Diversification of malaria and pinworm parasites in Caribbean *Anolis* lizards**. 2013. 151 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Faculty of The Richard Gilder Graduate School at the American Museum of Natural History, Nova Iorque, 2013.

FALK, B. G.; MAHLER, L. D.; PERKINS, S. L. Tree-based delimitation of morphologically ambiguous taxa: A study of the lizard malaria parasites on the Caribbean island of Hispaniola. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 967-980, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.05.004>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution: international journal of organic evolution**, Lancaster, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/2408678>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

FERRONATO, B. O.; GENOY-PUERTO, A.; PIÑA, C. I.; SOUZA, F. L.; VERDADE, L. M.; MATUSHIMA, E. R. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. **Zoologia**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 795-798, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702009000400027>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

FUJITA, M. K.; ENGSTROM, T. N.; STARKEY, D. E.; SHAFFER, H. B. Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 31, p. 1031-1040, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2003.09.016>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

GENOY-PUERTO, E. A. **Citometria de fluxo de leucócitos sanguíneos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) provenientes de ambientes poluídos: metodologia de isolamento e estimulação.** 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ, B.; HIŽŇANOVÁ, A.; MAJLÁTH, I.; RAČKA, K.; HARRIS, D. J.; FÖLDVÁRI, G.; TRYJANOWSKI, P.; KOKOŠOVÁ, N.; MALČEKOVÁ, B.; MAJLÁTHOVÁ, V. Morphological and molecular characterization of Karyolysus – a neglected but common parasite infecting some European lizards. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, p. 555, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-014-0555-x>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Londres, v. 41, p. 95-98, 1999. Disponível em: <<http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HARRIS, D. J.; BORGES-NOJOSA, D. M.; MAIA, J. P. M. C. Prevalence and diversity of *Hepatozoon* in Native and Exotic Geckos from Brazil. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 101, n. 1, p.80-85. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/14-522.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HARRIS, D. J.; GRACIÁ, E.; JORGE, F.; MAIA, J. P. M. C.; PERERA, A.; CARRETERO, M. A.; GIMÉNEZ A. Molecular Detection of *Hemolivia* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from Ticks of North African *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae) and an Estimation of Their Phylogenetic Relationships Using 18S rRNA Sequences. **Comparative Parasitology**, Lawrence, v. 80, n. 2, p. 292-296, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1654/4594.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HARRIS, D. J.; MAIA, J. P. M. C.; PERERA, A. Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 97, n. 1, p.106-110. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-2470.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 4, p. 797-802, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-184R1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HERBERT, J. D. K.; GODFREY, S. S.; BULL, C. M.; MENZ, R. I. Developmental stages and molecular phylogeny of *Hepatozoon tuatarae*, a parasite infecting the New Zealand tuatara, *Sphenodon punctatus* and the tick, *Amblyomma sphenodonti*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 40, n. 11, p. 1311-1315, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.03.018>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J. B. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, Nova Iorque, v. 294, n. 5550, 2310-2314, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1065889>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE cidades@**. 2017. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/QKNL>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

JACOBSON, E. R. Parasites and parasitic diseases of reptiles. In: JACOBSON, E. R. (Ed.) **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: color atlas and text**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007, p. 579-580.

JAKES, K. A.; O'DONOGHUE, P.; MUNRO, M.; ADLARD, R. Hemoprotozoa of freshwater turtles in Queensland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 1, p. 12-19, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-37.1.12>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

JAVANBAKHT, H.; KVIČEROVÁ, J.; DVOŘÁKOVÁ, N.; MIKULÍČEK, P.; SHARIFI, M.; KAUTMAN, M.; MARŠÍKOVÁ, A.; ŠIROKÝ, P. Phylogeny, Diversity, Distribution, and Host Specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palaearctic Tortoises. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, n. 0, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/jeu.12227>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

JECKEL NETO, E. A. Técnicas de rotina em histologia. In: CARLI, A. A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007, sec. 8, cap. 32, p. 591-608.

JOHNSON, A. J.; ORIGGI, F. C.; WELLEHAN JR., J. F. X. Molecular diagnostics. In: JACOBSON, E. R. (Ed.) **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: color atlas and text**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007, p. 351-380.

KARADJIAN, G.; CHAVATTE, J. M.; LANDAU, I. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. **Parasite**, Paris, v. 22, p. 31, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2015031>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, Oxford, v. 32, n. 13, p. 1933-1942, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btw108>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

KNOTKOVA, Z.; MAZANEK, S.; HOVORKA, M.; SLOBODA, M.; KNOTEK, Z. Haematology and plasma chemistry of Bornean River turtles suffering from shell necrosis and haemogregarine parasites. **Veterinární Medicína**, Praga, v. 50, n. 9, p. 421–426, 2005. Disponível em: <<http://vri.cz/docs/vetmed/50-9-421.pdf>>. Acesso: 24 abr.2017.

KVIČEROVÁ, J.; HYPŠA, V.; DVOŘÁKOVÁ, N.; MIKULÍČEK, P.; JANDZIK, D.; GEORGE GARDNER, M.; JAVANBAKHT, H.; TIAR, G.; ŠIROKÝ, P. *Hemolivia* and *Hepatozoon*: haemogregarines with tangled evolutionary relationships. **Protist**, Iena, v. 165, n. 5, p. 688–700, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2014.06.001>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

LEGLER, J. M.; GEORGES, A. Family Chelidae. In: GLASBY, C. J.; ROSS, G. J. B.; BEESLEY, P. L. (Ed.). **Fauna of Australia**. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1993. p. 142-152.

LUZZI, M. C.; WERTHER, K.; ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; SOUSA, E.; OLIVEIRA, J. P.; SOUSA, K. C. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Co-infecção por hemospóridios e agentes Anaplasmataceae em gansos-do-Orinoco (*Neochen jubata*) de vida livre. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 18., 2014, Gramado. **Anais ... Gramado: CBPV, 2014a**. Disponível em: <http://www.cbpv.org.br/congressos/parasitologia_2014_anais_online/trabalhos/trabalho_1352.html>. Acesso em: 24 abr. 2017.

LUZZI, M. C.; WERTHER, K.; ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; SOUSA, E.; OLIVEIRA, J. P.; SOUSA, K. C. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Co-infection by hemosporidia and Anaplasmataceae agents in wild Orenoco geese (*Noeche jubata*) in Brazil. In: ACVP and ASVCP 2014, 2014b, Atlanta. **Final Program ... Atlanta: ACVP and ASVCP, 2014**. p. 35-35.

MAIA, J. M. C.; HARRIS, D. J.; PERERA, A. Molecular survey of *Hepatozoon* species in lizards from North Africa. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 97, n. 3, p. 513-517, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-2666.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

MARTINSEN, E. S.; PERKINS J. J. SCHALL. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 47, n. 1, p. 261-273, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.012>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

MATUSHIMA, E. R. Técnicas Necroscópicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. (Ed.). **Tratado de animais Selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p.980-990.

METCALFE, J. L.; FOX, M. E.; CAREY, J.H. Freshwater leeches (Hirudinea) as a screening tool for detecting organic contaminants in the environment. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 11, n. 2, p. 147-169, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00401727>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010. **Proceedings ...** New Orleans: GCE, 2010, p. 1-8. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

MOLINA, F. B. Class Reptilia, Order Chelonia (Testudinata) (Chelonians): Turtles, Tortoises Biology, management, and free-living populations. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. (Ed.). **Biology, medicine, and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 15-20.

NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice**, Filadélfia, v. 16, n. 1, p. 1-30, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

NEVES, D. P. Relação Parasito-Hospedeiro. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. (Ed.) **Parasitologia Humana**. 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 2, p. 7-13.

NGUYEN, L. T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESLER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msu300>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

O'DWYER, L. H.; MOÇO, T. C.; PADUAN, K. S.; SPENASSATTO, C.; SILVA, R. J.; RIBOLLA, P. E. M. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 135, p. 200-207, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.019>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

OLIVEIRA, J. P.; KAWANAMI, A. E.; SILVA, A. S. L.; CHUNG, D. G.; WERTHER, K. Detection of *Leptospira* spp. in wild *Phrynops geoffroanus* (Geoffroy's side-necked turtle) in urban environment. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 164, p. 165-168, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.019>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ÖRKÜN, O.; GÜVEN, E. A new species of *Haemoproteus* from a tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey, with remarks on molecular phylogenetic and morphological analysis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 99, n. 1, p. 112–117, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-3100.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 88, n. 5, p. 972–978, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0972:AMPOMP\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0972:AMPOMP]2.0.CO;2)>. Acesso em: 24 abr. 2017.

PERKINS, S. L.; KELLER, A. K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 4, p. 870-876, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0870:PONSSR\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0870:PONSSR]2.0.CO;2)>. Acesso em: 24 abr. 2017.

PESSOA, L. M. B. **Ocorrência de hemoparasitas em Tartarugas-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) e cágados-de-barbicha (*Phrynops geoffroanus*) oriundas da Fundação Zoológico de Brasília, Distrito Federal, Brasil**. 2015. 47f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PESSOA, L. M. B.; SCALON, M. C.; CARNEIRO, F. T.; LIMA, M. G. M.; SILVA, T. F.; MONTEIRO, R. V.; PALUDO, G. R. Ocorrência de hemogregarinas em duas espécies de cágados brasileiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 0, p. 1381, 2016. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/actascivet/article/view/31451>>. Acesso: 24 abr.2017.

PICELLI, A. M.; CARVALHO, A. V.; VIANA, L. A.; MALVASIO, A. (2015). Prevalence and parasitemia of *Haemogregarina* sp. in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) from the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 191-197, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015033>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

PINEDA-CATALAN, O.; PERKINS, S. L.; PEIRCE, M. A.; ENGSTRAND, R.; GARCIA-DAVILA, C.; PINEDO-VASQUEZ, M.; AGUIRRE, A. A. Revision of hemoproteid genera and description and redescription of two species of chelonian hemoproteid parasites. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 99, n. 6, p. 1089–1098, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/13-296.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

RAKSHSHANDEHROO, E.; SHARIFIYAZDI, H.; AHMADI, A. Morphological and molecular characterisation of *Haemogregarina* sp. (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) from the blood of the Caspian freshwater turtle *Mauremys caspica* (Gmelin) (Geoemydidae) in Iran. **Systematic Parasitology**, Haia, v. 93, n. 5, p. 517-524, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11230-016-9643-y>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

READEL, A. M.; PHILLIPS, C. A.; WETZEL, M. J. Leech parasitism in a turtle assemblage: Effects of host and environmental characteristics. **Copeia**, Washington, v. 2008, n. 1, p. 227–233, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1643/CH-06-212>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ROSSI, J. V. General husbandry and management. In: MADER, D. R. (Ed.): **Reptile medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 25-41.

ROSSOW, J. A.; HERNANDEZ, S. M.; SUMNER, S. M.; ALTMAN, B. R.; CRIDER C. G.; GAMMAGE M. B.; SEGAL, K. M.; YABSLEY, M. J. Haemogregarine infections of three species of aquatic freshwater turtles from two sites in Costa Rica. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, Oxford, v. 2, p.131-135, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.02.003>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

RUEDA-ALMONACID, J. V.; CARR, J. L.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-MAHECHA, J. V.; MAST, R. B.; VOGT, R. C.; RHODIN, A. G. J.; OSSA-VELÁSQUEZ, J.; RUEDA, J. N.; MITTERMEIER, C. G. **Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico**. Conservación Internacional. Bogotá, Colombia: Editorial Panamericana, 2007. p. 194-198, 206-211. (Serie de guías tropicales de campo, 6).

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p 5463-5467, 1977. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ŠIROKÝ, P.; KAMLER, M.; FRYE, F. L.; FICTUM, P.; MONDRÝ, D. Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. **Folia Parasitologica**, Praga, v. 54, n. 1, p. 13-18, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14411/fp.2007.002>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ŠIROKÝ, P.; KAMLER, M.; MODRÝ, D. Long-term occurrence of *Hemolivia* CF. *mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the captive *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence for cyclic merogony? **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 6, p. 1391-1393, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-3306>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

SLOBODA, M.; KAMLER, M.; BULANTOVA, J.; VOTYPKA, J.; MODRY, D. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 93, n. 5, p. 1189-1198, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-1200R.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa: journal of neotropical herpetology**, Piracicaba, v.3, n. 1, p. 15-27, 2004. Disponível em: <<http://www.phyllomedusa.esalq.usp.br/articles/volume3/number1/311527.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of Zoology**, Londres, v. 252, p. 437-446, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb01226.x>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Londres, v. 36, n. 1, p. 57-62, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1076/snfe.36.1.57.8887>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 11, n. 7, p. 1-9, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

TELFORD JR., S. R. **Hemoparasites of the Reptilia**: color atlas and text. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2009. p. 01-260.

TELFORD JR., S. R.; NORTON, T. M.; MOLER, P. E.; JENSEN J. B. A new *Haemogregarina* species of the alligator snapping turtle, *Macrochelys temminckii* (Testudines: Chelydridae), in Georgia and Florida that produces macromeronts in circulating erythrocytes. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, n. 1, p. 208-214, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-1696.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

TELFORD JR., S. R.; WOZNIAK E. J.; BUTLER, J. F. Haemogregarine specificity in two communities of Florida snakes, with descriptions of six new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) and a possible species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 87, n. 4, p. 890-905, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0890:HSITCO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0890:HSITCO]2.0.CO;2)>. Acesso em: 24 abr. 2017.

TERRELL, S. P.; STACY, B. A. Reptile Necropsy Techniques. In: JACOBSON, E. R. (Ed.) **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles**: color atlas and text. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2007, p. 219-256.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN L. T.; VON HAESLER, A.; MINH B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw256>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

UJVARI, B., MADSEN, T., OLSSON, M. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 3, p. 670-672, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-204R>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

VAN DIJK, P. P.; IVERSON, J. B.; RHODIN, A. G. J.; SHAFFER, H. B.; BOUR, R. Turtles of the world, 7th edition: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps, and conservation status. In: RHODIN, A. G. J.; PRITCHARD, P. C. H.; VAN DIJK, P. P.; SAUMURE, R. A.; BUHLMANN, K. A.; IVERSON, J. B.; MITTERMEIER, R. A. (Eds.). Conservation Biology of Freshwater Turtle and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. **Chelonian Research Monographs**, Lunenburg, v. 5, n. 7, p. 329-479, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3854/crm.5.000.checklist.v7.2014>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

VARDO, A. M.; WARGO, A. R.; SCHALL, J. J. PCR Detection of Lizard Malaria Parasites: Prevalence of *Plasmodium* Infections with Low-Level Parasitemia Differs by Site and Season. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 6, p. 1509-1511, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-589R.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

VENANCIO, L. P. R.; SILVA, M. I. A.; DA SILVA, T. L. ; MOSCHETTA, V. A. G.; DE CAMPOS ZUCCARI, D. A. P.; ALMEIDA, E. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 1-9, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.035>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

VILCINS, I.-M. E.; UJVARI, B.; OLD, J. M.; DEANE, E. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the northern territory, Australia. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 95, n. 2, p.434-442, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-1725.1>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S.; HASSELQUIST, D.; ÖSTMAN, Ö. A New Nested Polymerase Chain Reaction Method Very Efficient in Detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* Infections from Avian Blood. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 90, n. 1, p. 191-194, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1645/GE-3221RN>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

WERTHER, K. Semiologia de Animais Selvagens. In: FEITOSA, F. L. F. (Ed.). **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2014. p.577-617.

WERTHER, K.; ANDRE, M. R.; LUZZI, M. C.; ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; SOUSA, E.; OLIVEIRA, J. P.; SOUSA, K. C. M.; MACHADO, R. Z. Molecular occurrence of haemosporidians in wild Orinoco geese (*Neochen jubata*) in Brazil. In: Parasitological Society of Southern Africa (PARSA), International Congress on Parasites of Wildlife and 43rd Annual PARSA Conference, 43., 2014, Skukuza. **Programme & abstracts ...** Skukuza: PARSA, 2014. p. 15-15. Disponível em: <http://media.wix.com/ugd/41c413_e5a585b431144f82b04b1865bdd5b375.pdf>. Acesso em: 24 abr.2017.

WERTHER, K.; LUZZI, M. C.; OLIVEIRA, J. P.; MACHADO, R. Z.; ALVES-JÚNIOR, J. R. F.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of hemoprotozoa agents in wild Orinoco goose (*Neochen jubata*) in Brazil. In: Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), 12., 2016, Berlim. **12th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), 2016**.

WOZNIAK, E. J.; TELFORD JR., S. R.; MCLAUGHLIN, G. L. Employment of the Polymerase Chain Reaction in the Molecular Differentiation of Reptilian Hemogregarines and Its Application to Preventative Zoological Medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Lawrence, v. 25, n. 4, p. 538-547, 1994. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/20095414>>. Acesso: 24 abr.2017.

YAMADA, K. D.; TOMII, K.; KATOH, K. Application of the MAFFT sequence alignment program to large data—reexamination of the usefulness of chained guide trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 32, n. 21, p. 3246–3251, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btw412>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ZAGO, C. E. S.; FERRAREZI, A. L.; VIZOTTO, L. D.; OLIVEIRA, C.; CABRAL, S. R. P.; TABOGA, S. R.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; VENANCIO, L. P. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanus*, Testudines) in the northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 2, p. 721-726. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4238/vol9-2gmr731>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

APÊNDICES

Apêndice A: Descrição das proporções dos ingredientes das reações de cPCR de fragmentos de DNA de hemosporídeos com base no gene mitocondrial Citocromo *b*.

Ingredientes da <i>Mix</i> da Reação	<i>Mix de cada reação de Amplificação</i>				
	Reação A	<i>Nested A</i>	Reações B e C	<i>Nested Reação B</i>	<i>Nested Reação C</i>
Material genômico	5 µL do DNA-amostra	1 µL do produto da amplificação	5 µL do DNA-amostra	1 µL do produto da amplificação	1 µL do produto da amplificação
Tampão da PCR (PCR Buffer 10x - 100 nM Tris-Cl, pH 9,0, 500 mM KCl)	1x	1x	1x	1x	1x
Deoxinucleotídeo (dNTP)	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada
Cloreto de Magnésio	1,5 mM	1,5 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Oligonucleotídeo iniciador	0,5 µM HaemNFI 0,5 µM HaemNR3	0,5 µM HAEMF 0,5 µM HAEMR2	0,4 µM DW2 0,4 µM DW4	0,4 µM DW1 0,4 µM DW6	0,4 µM DW1 0,4 µM DW3
Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen® TM Life Technologies, USA)	0,75 U	0,75 U	1 U	1 U	1 U
Água ultra-pura esterilizada	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.
Total	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL