

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS”
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hepatozoon* spp. EM
ROEDORES NO BRASIL

Lívia Perles

Médica Veterinária

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS” - CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hepatozoon* spp. EM
ROEDORES NO BRASIL**

Lívia Perles

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Medicina
Veterinária (Patologia Veterinária)

2019

P451d	Perles, Livia Diversidade genética de Hepatozoon spp. em roedores no Brasil / Livia Perles. -- Jaboticabal, 2019 65 p. : il., tabs., fotos, mapas Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Marcos Rogério André 1. 18S rRNA. 2. Hepatozoonose. 3. Filogenia. 4. Diversidade haplotípica. 5. Rodentia. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hepatozoon* spp. EM ROEDORES NO BRASIL

AUTORA: LIVIA PERLES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:

Marcos R. André

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

Estevam Guicharme Lux Hoppe

Prof. Dr. ESTEVAM GUICHERME LUX HOPPE
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP / Jaboticabal

Lúcia Helena Odwyer de Oliveira

Profa. Dra. LÚCIA HELENA ODWYER DE OLIVEIRA
Departamento de Parasitologia-Instituto de Biociências/UNESP / Botucatu/SP

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lívia Perles – Filha de Benedito Aparecido Perles e Roseli Inês Stuari Perles nasceu em 26 de fevereiro de 1992, na cidade de Catanduva/SP. Em 2010 ingressou na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus Jaboticabal, onde em 2015 se formou Médica Veterinária. Realizou durante a graduação duas iniciações científicas sob orientação do Prof. Dr. Maurício Barbanti Duarte no NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) com projetos na área de Genética da Conservação. No ano de 2015 ingressou no programa de Residência em Área Profissional de Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, na subárea Medicina de Animais Selvagens sob orientação da Prof. Dra. Karin Werther. Ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária), em março de 2017, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Jaboticabal, com bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

EPÍGRAFE

“A capacidade de destruir do homem partiu do arco e flecha, chegou à bomba atômica e irá muito além dela. Mas a natureza lhe cobrará tributos cada vez maiores, e se desejarmos continuar como elementos integrantes dessa mesma Natureza, a quem devemos uma grande parcela de nossa existência, façamos-lhe justiça, conservando-a”

Augusto Ruschi

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Roseli Inês Stuqui Perles e Benedito
Aparecido Perles, por todo apoio durante essa etapa

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda sabedoria e força pra continuar meu caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Unesp, Universidade de São Paulo, Unesp, Campus Jaboticabal), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo 2015/14896-1) pelo apoio financeiro para realizar esta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus pais Roseli Inês Stuari Perles e Benedito Aparecido Perles, por todo amor e dedicação empenhados para que eu alcance meus objetivos. Obrigada por sempre terem sido meus grandes exemplos.

Ao meu orientador Prof. Marcos Rogério André, pela oportunidade e confiança.

Ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios e Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, por terem gentilmente cedido as amostras, especialmente ao Dr. André Rodrigues Roque, Dr. Paulo D'Andrea, e Dra. Elba Regina Lemos.

Aos componentes da banca de qualificação de mestrado, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani pelas considerações e auxílio no desenvolvimento final do trabalho.

À Professora Adriana Coletto e a pós graduanda Amanda de Faria pela contribuição no trabalho.

Às irmãs que a Unesp me deu: Aline Kawanami, Julia Maria Ribeiro e agora Alissa Ribeiro Monteiro Serrano. Muito obrigada por todo amor e carinho durante todos esses anos.

Ao meu namorado Gustavo Felippelli, por toda ajuda e companheirismo.

À Profa. Karin e aos colegas selvagens Caroline do Couto, Juliana Paula de Oliveira, Guilherme Henrique Fernandes Barranco, Mariele de Santi e Isabela Maciel Soriano, por me permitirem estar perto dos animais que eu tanto amo.

À todos meus colegas do Departamento de Patologia Veterinária: Keyla Carstens de Sousa, Jyan Lucas Benevenuto, Victoria Valente, Natalia Serra, Marcia Mariza Gomes Jusi, Pamela Rodrigues Reina Moreira, Paulo Henrique Leal Bertolo, Gabriela Piovan, Andresa Matsui, Isabela Perossi, Paulo Martinelli, Luiz Ricardo Gonçalves, Simone Fernandes, Kayo Castilho Neto, Ana Cláudia Calchi, por todo aprendizado e pelas conversas diárias. Em especial a Priscila Ikeda, Leidiane Duarte e Renan Bressianini do Amaral pela amizade.

Aos colegas David Galindo, Caio Bustamante e Nathan Cruz pelo companheirismo e momentos de alegria.

À todos estagiários e aos alunos de iniciação científica pelo comprometimento ao seu trabalho e por toda ajuda fornecida nesses dois anos.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, Rafaela, Mabel, Edgard, Cristina e Antônio.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Agente etiológico e Ciclo biológico.....	2
2.2 Transmissão.....	4
2.3 Epidemiologia.....	5
2.4 Sinais Clínicos e achados laboratoriais.....	5
2.5 Diagnóstico.....	6
2.6 <i>Hepatozoon</i> spp. em roedores.....	8
2.7 Diagnóstico da infecção por <i>Hepatozoon</i> spp. em roedores.	12
2.7.1 Presença de gametócitos em esfregaços sanguíneos corados.....	12
2.7.2 Presença de merontes em cortes histopatológicos.....	14
2.7.3 <i>Imprint</i> de órgãos.....	15
2.7.4 Detecção molecular e inferências filogenéticas.....	15
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Espécies amostradas e área de estudo.....	21
4.2 Extração de DNA das amostras de tecido esplênico de roedores.....	22
4.3 Controle endógeno da PCR.....	22
4.4 Reações de Amplificação para <i>Hepatozoon</i> spp.....	23
4.5 Purificação e quantificação dos amplicómeros.....	24
4.6 Sequenciamento.....	24
4.7 Análise das Sequências e construção de árvores filogenéticas.....	25
4.8 Diversidade genética de <i>Hepatozoon</i> spp.....	25
4.9 Análise de Variância Molecular (AMOVA).....	26
4.10 Genealogias.....	26
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Qualidade das amostras de DNA extraídas a partir de tecido esplênico de roedores.....	26

5.2	Detecção molecular de <i>Hepatozoon</i> spp. em amostras de tecido esplênico de roedores.....	28
6.	DISCUSSÃO.....	49
7.	CONCLUSÃO.....	53
8.	REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estudos realizados para pesquisa de <i>Hepatozoon</i> sp. em roedores na Europa, África , América do Norte, Ásia e América do Sul.....	8
Tabela 2. Número total e espécies de roedores amostrados nos diferentes biomas brasileiros. Amostras de baço de roedores positivas para <i>Hepatozoon</i> sp. seguindo os protocolos de Perkins and Keller (2001) e Ujvari et al., 2004, baseados no gene 18SrRNA, de acordo com as espécies de roedores e respectivos estados de origem.....	28
Tabela 3. Máxima porcentagem de identidade verificada pelo programa BLAST [®] para sequências de DNA de <i>Hepatozoon</i> spp. obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelo protocolo de Perkins and Keller (2001). Todas as sequências apresentaram 100% de <i>query coverage</i>	31
Tabela 4. Máxima porcentagem de identidade verificada pelo programa BLAST [®] para sequências de DNA de <i>Hepatozoon</i> spp. obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelo protocolo de Ujvari et al. (2004). Todas as sequências apresentaram 100% de <i>query coverage</i>	36
Tabela 5. Polimorfismos e diversidade de sequências 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i> spp. (protocolo de Ujvari et al., 2004) obtidas em amostras de baço de roedores amostrados em cinco biomas brasileiros.....	37
Tabela 6. Alinhamento das sequências de <i>Hepatozoon</i> spp. de roedores obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelo protocolo de Ujvari et al. (2004) mostrando os sítios variáveis.....	40
Tabela 7. Relação, frequência e alocação de haplótipos 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i> de roedores no respectivo agrupamento da rede haplotípica (Figura 9) dos indivíduos amostrados nos diferentes estudos brasileiros.....	39
Tabela 8. Máxima porcentagem de identidade verificada pelo programa BLAST [®] para sequências concatenadas de DNA de <i>Hepatozoon</i> spp. obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelos protocolo de Ujvari et al. (2004) e Perkins and Keller (2001).....	44
Tabela 9. Relação, frequência e alocação de haplótipos 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i> de roedores no respectivo agrupamento da rede haplotípica (Figura 15) dos indivíduos amostrados nos diferentes estudos brasileiros. O agrupamento 1 está identificado em	

	azul e o agrupamento 2 está indentificado em rosa...	48
Tabela 10.	Teste AMOVA. Nesse teste, cada um dos agrupamentos (agrupamentos 1 e 2) foi considerado como uma população.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Hepatozoon</i> spp. em cão.....	3
Figura 2. Distribuição geográfica e ocorrência de <i>Hepatozoon</i> spp. em roedores ao redor do mundo.....	8
Figura 3. Biomas no Brasil onde estudos de ocorrência de <i>Hepatozoon</i> spp. em roedores foram conduzidos.....	13
Figura 4. Distribuição dos roedores capturados (n=472) em cinco biomas brasileiros.....	21
Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o controle endógeno (gene <i>irbp</i>). Primeira canaleta: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de <i>Akodon</i> sp.); canaletas 1-26: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).....	27
Figura 6. Posicionamento filogenético das sequências de <i>Hepatozoon</i> spp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 800pb (protocolo de Perkins and Keller 2001), utilizando o modelo evolutivo TPM2+F+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos estados.....	33
Figura 7. Posicionamento filogenético das sequências de <i>Hepatozoon</i> sp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 800pb (protocolo de Perkins and Keller, 2001), utilizando o modelo evolutivo TPM2+F+G4. Os números na árvore indicam valores de <i>bootstrap</i> para os pontos de ramificação. Números de acesso estão indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos estados.....	34
Figura 8. Análise <i>Network</i> das sequências 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i> (protocolo de Perkins e Keller, 2001)	

	obtidas de roedores amostrados no presente estudo, comparativamente a sequências previamente detectadas em répteis, felídeos e canídeos. A análise utilizou o programa <i>Splitstree</i> com os parâmetros “Neighbor-Net e “Uncorrected p-distance”.....	35
Figura 9.	Distribuição (A) e rede de haplótipos (B) 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i> detectados em roedores amostrados nos diferentes biomas brasileiros.....	39
Figura 10.	Posicionamento filogenético das sequências de <i>Hepatozoon</i> spp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 600pb (protocolo de Ujvari et al. 2004) utilizando o modelo evolutivo TIM1+I+G. Os números na árvore indicam valores de suporte de clado para os pontos de ramificação. Números de acesso estão indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho.....	41
Figura 11.	Posicionamento filogenético das sequências de <i>Hepatozoon</i> spp.(18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 600pb (protocolo de Ujvari et al. 2004) utilizando o modelo evolutivo TIM1+I+G. Os números na árvore indicam valores de <i>bootstrap</i> para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho.....	42
Figura 12.	Análise <i>Network</i> das sequências 18S rRNA de <i>Hepatozoon</i> (protocolo de Ujvari et al., 2004) obtidas de roedores amostrados no presente estudo, comparativamente a sequências previamente detectadas em répteis, felídeos e canídeos. A análise utilizou o programa <i>Splitstree</i> com os parâmetros “Neighbour-Net e “Uncorrected p-distance”.....	43
Figura 13.	Posicionamento filogenético das sequências concatenadas de <i>Hepatozoon</i> spp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 1462pb utilizando o modelo evolutivo TIM+G. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos biomas.....	45

- Figura 14.** Posicionamento filogenético das sequências concatenadas de *Hepatozoon* spp.(18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 1462pb utilizando o modelo evolutivo TIM+G. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos biomas..... 46
- Figura 15.** A) Distribuição dos agrupamentos de haplótipos 18S rRNA de *Hepatozoon* (1 representado pela cor azul e 2 representado pela cor rosa) detectados em roedores amostrados em diferentes regiões geográficas brasileiras. B) Rede de haplótipos não enraizada para *Hepatozoon* sp. gerada através das sequências do gene ribossomal 18S rDNA com o software TCS v.1.21 (Clement et al., 2000). Cada linha da rede representa um simples passo mutacional; os pequenos círculos indicam haplótipos hipotéticos que são intermediários necessários entre os haplótipos amostrados, mas que não foram observados na amostra. O agrupamento 1 está identificado em azul e o agrupamento 2 está indentificado em rosa..... 47

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Hepatozoon* spp. EM ROEDORES NO BRASIL

Resumo - O gênero *Hepatozoon* spp. engloba protozoários parasitas de uma ampla variedade de vertebrados terrestres. Recentemente, vem se investigando o possível papel de roedores como hospedeiros intermediários e paratênicos nos ciclos de transmissão de espécies de *Hepatozoon* parasitas de carnívoros domésticos e selvagens. O presente estudo teve como objetivo investigar a presença e caracterizar o DNA de *Hepatozoon* spp. em amostras de baço de 31 gêneros de roedores amostrados em cinco biomas brasileiros. Das 462 amostras analisadas 195 amostras foram positivas em um ou ambos os protocolos utilizados. *Hepatozoon* spp. foi detectado em 24 gêneros de roedores, com primeiro relato da infecção pelo referido parasita em *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Proechimys roberti*, *P. cuvieri*, *G. spixii*, *Hylaeamys megacephalus*, *Gracilinanus agilis*, *Cerradomys scotti*, *C. akroai*, *C. marinhui* e *Wiedomys cerradensis*. As análises Bayesianas e de Máxima Verossimilhança das sequências 18S rRNA obtidas mostraram a presença de três clados de *Hepatozoon*, sendo um clado composto por sequências de *Hepatozoon* sp. detectados em roedores e répteis (cobras, jacarés e lagartos), um clado composto por *Hepatozoon americanum* e espécies de *Hepatozoon* detectadas em canídeos e felídeos selvagens, e um clado agrupando *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon* spp. detectados em canídeos domésticos e selvagens e *Rhipicephalus sanguineus*. As sequências de *Hepatozoon* do presente estudo foram agrupadas no clado de roedores e répteis. A análise de distância pelo software Splitstree revelou que as sequências do presente estudo foram agrupadas em um grupo com sequências de *Hepatozoon* de outros roedores do Brasil e do mundo, próximas às sequências de *Hepatozoon* detectadas em répteis. As sequências de *Hepatozoon* obtidas de felídeos e canídeos formaram grupos distintos daquelas detectadas em roedores. Para análise de haplótipos 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. detectados em roedores em outros estudos realizados no Brasil até o presente momento foram escolhidas 26 sequências e a análise foi realizada com o software TCS. Seis haplótipos foram encontrados, sendo o haplótipo 1 o mais frequente. Os resultados do presente estudo sugerem a existência de estruturação genética das espécies de *Hepatozoon* que ocorrem em roedores no Brasil de acordo com a localidade geográfica.

Palavras-chave: 18S rRNA, hepatozoonose, filogenia, diversidade haplotípica, Rodentia

GENETIC DIVERSITY OF *Hepatozoon* spp. IN RODENTS IN BRAZIL

Abstract- The *Hepatozoon* spp. genus includes protozoan parasites of a wide range of terrestrial vertebrates. Recently, the role of rodents as intermediate and paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon* species parasites of domestic and wild carnivores, has been investigated. The present study aimed to investigate the presence and characterization of *Hepatozoon* spp. in spleen samples of 31 genera of rodents sampled in five Brazilian biomes. Out of 462 samples analyzed, 195 were positive in one or in both protocols. *Hepatozoon* spp. was detected in 24 genera of rodents, with the first report of the infection in *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Proechimys roberti*, *P. cuvieri*, *G. spixii*, *Hylaeamys megacephalus*, *Gracilinanus agilis*, *Cerradomys scotti*, *C. akroai*, *C. marinhui* and *Wiedomys cerradensis*. Bayesian and Maximum Likelihood analyzes of the obtained 18S rRNA sequences demonstrated the presence of three clades of *Hepatozoon*, one clade being composed of *Hepatozoon* sp. detected in rodents and reptiles (snakes, alligators and lizards), a clade composed of *Hepatozoon americanum* and *Hepatozoon* species detected in canids and wild felids, and a clade grouping *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon* spp. detected in domestic and wild canids and in *Rhipicephalus sanguineus*. *Hepatozoon* sequences of the present study were grouped in the clade of rodents and reptiles. Distance analysis by Splitstree software revealed that the sequences of the present study were grouped into a group with *Hepatozoon* sequences from other rodents from Brazil and the world, close to the *Hepatozoon* sequences detected in reptiles. For analysis of 18S rRNA haplotypes of *Hepatozoon* spp. detected in rodents from other studies conducted in Brazil up to the moment, 26 sequences were chosen and the analysis was performed with the TCS software. Six haplotypes were found, with haplotype 1 being the most frequent. Results of the present study suggest the existence of genetic structuring of *Hepatozoon* species in rodents in Brazil according to the geographical location.

Key-words- 18S rRNA, hepatozoonosis, phylogeny, haplotypic diversity, Rodentia.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Hepatozoon* pertence a um dos seis gêneros de hemoparasitas chamados hemogregarinas, possuindo um ciclo de vida heteroxeno envolvendo um hospedeiro invertebrado definitivo e um hospedeiro vertebrado intermediário. Estudos vêm detectando a presença de espécies *Hepatozoon* em mamíferos domésticos e selvagens, aves, répteis, anfíbios no mundo (Smith 1996).

A epidemiologia da hepatozoonose em animais selvagens e domésticos no Brasil ainda não está totalmente elucidada. Além de cães domésticos, *Hepatozoon* spp. estão amplamente difundido pelo Brasil e já foram detectadas em uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo felinos domésticos (André et al., 2015), felídeos e canídeos selvagens (André et al., 2010), répteis (O'Dwyer et al., 2013), roedores (Wolf et al., 2016; Demoner et al., 2016; Sousa et al., 2017), marsupiais (Sousa et al., 2017) e quatis (Sousa et al., 2017). Haplótipos de *Hepatozoon* encontrados circulando em roedores selvagens apresentam um maior grau de polimorfismo quando comparados aos encontrados em canídeos domésticos e selvagens e procionídeos no Pantanal sul-matogrossense (Sousa et al., 2017).

Roedores atuam como importantes elos ecológicos nas complexas cadeias epidemiológicas de enfermidades transmitidas por carrapatos. Estes mamíferos, além de atuarem como hospedeiros para diversas espécies de carrapatos, assumem o papel de reservatórios de inúmeros patógenos veiculados por artrópodes (Randolph et al., 1999; Guglielmone e Nava, 2010; Guglielmone et al., 2011).

Espécies de *Hepatozoon* sp. vêm sendo detectadas em roedores em diversas regiões do mundo. No Brasil, os estudos realizados ainda são escassos e pontuais (Criado-Fornélio et al., 2009; Wolf et al., 2016; Demoner et al., 2017; Sousa et al., 2017; Soares et al., 2017; Gomes et al., 2018; Demoner et al., 2018). Dentro deste contexto, o papel dos roedores na epidemiologia das espécies de *Hepatozoon* spp. circulantes no Brasil deve ser investigado. Considerando que os estudos prévios são pontuais e não abrangem todos os biomas brasileiros, o presente trabalho mostra-se valioso uma vez que a investigação de *Hepatozoon* spp. em diferentes regiões com

características climáticas e ambientais diversas pode fornecer informações sobre a distribuição geográfica do protozoário, bem como a diversidade de hospedeiros e estruturação genética desse patógeno, contribuindo para o esclarecimento da epidemiologia da hepatozoonose.

Assim, o atual estudo propõe verificar a ocorrência de *Hepatozoon* sp. em populações de roedores em cinco diferentes biomas no Brasil, traçar inferências filogenéticas das sequências 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. de roedores com aquelas detectadas em outros hospedeiros, e avaliar a existência de estruturação genética das espécies de *Hepatozoon* detectadas em roedores no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico e Ciclo biológico

O gênero *Hepatozoon* compreende protozoários hemoparasitas do filo Apicomplexa que infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados em todo o mundo (Ramos et al., 2015). No ciclo de vida desse parasita, dois hospedeiros são necessários: o hospedeiro definitivo (vetor invertebrado) e um hospedeiro vertebrado intermediário (Smith, 1996; Simpson et al., 2006). Diferentemente das outras bacterioses e protozoonoses transmitidas por carrapatos, a hepatozoonose é transmitida por meio da ingestão do hospedeiro definitivo, um invertebrado contendo oocistos de *Hepatozoon*, pelo animal (hospedeiro intermediário) (Baneth et al., 2003). A infecção também pode ser adquirida por transmissão intrauterina ou predação (Maia et al., 2014; Modrý et al., 2017; Hodžić et al., 2018).

Após ingestão do hospedeiro invertebrado contendo oocistos maduros de *Hepatozoon*, esporozoítos são liberados no sistema gastrointestinal do hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos penetram na parede intestinal e, dependendo da espécie de *Hepatozoon*, são transportados por via hematogênica para diferentes órgãos, tais como tecidos do sistema hemolinfático (baço, medula óssea, linfonodos, fígado), musculatura estriada, pulmões e rins, onde são formados os merontes (Baneth e Weigler, 1997). Após o rompimento dos merontes maduros, os merozoítos liberados invadem as células brancas em

mamíferos e eritrócitos em répteis, anfíbios e aves, onde originam os estágios de gamontes ou gametócitos. Tais formas evolutivas circulam no sangue periférico e são ingeridas pelo vetor invertebrado competente durante o repasto sanguíneo. O ciclo no vetor inclui a produção de micro e macrogametas que se fusionam e desenvolvem oocistos poliesporocísticos (Smith, 1996; Smith e Desser, 1997; Allen et al., 2011; O'Dwyer, 2011) (**Figura 1**).

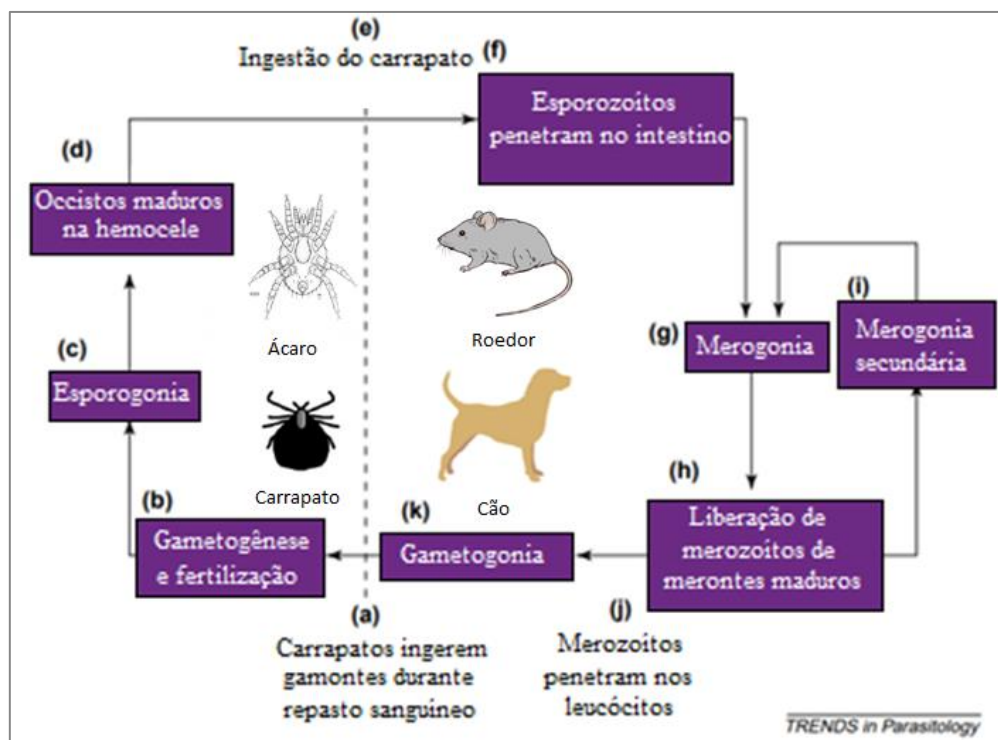


Figura 1. Ciclo de vida de *Hepatozoon* spp. (a) Os leucócitos infectados com gamontes, que circulam no sangue periférico, são ingeridos pelo invertebrado durante o repasto sanguíneo. (b) Os gamontes, que são liberados de leucócitos e se diferenciam em gametas. A fertilização é seguida pela criação de zigoto. (c) Oocistos se desenvolvem nas células do intestino e se projetam para o hemocele à medida que amadurecem e aumentam. (d) Um invertebrado contendo oocistos de *Hepatozoon* é ingerido por um cão ou outro hospedeiro vertebrado. (e) Esporocistos são liberados dos oocistos. Os esporozoítos invadem o intestino do vertebrado e são transportados (possivelmente dentro de uma célula fagocitária) para os tecidos alvo do hospedeiro. (f) Ocorre a formação de merontes no processo de merogonia. (g) Os merozoítos são libertados de merontes maduros. (h) Os merozoítos penetram nos leucócitos e se transformam em gamontes. (i) Os gametócitos nos leucócitos alcançam a circulação sanguínea e podem ser ingeridos por invertebrados (Adaptado de Baneth et al., 2003).

2.2 Transmissão

O ciclo de vida de *Hepatozoon* spp. inclui um hospedeiro invertebrado (Smith, 1996; Simpson et al., 2006), o qual pode ser representado por carrapatos, pulgas, moscas, mosquitos ou piolhos (Lainson et al., 2003; Vincent-Johnson, 2003; Watkins et al., 2006; Rubini et al., 2009).

Até o momento, o único vetor conhecido de *H. americanum* é o carrapato-da costa-do-Golfo, *Amblyomma maculatum* (Ewing et al., 2002; Vincent-Johnson, 2003), que é uma espécie de artrópode que já foi relatada em países da América Central e do Norte (Guglielmone et al., 2003; Teel et al., 2010). Nas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo, incluindo Brasil e Estados Unidos, sabe-se que *H. canis* é transmitido pelos carrapatos *Amblyomma ovale* (Forlano et al., 2005; Forlano et al., 2007; Rubini et al., 2009), *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis flava* (Murata et al., 1995), e pelo carrapato vermelho-do-cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. No Brasil, a participação do *R. sanguineus* na transmissão do *H. canis* deve ser melhor investigada (Gomes et al., 2016), haja vista que alguns estudos preliminares apontam que a linhagem tropical do carrapato *R. sanguineus* mostre pouca ou nenhuma importância na transmissão do referido parasita no Brasil (Demoner et al., 2013). Em Minas Gerais, oocistos esporulados de *H. canis* foram observados em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* coletados de cães domésticos naturalmente infectados (de Miranda et al., 2011). Na região do Pantanal matogrossense, DNA de *H. canis* foi detectado pela PCR em carrapatos *Amblyomma sculptum* coletados de cães domésticos naturalmente infectados (Melo et al., 2016). Os autores relataram que possivelmente o DNA detectado poderia ter origem no sangue ingerido pelo artrópode, uma vez que *A. sculptum* não parece ter importância na transmissão de *Hepatozoon* spp. no Brasil (Demoner et al., 2013).

A transmissão de *Hepatozoon* sp. por ácaros e pulgas parece ter grande importância em roedores. Miller (1908) descreveu, pela primeira vez, o ciclo sexuado de *Hepatozoon muris* (sin. *Hepatozoon perniciosum*) em ácaros da espécie *Laelaps echidninus* coletados de *Rattus norvegicus* (sin. *Mus decumanus*). Posteriormente, Hoogstraal (1965) descreveu o ciclo sexuado de *Hepatozoon balfouri* em ácaros da espécie *Haemolaelaps aegyptius* amostrados de roedores *Jaculus jaculus*. Watkins et al. (2006) sugeriu a

participação de sifonápteros no ciclo biológico de *Hepatozoon* spp. em roedores, com base na observação de oocistos de *Hepatozoon* sp. em pulgas da espécie *Megabothris abantis*, colhidas de roedores da espécie *Microtus montanus* nos Estados Unidos.

2.3 Epidemiologia

No Brasil, tem-se detectado a presença de espécies de *Hepatozoon* em mamíferos selvagens, répteis e anfíbios. André et al. (2010) detectou a presença de *Hepatozoon* em uma onça parda (*Puma concolor*), quatro gatos-do mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e em um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo e em Brasília. Nesse mesmo trabalho, foi detectado *Hepatozoon* sp. em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorro-vinagre (*Speothus venaticus*). Genótipos geneticamente relacionados à *H. americanum* vêm sendo detectados em canídeos selvagens (Criado-Fornelio et al., 2006; André et al., 2010), gatos (André et al., 2015) e, mais recentemente, em cães (Gomes et al., 2016). Sousa et al. (2017) detectou *Hepatozoon* em quatis (*Nasua nasua*), em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e em um marsupial (*Thylamys macrurus*) amostrados no Pantanal. Recentemente, *H. procyonis* foi detectado em quatis (*Nasua nasua*) no estado de São Paulo (SILVA et al., 2018). Em répteis, já foram descritas espécies de *Hepatozoon* sp. parasitando hemácias de serpentes e jacarés. Em serpentes, espécies de *Hepatozoon* foram detectadas nas espécies *Boa constrictor amarali*, *Crotalus durissus terrificus*, *Philodryas patagoniensis* e *Hydrodynastes gigas*, no Estado de São Paulo (Pessoa et al., 1974; Moço et al., 2002, O'Dwyer et al. 2003, O'Dwyer et al. 2011b, Moço et al. 2012). Em jacarés, *H. caimani* foi detectado em *Caiman crocodilus yacare* no Pantanal (Bouer et al., 2017; Soares et al., 2017). Em anfíbios, o agente foi detectado em espécimes de *Leptodactylus chaquensis* e *Leptodactylus podicipinus* amostrados no Pantanal (Leal et al., 2015).

2.4 Sinais Clínicos

A doença causada por *Hepatozoon* spp. parece apresentar caráter subclínico em animais selvagens (Metzger et al, 2008; André et al., 2010), embora existam relatos de doença clínica severa em coiotes (*Canis latrans*)

nos Estados Unidos (Kocan et al., 2000) e mortalidade em hienas (*Crocuta crocuta*) na África (East et al., 2008). *Hepatozoon* sp. também pode atuar como agente patogênico potencial oportunista em animais imunocomprometidos ou com infecções concomitantes (Kubo et al., 2006).

Em cães, a infecção por *H. canis* pode manifestar-se em três apresentações clínicas: subclínica, que é provavelmente a mais comum; aguda, que se manifesta aproximadamente uma semana antes da morte do animal; e crônica, que possui fases de expressão clínica e remissão (Barton et al., 1985). O principal achado clínico em cães infectados com o referido parasita é caquexia, acompanhada de atrofia muscular, mais visível na região temporal. A supressão do sistema imune causada por infecções concomitantes ou medicações imunossupressoras podem influenciar a patogênese de uma nova infecção por *H. canis* ou reativar uma infecção já existente (Baneth et al., 2001).

A doença causada por *H. americanum* em canídeos se apresenta de forma mais severa, e tem como principais sinais clínicos febre, letargia, depressão, mialgia, anormalidades na marcha, perda de massa muscular e relutância para andar e levantar, causada pela grande quantidade de cistos formados na musculatura esquelética e lesões proliferativas ósseas. Sem tratamento específico, a emaciação e perda crônica da musculatura levam ao óbito dentro de alguns meses (Droleskey, 1993).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da hepatozoonose é usualmente baseado na observação de gamontes em esfregaços sanguíneos (Baneth et al., 2003; O'Dwyer et al., 2006; Mundim et al., 2008a) e cistos (em estágio de merogonia) encontrados em tecidos do hospedeiro (Baneth e Shkap 2003; Cardoso et al., 2014). Apesar de o esfregaço sanguíneo ser um exame simples e que pode ser realizado por profissionais sem prévia experiência, esse método pode resultar em diagnósticos falsos negativos, especialmente nos casos em que a parasitemia é baixa ou intermitente (Karagenc et al., 2006). Embora testes sorológicos como o ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") sejam mais sensíveis do que esfregaços sanguíneos de sangue periférico (Shkap et al., 1994; Karagenc et al., 2006), e sejam válidos para estudos epidemiológicos, tais

técnicas necessitam um antígeno obtido de amostras de cães com alta parasitemia, e portanto, apresentam limitações que podem dificultar o diagnóstico (O'Dwyer, 2011).

Os testes moleculares, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tendo como alvo o gene 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. são métodos sensíveis para o diagnóstico da hepatozoonose (Inokuma et al., 2002; Criado-Fornelio et al., 2003; Aydin et al., 2015). Ainda, a sensibilidade dessa técnica pode ser aumentada com a utilização de protocolos do tipo nested (nPCR), semi-nested PCR ou em tempo real (qPCR), fornecendo resultados satisfatórios em animais com baixa parasitemia (Inokuma et al., 2002). Até o presente momento, as sequências do gene 18S rRNA compreendem os únicos dados genéticos sobre espécies de *Hepatozoon* infectando carnívoros (Modrý et al., 2017). A maior parte das sequências tem um comprimento de cerca de 250-700pb e sugere um caráter monofilético de espécies de *Hepatozoon* de carnívoros (Barta et al., 2012; Najm et al., 2014).

2.6 *Hepatozoon* spp. em roedores

Roedores atuam como importantes elos ecológicos nas complexas cadeias epidemiológicas de enfermidades transmitidas por carrapatos. Estes mamíferos, além de atuarem como hospedeiros para diversas espécies de carrapatos, assumem o papel de reservatórios de inúmeros patógenos veiculados por artrópodes (Randolph et al., 1999; Guglielmone e Nava, 2010; Guglielmone et al., 2011).

Espécies de *Hepatozoon* sp. vêm sendo detectadas em roedores em diversas regiões do mundo. O primeiro trabalho relatando a presença de gametócitos de *Hepatozoon* em ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*) foi publicado em 1908 nos Estados Unidos (Miller 1908). A partir desse trabalho, diversos outros foram realizados na busca de compreender o ciclo e prevalência desse hemoparasita em roedores na Europa, África, América do Norte, Ásia e América do Sul (**Figura 2, Tabela 1**).

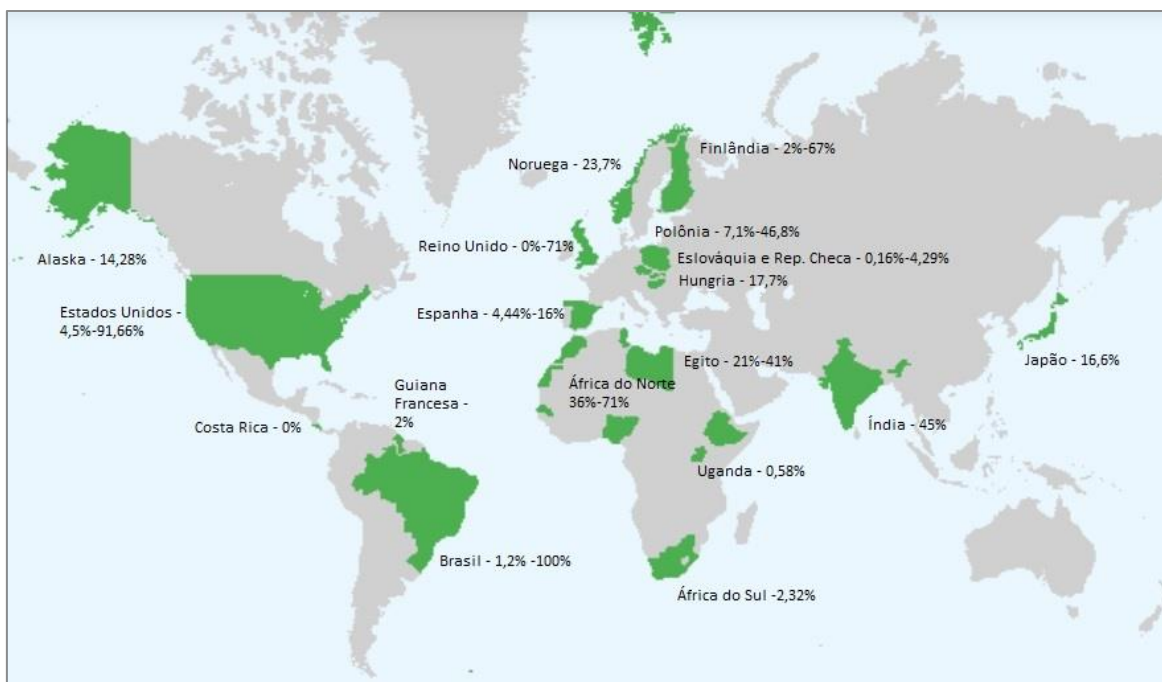


Figura 2. Distribuição geográfica e ocorrência de *Hepatozoon* spp. em roedores ao redor do mundo.

Tabela 1. Estudos realizados objetivando a pesquisa de *Hepatozoon* sp. em roedores na Europa, África, América do Norte, Ásia e América do Sul.

América do Norte					
País	Espécies	Material	Metodologia	Prevalência	Referência
Estados Unidos	<i>Rattus norvegicus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	-	Miller 1908
Estados Unidos	<i>Rattus norvegicus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	4,50%	Eyles, 1952
Estados Unidos	<i>Sciurus carolinensis</i>	Fígado, baço, medula óssea, sangue	Esfregaço sanguíneo e Histopatológico	Sangue: 91,66% Fígado, baço e medula óssea	Clark, 1958
Estados Unidos	<i>Microtus oeconomus</i>	Fígado	Histopatológico	14,28%	Ohbayashi, 1971
Estados Unidos	<i>Microtus montanus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	8,33%	Watkins et al., 2006
Estados Unidos	<i>Sigmodon hispidus</i> <i>Peromyscus leucopus</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	58% <i>Sigmodon hispidus</i> 33,3% <i>Peromyscus leucopus</i>	Jonhson et al., 2009
Estados Unidos	<i>Sigmodon hispidus</i>	Pulmão, fígado, coração, músculo, baço, rins e cérebro	Histopatológico	58,06%	Breshears et al., 2009
Estados Unidos	<i>Neotoma fuscipes</i>	Coração, sangue,	PCR 18S rRNA	5,55% <i>Peromyscus</i>	Allen et al., 2011

	<i>Neotoma micropus</i> <i>Peromyscus leucopus</i> <i>Sigmodon hispidus</i> <i>Peromyscus gossypinus</i> <i>Sciurus carolinensis</i> <i>Marmota monax</i>	fígado,baço		<i>leucopus</i> 5,55% <i>Peromyscus gossypinus</i> 11,11% <i>Neotoma fuscipes</i> 11,11% <i>Neotoma micropus</i> 11,11% <i>Sigmodon hispidus</i> 11,11% <i>Sciurus carolinensis</i> 11,11% <i>Marmota monax</i>	
América do Sul					
País	Espécies	Material	Metodologia	Prevalência	Referência
Brasil	<i>Rattus norvegicus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	-	Carini et al., 1910
Guiana Francesa	<i>Coendou prehensilis</i> <i>C. melanurus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	2% <i>Coendou prehensilis</i>	de Thoisy et al., 2000
Brasil	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	64,28%	Criado-Fornelio et al., 2009
Costa Rica	<i>Melanomys caliginosus</i> <i>Heteromys desmarentianus</i> <i>Peromyscus mexicanus</i> <i>Tylomys watsoni</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	0%	Chinchilla-Carmona et al., 2013
Brasil	<i>Calomys callosus</i> <i>Holochilus sciureus</i> <i>Hylaeamys megacephalus</i> <i>Oecomys roberti</i> <i>Oligoryzomys nigripes</i> <i>Oligoryzomys</i> sp. <i>Pseudoryzomys simplex</i>	Sangue, fígado e baço	PCR 18S rRNA	7,14%	Wolf et al., 2016
Brasil	<i>Oligoryzomys nigripes</i> <i>Oligoryzomys flavescens</i> <i>Akodon</i> sp <i>Necromys lasiurus</i> <i>Sooretamys angouya</i>	Sangue, músculo, baço e fígado	PCR 18S rRNA	32,5% <i>Oligoryzomys nigripes</i> 100% <i>Oligoryzomys flavescens</i> 89,5% <i>Akodon</i> sp 75% <i>Necromys lasiurus</i> 100% <i>Sooretamys angouya</i>	Demoner et al., 2016
Brasil	<i>Thichomys</i>	Sangue/Baço	PCR 18S	Negativo no	Sousa et al.,

	<i>fosteri</i> , <i>Oecomys</i> <i>marmorae</i> <i>Clyomys</i> <i>laticeps</i>		rRNA e esfregaço sanguíneo	esfregaço sanguíneo Protocolo Perkins & Keller (2001): 8% <i>Oecomys</i> <i>marmorae</i> ; 1,2% <i>T. fosteri</i> Protocolo Uvjvari et al. (2004): 15,5% <i>T.fosteri</i> 36% <i>O.</i> <i>marmorae</i>	2017
Brasil	<i>Akodon</i> sp. <i>Cavia</i> sp. <i>Coendou</i> <i>prehensilis</i> <i>Cuniculus paca</i> <i>Dasyprocta</i> sp.	Sangue	PCR 18S rRNA	11,11% <i>Cuniculus paca</i>	Soares et al., 2017
Brasil	<i>Hydrochoerus</i> <i>hydrochaeris</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	Protocolo Gomes et al. (2016) = 40,8% Protocolo Inokuma (2002) = 5,64%	Gomes et al., 2018
Brasil	<i>Akodon</i> <i>montensis</i>	Sangue, baço, fígado	Esfregaço sanguíneo, PCR 18S rRNA, histopatológico	89.5%	Demoner et al., 2018
Europa					
País	Espécies	Material	Metodologia	Prevalência	Referência
Noruega	<i>Lemmus</i> <i>lemmus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	23,7%	Wiger, 1973
Inglaterra	<i>Apodemus</i> <i>sylvaticus</i> <i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i> <i>Microtus</i> <i>agrestis</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	4% <i>Apodemus</i> <i>sylvaticus</i> 32,8% <i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i> 45,8% <i>Microtus</i> <i>agrestis</i>	Healing, 1981
Inglaterra	<i>Apodemus</i> <i>sylvaticus</i> <i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	0% <i>Apodemus</i> <i>sylvaticus</i> 56,2% <i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i>	Turner, 1986
Inglaterra	<i>Sciurus</i> <i>carolinensis</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	71%	Watkins & Nowell, 1991
Finlândia	<i>Clethrionomys</i> <i>rufocanu</i> , <i>Clethrionomys</i> <i>rutilus</i> <i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i> <i>Microtus</i> <i>agrestis</i> <i>Microtus arvalis</i> <i>Apodemus</i> <i>agrarius</i> <i>Apodemus</i> <i>flavicollis</i>	Pulmão, fígado, estômago, intestinos, coração, fígado, rins e cérebro	Histopatológico	23% <i>Clethrionomys</i> <i>rufocanus</i> 67% <i>Clethrionomys</i> <i>rutilus</i> 43% <i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i> 2% <i>Microtus</i> <i>agrestis</i>	Laakkonet et al., 2001
Polônia	<i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i> <i>Microtus</i> <i>oeconomus</i> ,	Sangue	Esfregaço sanguíneo	Área 1: 41,6% <i>C. glareolus</i> Área 2: 18,9% <i>C. glareolus</i>	Karbowiak et al., 2005

	<i>Microtus agrestis</i> <i>Apodemus flavicollis</i> <i>Sicista betulina</i>			7,1% <i>M. oeconomus</i> Área 3: 33,3% <i>C. glareolus</i>	
Espanha	<i>Clethrionomys glareolus</i> <i>Apodemus sylvaticus</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	4,44% <i>Clethrionomys glareolus</i>	Criado-Fornelio et al., 2006
Inglaterra	<i>Sciurus vulgaris</i>	Pulmão e coração	Histopatológico PCR 18S	Histopatológico: 37% PCR18S: 2%	Simpson et al., 2006
Espanha	<i>Apodemus sp</i> <i>Mus musculus</i> <i>Clethrionomys glareolus</i>	Sangue/ Coágulo	PCR 18S rRNA	16% - <i>Clethrionomys glareolus</i>	Gimenez et al., 2009
Espanha	<i>Sciurus vulgaris</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	20%	Criado-Fornelio et al., 2009
Polônia	<i>Myodes glareolus</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	46,8%	Bajer et al., 2014
Eslováquia e República Checa	<i>Apodemus flavicollis</i> <i>Micromys minutus</i> <i>Myodes glareolus</i> <i>Microtus arvalis</i> <i>Microtus subterraneus</i>	Pulmões, baço, sangue	PCR 18S rRNA	9,38% <i>Myodes glareolus</i> 0,28% <i>Apodemus flavicollis</i>	Hamšíková et al., 2016
Hungria	<i>Apodemus flavicollis</i> <i>Apodemus agrarius</i> <i>Myodes glareolus</i> <i>Microtus agrestis</i> <i>Mus musculus</i> <i>Micromys minutus</i>	Sangue e baço	PCR 18S rRNA	17,7% <i>M. glareolus</i>	Rigó et al., 2016
Ásia					
País	Espécies	Material	Metodologia	Prevalência	Referência
Índia (Namakkal)	<i>Rattus norvegicus</i>	Sangue, fígado, baço, rim	Esfregaço sanguíneo, Imprint de órgão	Esfregaço sanguíneo :45% Imprint de órgão: 30%	Harikrishnan et al., 2011
Japão	<i>Myodes rutilus</i> <i>Myodes rufocanus</i> <i>Apodemus speciosus</i>	Sangue	PCR 18S rRNA	16,6% <i>Myodes rutilus</i> 16,6% <i>Apodemus speciosus</i>	Moustafa et al., 2017
África					
Uganda	<i>Mastomys ugandae</i>	Sangue	Esfregaço sanguíneo	0,58%	Schwetz & Collart, 1930
África do Norte (Etiópia, Egito, Nigéria, Senegal, Mauritânia, Tunísia, Líbia, Marrocos)	<i>Jaculus jaculus</i> <i>Jaculus orientalis</i>	Tecido	PCR 18S rRNA	36% <i>Jaculus jaculus</i> 71% <i>Jaculus orientalis</i>	Maia et al., 2014

África do Sul	<i>Gerbilliscus leucogaster</i>	Fígado	PCR 18S rRNA	2,32%	Harris et al., 2017
---------------	---------------------------------	--------	--------------	-------	---------------------

No Brasil, ainda são necessários estudos para compreender a epidemiologia da hepatozoonose em roedores (**Figura 3**). Os estudos realizados até o presente momento são pontuais e escassos, não abrangendo todos os biomas brasileiros (Criado-Fornelio et al., 2009; Demoner et al., 2016; 2018; Soares et al., 2017 ; Sousa et al., 2017; Gomes et al., 2018).

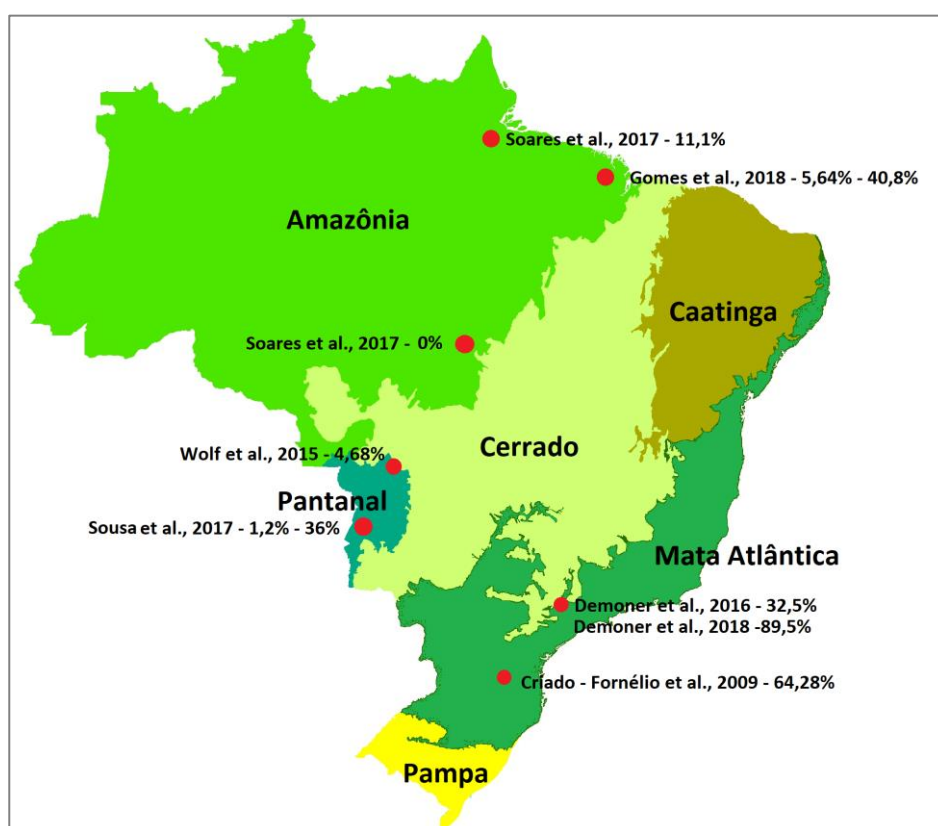


Figura 3. Biomas no Brasil onde estudos de ocorrência de *Hepatozoon* spp. em roedores foram conduzidos.

2.7 Diagnóstico da infecção por *Hepatozoon* spp. em roedores

2.7.1 Presença de gametócitos em esfregaços sanguíneos corados

O diagnóstico da hepatozoonose em roedores pode ser realizado pela observação de gamontes em esfregaços sanguíneos corados (Baneth et al.,

2003; O'Dwyer et al., 2006; Mundim et al., 2008a). Essa metodologia pode apresentar resultados variáveis de acordo com a parasitemia apresentada pelo animal, podendo até resultar em diagnósticos falsos negativos, especialmente nos casos em que a parasitemia é baixa ou intermitente (Karagenc et al., 2006).

Carini (1910), analisando esfregaços sanguíneos de espécimes de *Rattus novergicus* (sin. *Mus decumanus*) amostrados no Brasil, descreveu gametócitos de *Hepatozoon muris* (sin. *Hepatozoon perniciosum*). Os gametócitos apresentavam-se com núcleo ovóide, central, ocupando quase todo o diâmetro do parasita, e apresentavam coloração azul pálido na coloração pelo Giemsa. Clark (1958), analisando esfregaços sanguíneos de esquilos (*Sciurus carolinensis*) amostrados nos Estados Unidos, encontrou gametócitos altamente refratários em monócitos, com formato de linguíça, extremidade recurvada. As mensurações dos gamontes e núcleo foram de 10,9x3,4µm e 4,7x3,4µm, respectivamente. No esfregaço de medula óssea de um animal, foram encontrados esquizontes, que se apresentavam como células alongadas normalmente encistadas em monócitos medindo aproximadamente 12,5 x 4,6µm com um núcleo disposto em forma de banda transversal.

Wiger (1973) encontrou gametócitos de *Hepatozoon* em leucócitos de *Lemmus lemmus*, com dimensão de 11,1x 3,7µm, formato de linguíça e levemente curvado. Neste mesmo trabalho foram encontrados ocasionalmente gametócitos fora das células e em cada célula parasitada, apenas um gamonte foi observado.

Na Guiana Francesa, Thoisy et al. (2000) encontraram gamontes em hemácias de *Coendou prehensilis*. O parasita promoveu um moderado aumento do tamanho das células parasitadas (10,5 ±0,5µm de comprimento por 6,5±0,7µm de largura) comparativamente a células não-parasitadas (6,7±0,6µm de comprimento). O parasita apresentava em média 5,2±0,7µm de comprimento.

Na Polônia, Karbowiak et al. (2005) encontraram gametócitos em leucócitos das espécies *C. glareolus* e *M. oeconomus*. A média de tamanho do parasita encontrado nessas espécies de roedores foi de 3,3-3,4µm±0,4 de largura por 9,4±0,8µm de comprimento, com o núcleo apresentando dimensões de 4,8±0,7µmx 2,5±0,4µm.

Na Índia, Harikrishnan et al. (2011) encontraram gamontes no sangue periférico em 9/20 (45%) dos esfregaços sanguíneos de *Rattus norvegicus*, possuindo forma capsular, núcleo central, com média de tamanho de 8µm.

No Brasil, Demoner et al. (2018) encontraram 17/19 (85,5%) espécimes de *Akodon montensis* parasitados por *Hepatozoon*. Os esfregaços de 11/17 foram avaliados com coloração de Wright-Giemsa e os gamontes eram alongados e ovais, com citoplasma corado de azul claro, núcleo grande, condensado e granular. Mediam aproximadamente $10,96 \pm 0,87$ µm (variando de 9,42–13,09) de comprimento e $4,9 \pm 0,51$ µm (3,88–6,38) de largura.

2.7.2 Presença de merontes em cortes histopatológicos

O exame histopatológico também pode ser empregado no diagnóstico de infecções por *Hepatozoon*, sendo descrita na literatura a presença de merontes em diversos órgãos. Neste sentido, Clark (1958) encontrou cistos contendo esquizontes em cortes histológicos de fígado e baço, com média de tamanho variando de 16,5x13,2µm a 23,1x18,4 µm. Aproximadamente 35 núcleos foram contados dentro de cada cisto. Nenhum esquizonte foi encontrado em cortes de intestino, cérebro e rins dos animais amostrados.

Ohbayashi (1971) encontrou esquizontes em cortes histológicos de fígado, pulmões e baço de *Microtus oeconomus* no Alaska. No corte de fígado, o esquizonte maduro com micromerontes apresentava-se esférico, com 20-30µm de diâmetro, e no seu interior apresentava aproximadamente 80-120 micromerozoítos (raramente mais de 200). Os micromerozoítos eram delgados, com aproximadamente 8-10µm a 1,5-1,8µm de comprimento e 1,5-1,8µm de largura.

Laakkonen e colaboradores (2001) realizaram exames histopatológicos de pulmões, fígado, estômago, intestino, baço, coração, rins e cérebro de roedores dos gêneros *Clethrionomys*, *Microtus* e *Apodemus* em busca de merontes de *Hepatozoon*. Formas de *Hepatozoon* foram encontradas somente nos pulmões avaliados, sendo os merontes encontrados nos septos alveolares e também livres no espaço alveolar. Também foram encontrados gametócitos dentro de eosinófilos nos capilares do tecido pulmonar. Pouca reação tecidual foi observada ao redor dos parasitas, e nenhum sinal clínico foi observado.

Simpson et al. (2006) encontraram esquizontes em cortes histológicos de pulmões de esquilos (*Sciurus vulgaris*) na Inglaterra. Os esquizontes eram ovóides, sendo o maior medindo aproximadamente 20 µm x 12,5 µm e possuía 14-16 núcleos. A maioria dos esquizontes localizava-se na parede alveolar e muitos foram encontrados no interior dos capilares. Em alguns casos, inúmeros gamontes estavam presentes, na maior parte, dentro de células mononucleares, e em alguns casos livres no parênquima. Pouca reação tecidual foi observada associada à presença dos esquizontes.

Breshears et al. (2009) observaram esquizontes de *Hepatozoon* sp. no parênquima de fígado de *Sigmodon hispidus* amostrados nos Estados Unidos. Uma variedade de estágios de desenvolvimento foi observada, variando de um estágio esférico, representado por merontes com um único núcleo ovóide posicionado centralmente, até os estágios de maturação de merontes caracterizados pela formação de merozoítos alongados.

2.7.3 Imprint de órgãos

Harikrishnan et al. (2011) realizaram *imprint* de fígado, baço e rins de *Rattus norvegicus* capturados em Namakkal, na Índia. Vários estágios de maturação do parasita foram encontrados nos órgãos. Dois animais apresentaram numerosos esquizontes no fígado, enquanto um rato apresentou poucos esquizontes no baço. Gamontes foram verificados no baço de três ratos, enquanto que em um animal foram observados numerosos gamontes extracelulares no fígado. Em um rato que apresentava numerosos esquizontes no fígado, foram observados trofozoítos (4µm) com formato de anel com cromatina agrupada e um vacúolo na borda citoplasmática, além de forma de pêra única ou em pares com cromatina manchada de escuro na extremidade mais larga. Estas formas mediram aproximadamente 4-5 µm e presumivelmente representavam trofozoítos precoces. Em outro animal, foram observados esquizontes em diferentes estágios de maturação. Alguns eram esféricos ou ovais e mediam aproximadamente 12-18 x 12-19 µm.

2.7.4 Detecção molecular e inferências filogenéticas

As análises de esfregaços sanguíneos e de preparações histopatológicas eram as únicas metodologias empregadas para diagnóstico da

hepatozoonose até os anos 2000. A partir desta data, técnicas moleculares passaram a ser empregadas, possibilitando um diagnóstico mais sensível e específico da infecção por estes protozoários apicomplexas (Criado-Fornelio et al., 2006; Demoner et al., 2016; Sousa et al., 2017; Moustafa et al., 2017; Gomes et al., 2018).

Simpson et al. (2006) encontraram esquizontes de *Hepatozoon* sp. em 18/49 (37%) dos cortes histológicos de pulmões de esquilos (*Sciurus vulgaris*) na Inglaterra. Após sequenciamento de um único amplicon, foi verificada 97% de identidade com *Hepatozoon erhardovae* previamente detectado em um espécime de *Clethrionomys glareolus*.

DNA de *Hepatozoon* spp. foi detectado em roedores da espécie *Jaculus jaculus* e *Jaculus orientalis* no Marrocos (1/6), Mauritânia (12/25), e Saara Ocidental (4/14) e em seis espécies de canídeos selvagens (*Canis adustus* [1/2], *Canis aureus* [6/32], *Vulpes pallida* [14/28], *Vulpes rueppellii* [6/11], *Vulpes vulpes* [8/ 16], e *Vulpes zerda* [7/11]) em outros países africanos. As sequências de *Hepatozoon* spp. obtidas das duas espécies de roedores do gênero *Jaculus* mostraram-se filogeneticamente relacionadas a sequências de *Hepatozoon* spp. detectadas previamente em um roedor da espécie *Clethrionomys glareolus* (AY600625), cão doméstico (FJ497023) e de uma cobra da espécie *Phyton regius* (EF157822). Como as análises filogenéticas baseadas no gene 18SrRNA mostraram que algumas sequências encontradas em roedores e em canídeos se encontravam filogeneticamente relacionadas, os autores sugeriram uma potencial transmissão por predação entre roedores e raposas no Norte da África (Maia et al., 2014).

Bajer et al. (2014) encontraram uma prevalência molecular de 46,8% (411/880) para *Hepatozoon erhardovae* em *Myodes glareolus* amostrados na Polônia. As sequências 18S rRNA obtidas mostraram identidade de 99,5–99,8% com sequências de *Hepatozoon* sp. detectadas em roedores da espécie *Myodes glareolus* na Espanha (AY600626, AY600625).

Em estudo realizado na Eslováquia e República Checa, foram encontradas prevalências moleculares para *Hepatozoon* sp. de 9,38% (26/277) em *Myodes glareolus* e 0,28% (1/356) em *Apodemus flavicollis*. O sequenciamento de amplicons do gene 18S rRNA obtidos de amostras biológicas de *M. glareolus* revelou a presença de duas variantes genéticas

intimamente relacionadas, *Hepatozoon* sp. SK1 e *Hepatozoon* sp. SK2, as quais mostraram identidade de 99 a 100% com isolados de *Hepatozoon* spp. detectados em *M. glareolus* amostrados em outros países europeus (AY600626, JX644997, KJ649313, AY600625, JX644997). A sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de *Apodemus flavicollis* (*Hepatozoon* sp. SK3b) apresentou 99% de identidade com sequências de *Hepatozoon* spp. detectadas em répteis amostrados na África e Ásia (KF939627 e KC696569) (Hamšíková et al., 2016).

Wolf et al. (2016), ao amostrarem 42 roedores no Pantanal mato-grossense, encontraram 3 (7,14%) roedores da espécie *Calomys callosus* positivos para *Hepatozoon* sp.. As sequências obtidas mostraram-se filogeneticamente relacionadas a genótipos de *Hepatozoon* detectados em espécimes de *Bandicota indica* na Tailândia (AB181504) (99%), em *Abrothrix sanborni* no Chile (99%) e *Hepatozoon* sp. BV2 (AY600625) (98%) and *Hepatozoon* sp. BV1 (AY600626) (98%), detectados em espécimes de *Clethrionomys glareolus* amostrados na Espanha.

Em um estudo realizado em 2016 no município de Botucatu, no Estado de São Paulo, foram analisadas amostras de sangue de cães e sangue/tecido de roedores de uma área rural quanto à presença de *Hepatozoon* sp. Enquanto os cães apresentaram 66,45% (105/158) de positividade para *Hepatozoon* sp. em ensaios de PCR baseados no gene 18SrRNA, os roedores apresentaram 55,2% (37/67) de positividade na referida técnica. As sequências de *Hepatozoon* spp. obtidas dos cães mostraram 99-100% de identidade com sequências de *H. canis* depositadas no GenBank; já as sequências de *Hepatozoon* obtidas dos roedores apresentaram identidade de 99% com genótipos de *Hepatozoon* spp. detectados em roedores da Tailândia, Chile, Europa e do Mato Grosso (Brasil). As análises filogenéticas mostraram que as sequências de *Hepatozoon* spp. encontradas nos roedores são díspares daquelas de *H. canis* encontradas em cães (Demoner et al., 2016). Os autores concluíram que roedores provavelmente não participem da epidemiologia de *H. canis* na região estudada, mas atuariam como hospedeiros intermediários ou paratênicos para outras espécies de *Hepatozoon* sp. (Demoner et al., 2016).

A despeito da detecção molecular de *Hepatozoon* spp. em cães domésticos, canídeos selvagens, quatis, marsupiais e roedores no Pantanal

sul-matogrossense, DNA de *Hepatozoon* spp. não foi detectado em carrapatos e pulgas colhidos dos mamíferos amostrados (SOUSA et al., 2017). Adicionalmente, não foram detectados gamontes nos esfregaços sanguíneos dos roedores amostrados. No referido estudo, 22,72% (25/110) dos roedores capturados mostraram-se positivos para *Hepatozoon* sp. Enquanto que no protocolo de Perkins & Keller (2001) DNA de *Hepatozoon* sp. foi detectado em 8% e 1,2% das amostras biológicas de roedores das espécies *Oecomys marmorae* e *Thrichomys fosteri*, respectivamente, o agente foi detectado em 36% e 15,5% das amostras teciduais de roedores das mesmas espécies, respectivamente, pelo protocolo de Ujvari et al (2004). As sequências 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. detectadas em amostras de baço de *Thrichomys fosteri* mostraram 99% de identidade com *Hepatozoon* spp. detectado em uma serpente da espécie *Crotalus durissus terrificus* amostrada em Botucatu, Brasil (KC342523) e 97% de identidade com *H. fitzsimonsi* obtido de um réptil da espécie *Kinixys zombensis* amostrado na África do Sul (KR069084). As sequências de *Hepatozoon* spp. obtidas de *Oecomys marmorae* mostraram 99% de identidade com *Hepatozoon* spp. detectado em um réptil da espécie *Hemidactylus mabouia* amostrado na Paraíba, Brasil (KM234617) e 99% de identidade com *Hepatozoon* spp. detectado em um roedor da espécie *Oligoryzomys flavescens* amostrado em Botucatu, Brasil (KU667309). Dentre os roedores da espécie *T. fosteri*, três haplótipos diferentes de *Hepatozoon* foram encontrados ao se sequenciar um fragmento do gene 18S rRNA obtido pelo protocolo de Ujvari et al (2004). Já o alinhamento das sequências obtidas utilizando o protocolo de cPCR de Perkins e Keller (2001) mostrou a presença de quatro haplótipos. Haplótipos de *Hepatozoon* encontrados circulando em roedores selvagens na região do Pantanal sul-matogrossense apresentam um maior grau de polimorfismo quando comparados aos encontrados em canídeos e procionídeos na mesma região sob estudo. Segundo os autores, roedores provavelmente não participam como fonte de infecção de *Hepatozoon* para carnívoros selvagens e cães domésticos na área de estudo, embora possam desempenhar um papel importante na transmissão de *Hepatozoon* para répteis e anfíbios (Sousa et al., 2017).

Harris et al. (2017), ao investigarem a presença de DNA de *Hepatozoon* sp. em amostras de fígado de 43 roedores na África do Sul, encontraram

somente um animal positivo (*Gerbilliscus leucogaster*) (2,32%) para o referido agente. A sequência 18S rRNA detectada mostrou relação filogenética com outras sequências de *Hepatozoon* detectadas em répteis e marsupiais de outras localidades do mundo.

Em estudo realizado com 196 capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na Amazônia brasileira, foram obtidas prevalências moleculares diferentes para *Hepatozoon* spp. com base em dois protocolos de PCR empregados no estudo. Enquanto que no protocolo de Inokuma et al. (2002) foi obtida uma positividade de 5,64%, 40,8% dos roedores mostraram-se positivos para o referido agente com base no protocolo de Gomes et al. (2016). As sequências de *Hepatozoon* sp. obtidas de *H. hydrochaeris* compreendiam quatro haplótipos, apresentando identidade com sequências de *H. canis* e de *Hepatozoon cuestensis*, esta última obtida de *Crotalus durissus terrificus* no Brasil (Gomes et al., 2018).

Demoner et al. (2018), analisando 19 espécimes de *Akodon montensis*, encontrou 17 animais (85,5%) apresentando gametócitos de *Hepatozoon* sp. em esfregaços sanguíneos. As sequências 18SrRNA de *Hepatozoon* detectadas nesses roedores mostraram-se filogeneticamente próximas às sequências de *Hepatozoon* encontradas em outros roedores no Brasil e no mundo. As sequências de répteis, anfíbios e carnívoros formaram um clado distinto. No referido estudo, baseando-se na morfometria e filogenia, os autores concluíram que os roedores da espécie *Akodon montensis* estavam parasitados por uma nova espécie de *Hepatozoon*, nomeada *H. milleri*.

Diante desses dados, mais estudos são necessários nos diferentes biomas brasileiros a fim de agregar conhecimento à epidemiologia e diversidade genética de *Hepatozoon* spp. em roedores. Neste sentido, é essencial avaliar diferentes regiões geográficas e biomas brasileiros no que diz respeito à ocorrência de *Hepatozoon* e diversidade e estruturação genética de *Hepatozoon* spp. em roedores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo objetiva investigar a presença e a diversidade do DNA de *Hepatozoon* sp. em amostras de baço de roedores de vida livre de diversas regiões do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença e caracterizar o DNA de *Hepatozoon* spp. em amostras de baço de roedores;
- Traçar inferências filogenéticas das sequências 18SrRNA de *Hepatozoon* spp. de roedores com aquelas detectadas em outros hospedeiros;
- Avaliar o número e diversidade de haplótipos, diversidade de nucleotídeos e divergência de DNA de *Hepatozoon* spp. em diferentes espécies de roedores amostradas;
- Avaliar a estruturação genética de *Hepatozoon* spp. em roedores nos biomas brasileiros.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécies amostradas e área de estudo

As amostras de baço de roedores testadas no presente estudo foram obtidas no período de 2000 a 2012. Tais amostras foram colhidas em diferentes expedições científicas realizadas em diversas regiões do Brasil pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (LabTrip, IOC-FIOCRUZ) e demais colaboradores (em especial o Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – LBPMSR também do IOC).

Os pequenos mamíferos foram capturados utilizando armadilhas do tipo “live-traps” (modelos Tomahawk e Shermann), dispostas em transectos com estações de captura distribuídas a cada 10 metros. Em algumas das expedições, foi necessária a realização de eutanásia dos animais, normalmente para colheita de tecidos internos para identificação taxonômica, diagnóstico da infecção por parasitos ou preparo de material testemunho

conforme autorização do IBAMA. Nos casos em que era realizada a eutanásia, foram colhidos fragmentos de baço, os quais foram acondicionados em microtubos livres de DNase e RNase, adicionando-se em etanol absoluto para preservação do material. Tais amostras foram organizadas como uma coleção de fragmentos de baços – BAÇOTECA, a qual foi catalogada por número de registro, espécie de mamífero, data e localidade. Posteriormente, essas amostras foram armazenadas a - 20° C no LabTrip.

A identificação taxonômica dos roedores amostrados foi baseada inicialmente na morfologia externa e confirmada por análise cariotípica por técnicas citogenéticas e, quando necessário, pela análise da morfologia craniana (Bonvicino et al.,2008). A identificação dos roedores foi realizada pela equipe de mastozoólogos do LBPMRS (IOC-Fiocruz). Dentre um total de mais de 3300 fragmentos de tecidos armazenados na coleção, foram selecionados de modo aleatório 472 amostras, as quais foram colhidas em cinco biomas (Figura 4).

Todas as colheitas foram realizadas seguindo autorização do IBAMA e aprovadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da FIOCRUZ (P0007-99; P0179-03; P0292/06; L0015-07).

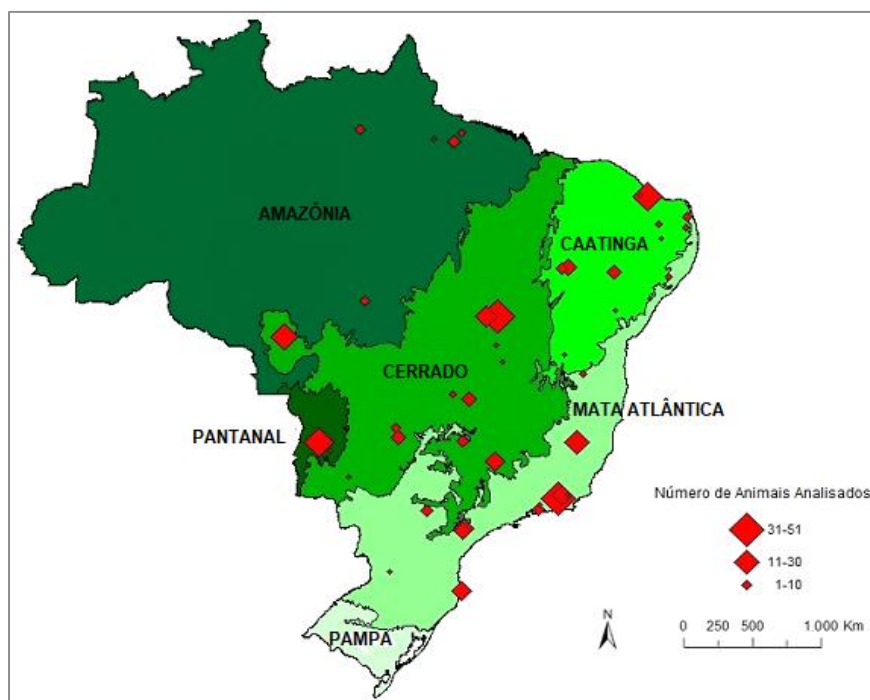


Figura 4. Distribuição dos roedores capturados (n=472) em cinco biomas brasileiros.

4.2. Extração de DNA das amostras de tecido esplênico de roedores

A extração de DNA de tecido esplênico (10 mg) foi realizada com o DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi então identificado e armazenado a -20°C para realização da PCR. A fim de assegurar a qualidade da extração de DNA a partir do tecido esplênico, uma amostra controle (água ultra-pura esterilizada) (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) foi extraída simultaneamente (a cada 30 amostras) com as amostras a serem analisadas.

A quantificação de material genômico total, bem como a mensuração das relações 260/280 e 260/230 do produto extraído, foram realizadas em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific), por meio da leitura da absorbância de cada amostra.

4.3. Controle endógeno da PCR

Com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos em virtude da presença de inibidores, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR convencional (cPCR) objetivando a amplificação de um fragmento de 227pb do gene *irbp* de mamíferos (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”) (controle endógeno da reação). Nestes ensaios de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: IRBPfwd: 5'-TCCAACACCACCACTGAGATCTGGAC-3' e IRBPrev: 5'-GTGAGGAAGAAATCGGACTGGCC-3'. As condições da PCR para amplificação do gene *irbp* foram: desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72 °C por 5 minutos (Ferreira, 2010). Posteriormente, todas as amostras negativas na cPCR supracitada foram submetidas à cPCR adicional dirigida para um fragmento de aproximadamente 450 pb do gene *gapdh* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'- CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'). O ensaio de amplificação foi realizado utilizando uma reação de volume total final de 25µL,

contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,5 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. Os ciclos de amplificação foram de: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos (Birkenheuer et al., 2003).

4.4 Reações de Amplificação para *Hepatozoon* spp.

Foram realizadas duas reações de cPCR para *Hepatozoon* spp. com o objetivo de amplificar diferentes regiões do gene 18SrRNA, seguindo os protocolos estabelecidos por Perkins and Keller (2001) e Ujvari et al. (2004). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na cPCR baseada no protocolo estabelecido por Ujvari et al. (2004) foram: HepF300 (5' GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACG 3') e Hep900 (5' CAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC 3'), os quais amplificam um fragmento de 600 pb. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Ujvari et al. (2004) com algumas modificações. O ensaio de amplificação foi realizado utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,5 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos.

O protocolo estabelecido por Perkins and Keller (2001) foi realizado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HEMO1 (5' TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG 3') e HEMO2 (5' CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC 3'), os quais amplificam um fragmento de 900pb. A técnica da PCR foi realizada conforme descrita por Perkins and Keller (2001) com algumas modificações. O ensaio de amplificação foi realizado utilizando uma reação de volume total final de 25µL, contendo uma mistura de 5µL do DNA-amostra, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo, 0,3µM de

cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,5 U de Taq DNA Polimerase, tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. A seqüência térmica e de tempo de amplificação foram de: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 48°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72°C durante 7 minutos.

4.5. Purificação e quantificação dos amplímeros

Após os ensaios de cPCR, foi realizada purificação dos produtos amplificados utilizando-se o kit “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas, São Paulo-SP), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de material genômico total do produto purificado foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®), por meio da leitura da absorbância de cada amostra. Somente amplicons com bandas de alta intensidade no gel de agarose foram submetidos à purificação e posterior sequenciamento.

4.6. Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado através de técnica automatizada baseada no método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados na reação de PCR. 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). Desta forma, utilizou-se 3,5µL do Tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂), 0,5µL de Big Dye e 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra pura e 1,5µL de DNA, sendo esta quantidade estimada pela verificação de intensidade das bandas em gel de agarose 2,0%. As amplificações foram realizadas inicialmente no 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 agente) e extensão a 60°C por 4 minutos e mantida a 4°C por tempo indeterminado. O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM

3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO - FCAV - UNESP).

4.7 Análise das Sequências e construção de árvores filogenéticas

Primeiramente, realizou-se análise dos eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada utilizando o software Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) e o pacote de softwares *Phred/Phrap/Consed* (Ewing et al., 1998; Ewing e Green, 1998; Gordon et al., 1998). O programa BLAST (Altschul et al., 1990) foi utilizado a fim de se comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (Benson et al., 2002). Posteriormente, as sequências salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do banco de dados (Genbank), utilizando o software Mafft (Katoh et al. 2017) e editados via Bioedit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em modo Nexus, Phylip e Mega pelo site Alignment Transformation Environment (Glez-Peña et al., 2010).

A partir das matrizes de alinhamento das sequências foram realizadas análises de máxima verossimilhança utilizando o cluster Blackbox RaxML (Stamatakis et al., 2008) e análise Bayesiana utilizando o software MrBayes 3.2.2 no XSEDE (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) via portal CIPRES (Miller et al., 2010). A análise Bayesiana foi realizada com 10^4 gerações e números de classes de substituição variando conforme o modelo evolutivo encontrado para cada conjunto de dados. O modelo evolutivo “*best of it*” foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (Darriba et al., 2012; Guindon e Gascuel, 2003). Os suportes dos clados para as análises de máxima verossimilhança e máxima parcimônia foram avaliados através de análises de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) de 1000 repetições. A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (Stover e Muller, 2010).

4.8 Diversidade genética de *Hepatozoon* spp.

O alinhamentos das sequências dos genes 18SrRNA de *Hepatozoon* amplificadas no presente estudo foram utilizados para calcular a diversidade de

nucleotídeos (P_i), nível de polimorfismos (diversidade de haplótipos [hd], número de haplótipos [h] e a média de diferenças nucleotídicas [k]), utilizando o software DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009). Adicionalmente, as sequências foram submetidas a construção de rede de haplótipos pelo software TCS v.1.21 com 95% de *threshold* (Clement et al., 2000).

4.9 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Para avaliar a diversidade na estrutura genética populacional, foi empregada a análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) através de seus índices (Excoffier et al., 1992) utilizando o software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). Os grupos utilizados para essa análise foram estabelecidos de acordo com os agrupamentos observados na rede haplotípica gerada pelo software TCS v.1.21 (Clement et al., 2000).

4.10 Genealogias

As genealogias das sequências de nucleotídeos foram inferidas por análises de *Network* utilizando o programa *Splitstree* v4.11.3 (Huson E Bryant, 2006). Foi utilizado o método de “Neighbor-net” e os valores de suporte foram estimados com a realização de 100 replicatas de “bootstrap”.

5. RESULTADOS

5.1 Qualidade das amostras de DNA extraídas a partir de tecido esplênico de roedores

Dentre as 472 amostras de baço de roedores analisadas, 462 (97,88%) mostraram-se positivas na amplificação de um fragmento do gene *irbp* (controle endógeno da reação) (**ANEXO 1**). Todas as amostras negativas para o gene *irbp* também o foram ao gene *gapdh*. Estas amostras foram excluídas das análises moleculares subsequentes. As médias de concentração de DNA por microlitro e relações 260/280 e 260/230 foram de 154,10 ng/ μ L, 1,95 e 2,40 respectivamente (**ANEXO 1**). A **Figura 5** mostra a eletroforese em gel agarose de produtos amplificados na cPCR baseada no gene *irbp* (fragmento de 227 pb).

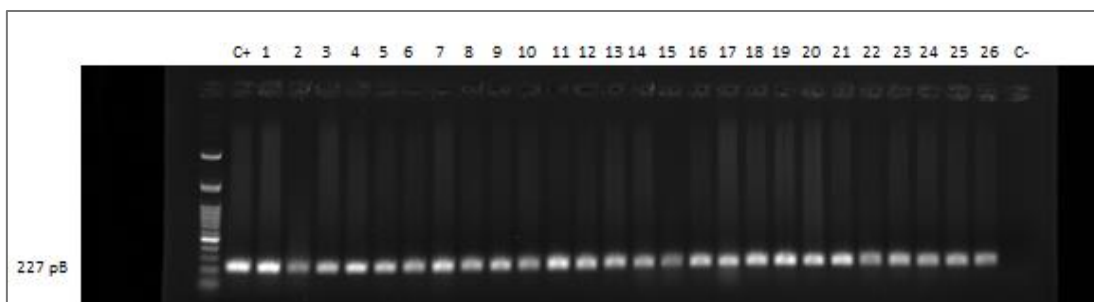


Figura 5. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à cPCR para o controle endógeno (gene *irbp*). Primeira canaleta: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA de *Akodon* sp.); canaletas 1-26: amostras de DNA de roedores; canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.2 Detecção molecular de *Hepatozoon* spp. em amostras de tecido esplênico de roedores

Dos 462 roedores, 195 (42,2%) mostraram-se positivos para *Hepatozoon* spp. com base no protocolo de Perkins and Keller (2001) e/ou Ujvari 2004, baseados no gene 18S rRNA. Enquanto 69 (14,93%) amostras de baço de roedores mostraram-se positivas no protocolo de PCR de Perkins and Keller (2001), 172 (37,22%) mostraram-se positivas no protocolo descrito por Ujvari et al. (2004) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Número total e espécies de roedores positivas para *Hepatozoon* sp. seguindo os protocolos de Perkins and Keller (2001) e Ujvari et al., (2004) baseados no gene 18SrRNA, de acordo com as espécies de roedores e respectivos estados e biomas de origem.

Bioma/Estados	Total de Roedores amostrados por bioma	Espécies amostradas	Número de amostras positivas Perkins e Keller (2001)	Espécies de roedores positivas Perkins e Keller (2001)	Número de amostras positivas Ujvari et al. (2004)	Espécies de roedores positivas Ujvari et al. (2004)
Caatinga Piauí, Ceará, Bahia, Rio Grande do Norte	80	<i>Galea spixxi</i> : 19 <i>Mus musculus</i> : 5 <i>Necromys lasiurus</i> : 1 <i>Rattus rattus</i> : 12 <i>Rhipidomys macrurus</i> : 7 <i>Thrichomys laurentius</i> : 28 <i>Thrichomys inermis</i> : 7 <i>Wiedomys cerradensis</i> : 1	11	<i>Galea spixxi</i> : 4 <i>Rattus rattus</i> : 1 <i>Thrichomys laurentius</i> : 2 <i>Thrichomys inermis</i> : 3 <i>Wiedomys cerradensis</i> : 1	28	<i>Galea spixxi</i> : 6 <i>Mus musculus</i> : 2 <i>Necromys lasiurus</i> : 1 <i>Rattus rattus</i> : 4 <i>Rhipidomys macrurus</i> : 2 <i>Thrichomys laurentius</i> : 9 <i>Thrichomys inermis</i> : 3 <i>Wiedomys cerradensis</i> : 1
Mata Atlântica São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina	122	<i>Akodon</i> sp.: 6 <i>Akodon montensis</i> : 35 <i>Akodon cursor</i> : 11 <i>Bucepattersonius iheringi</i> : 1 <i>Calomys tener</i> : 8 <i>Coendou</i> sp.: 2 <i>Delomys dorsalis</i> : 8 <i>Euryoryzomys russatus</i> : 11 <i>Guerlinguetus brasiliensis</i> : 1 <i>Mus musculus</i> : 3 <i>Necromys lasiurus</i> : 2 <i>Nectomys squamipes</i> : 3 <i>Oligoryzomys nigripes</i> : 16 <i>Oligoryzomys flavescens</i> : 3 <i>Oxymycterus</i> sp.: 4 <i>Oxymycterus dasythricus</i> : 2	36	<i>Akodon cursor</i> : 6 <i>Akodon montensis</i> : 19 <i>Delomys dorsalis</i> : 2 <i>Euryoryzomys russatus</i> : 2 <i>Mus musculus</i> : 1 <i>Necromys lasiurus</i> : 2 <i>Oligoryzomys nigripes</i> : 4	51	<i>Akodon cursor</i> : 10 <i>Akodon montensis</i> : 17 <i>Akodon</i> sp.: 1 <i>Calomys tener</i> : 2 <i>Delomys dorsalis</i> : 2 <i>Euryoryzomys russatus</i> : 3 <i>Mus musculus</i> : 2 <i>Oligoryzomys nigripes</i> : 8 <i>Nectomys squamipes</i> : 2 <i>Trinomys dimidiatus</i> : 3 <i>Trinomys gratus bonafidei</i> : 1

			<i>Trinomys dimidiatus</i> : 4 <i>Trinomys graciosus bonafidei</i> : 1 <i>Sooretamys angouya</i> : 1			
Pantanal Mato Grosso do Sul	53	2	<i>Holochilus chacarius</i> : 3 <i>Calomys expulsus</i> : 1 <i>Thrichomys fosteri</i> : 16 <i>Necomys lasiurus</i> : 6 <i>Clyomys laticeps</i> : 20 <i>Oecomys marmorae</i> : 2 <i>Nectomys rattus</i> : 2 <i>Nectomys squamipes</i> : 3	18	<i>Calomys expulsus</i> : 1 <i>Thrichomys fosteri</i> : 1	<i>Calomys expulsus</i> : 1 <i>Thrichomys fosteri</i> : 7 <i>Necomys lasiurus</i> : 2 <i>Clyomys laticeps</i> : 4 <i>Nectomys rattus</i> : 2 <i>Nectomys squamipes</i> : 2
Cerrado Minas Gerais, Goiás	89	3	<i>Akodon lindberghi</i> : 2 <i>Akodon montensis</i> : 4 <i>Calomys cerqueirae</i> : 3 <i>Calomys expulsus</i> : 1 <i>Calomys tener</i> : 1 <i>Cavia</i> sp.: 1 <i>Cerradomys maracajuensis</i> : 1 <i>Cerradomys marinhos</i> : 2 <i>Cerradomys scotti</i> : 1 <i>Cerradomys</i> sp.: 1 <i>Cerradomys subflavus</i> : 1 <i>Gracilinanus agilis</i> : 2 <i>Hylaeamys megacephalus</i> : 4 <i>Necomys lasiurus</i> : 17 <i>Nectomys rattus</i> : 6 <i>Nectomys squamipes</i> : 5 <i>Oecomys catherinae</i> : 1 <i>Oecomys bicolor</i> : 2 <i>Oecomys</i> sp.: 2 <i>Oligoryzomys nigripes</i> : 10	19	<i>Oecomys bicolor</i> : 1 <i>Oligoryzomys nigripes</i> : 2	<i>Cerradomys marinhos</i> : 1 <i>Necomys lasiurus</i> : 4 <i>Necomys squamipes</i> : 2 <i>Nectomys rattus</i> : 1 <i>Oligoryzomys nigripes</i> : 3 <i>Rhipidomys macrurus</i> : 4 <i>Thrichomys apereoides</i> : 4

				<i>Oxymycter delator</i> : 2 <i>Rhipidomys macrurus</i> : 9 <i>Thrichomys apereoides</i> : 10			
				<i>Zygodontomys</i> sp.: 3 <i>Thrichomys inermis</i> : 1 <i>Rhipidomys</i> sp.: 1 <i>Rhipidomys macrurus</i> : 1 <i>Rattus rattus</i> : 10 <i>Proechimys</i> sp.: 1 <i>Proechimys roberti</i> : 5 <i>Proechimys cuvieri</i> : 8 <i>Proechimys goeldii</i> : 3 <i>Oligoryzomys</i> sp.: 3 <i>Oligoryzomys moojeni</i> : 3 <i>Oligoryzomys mottogrossae</i> : 3 <i>Oecomys catherinae</i> : 2 <i>Necromys lenguarum</i> : 14 <i>Necromys lasiurus</i> : 11 <i>Mus musculus</i> : 2 <i>Hylaeamys megacephalus</i> : 16 <i>Cerradomys akroai</i> : 4 <i>Calomys</i> sp. : 8 <i>Calomys expulsus</i> : 17 <i>Calomys callidus</i> : 12			
Amazônia Tocantins, Pará, Mato Grosso	128		17			56	<i>Zygodontomys</i> sp.: 1 <i>Thrichomys inermis</i> : 1 <i>Rhipidomys</i> sp.: 1 <i>Rattus rattus</i> : 3 <i>Proechimys</i> sp.: 1 <i>Proechimys roberti</i> : 2 <i>Proechimys cuvieri</i> : 2 <i>Oligoryzomys</i> sp.: 3 <i>Oligoryzomys moojeni</i> : 3 <i>Oligoryzomys mottogrossae</i> : 2 <i>Oecomys catherinae</i> : 1 <i>Necromys lenguarum</i> : 5 <i>Necromys lasiurus</i> : 2 <i>Mus musculus</i> : 2 <i>Hylaeamys megacephalus</i> : 8 <i>Cerradomys akroai</i> : 4 <i>Calomys</i> sp.: 3 <i>Calomys expulsus</i> : 10 <i>Calomys callidus</i> : 2

Dezessete amplicons (17/69- 24,63%) obtidos pelo protocolo de Perkins and Keller (2001) foram encaminhados ao sequenciamento, com base na qualidade da banda avaliada em gel de agarose. As sequências de *Hepatozoon* spp. (18SrRNA) obtidas de amostras de baço de sete roedores (MG925078, MG925080, MG925082, MG925083, MG925086, MG925087, MG925091) mostraram 99-100% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* spp. obtida de um réptil da espécie *Tarentola deserti* (KU680460) amostrado na África, utilizando o software BLAST. Oito sequências (MG925079, MG925081, MG925084, MG925085, MG925089, MG925092, MG925093, MG925094) mostraram 100% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* spp. obtida de um carrapato da espécie *Amblyomma fuscum* (KU955319), coletado em um espécime de *Akodon montensis* em Santa Catarina, sul do Brasil. Uma sequência (MG925090) mostrou 99% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de um roedor da espécie *Oecomys marmorae* (KX776332) amostrado no Pantanal brasileiro. Por fim, uma sequência (MG925088) mostrou 99% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de um jacaré *Caiman crocodilus* (MF322539) coletado no Pantanal, Brasil (**Tabela 3**).

Tabela 3. Máxima porcentagem de identidade verificada pelo programa BLAST® para sequências de DNA de *Hepatozoon* spp. obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelo protocolo de Perkins and Keller (2001). Todas as sequências apresentaram 100% de *query coverage*.

Hospedeiro e número de acesso	Estado/Bioma	Máxima porcentagem de identidade pelo BLAST	Hospedeiro e localidade de origem
<i>Akodon cursor</i> (MG925078)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460) – Marrocos
<i>Akodon cursor</i> (MG925079)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Amblyomma fuscum</i> (KU955319) – Santa Catarina/Brasil
<i>Galea spixii</i> (MG925080)	Bahia (Caatinga)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460) – Marrocos
<i>Akodon montensis</i>	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Amblyomma fuscum</i> (KU955319) – Santa

(MG925081, MG925084, MG925085)	Catarina/Brasil		
Akodon montensis (MG925082)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460) – Marrocos
Akodon cursor (MG925083)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460) – Marrocos
Galea spixii (MG925086)	Ceará (Caatinga)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460)- Marrocos
Delomys dorsalis (MG925087)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. <i>Tarentola deserti</i> (KU680460)- Marrocos
Akodon montensis (MG925088)	São Paulo (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Amblyomma fuscum</i> (KU955319) – Santa Catarina/Brasil
Necromys lenguarum (MG925091)	Mato Grosso (Amazônia)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460)- Morocco
Calomys callidus (MG925092)	Mato Grosso (Amazônia)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Amblyomma fuscum</i> (KU955319) – Santa Catarina/Brasil
Akodon montensis (MG925093, MG925094)	Santa Catarina (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Amblyomma fuscum</i> (KU955319) – Santa Catarina/Brasil
Akodon montensis (MG925089)	São Paulo (Mata Atlântica)	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Oecomys mamorae</i> (KX776332) – Pantanal/Brasil
Akodon montensis (MG925090)	São Paulo (Mata Atlântica)	99%	<i>Hepatozoon</i> <i>caiman</i> - <i>Caiman crocodilo yacare</i> (MF322539) – Pantanal Brasil

Entre as 17 sequências analisadas, 14 obtiveram um bom alinhamento e foram utilizadas para análise de haplótipos (alinhamento de 185pb). Por meio do software DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009), foram identificados dois haplótipos, sendo a diversidade de haplótipos (hd) = 0,1538 e número de sítios variáveis (S) = 2.

A análise filogenética Bayesiana do gene 18S rRNA utilizando o modelo evolutivo TPM2+F+G4 agrupou as sequências em três grandes clados, a saber: i.) um clado de sequências de *Hepatozoon* spp. de roedores e répteis; ii.) um clado agrupando sequências de *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon* sp. detectadas em canídeos domésticos e selvagens; iii.) um clado reunindo sequências de *Hepatozoon americanum* e *Hepatozoon* spp. detectados em felídeos domésticos e selvagens, roedores e canídeos. Foram utilizadas como grupos externos três sequências de hemogregarinas (**Figura 6**). Os clados apresentaram um alto suporte estatístico. A análise filogenética pelo método de

Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 600pb utilizando o modelo evolutivo TPM2+F+G4 apresentou topologia semelhante àquela descrita para a análise Bayesiana (**Figura 7**).

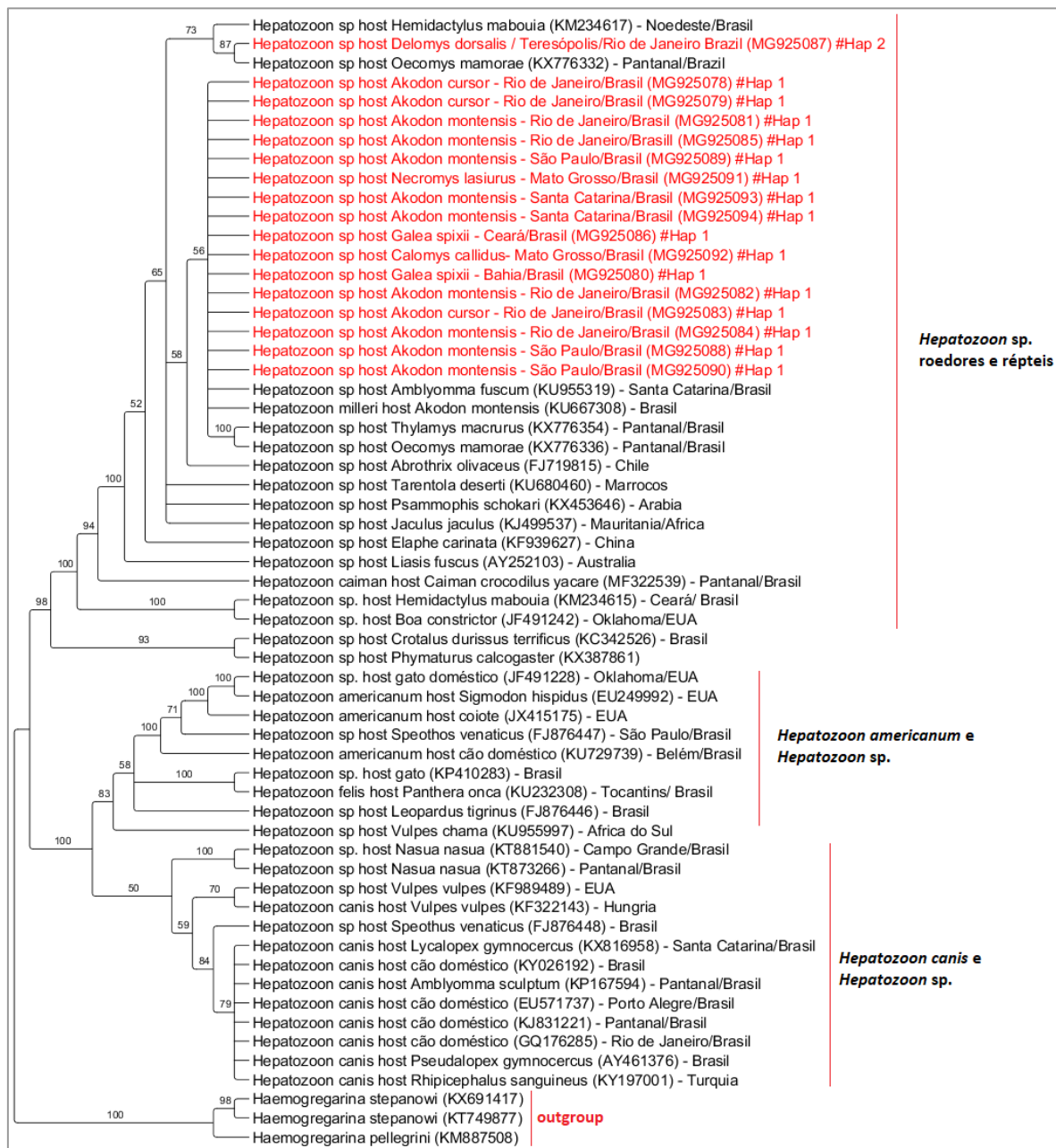


Figura 6. Posicionamento filogenético das sequências de *Hepatozoon* sp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 800pb (protocolo de Perkins and Keller 2001), utilizando o modelo evolutivo TPM2+F+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As

sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos estados.

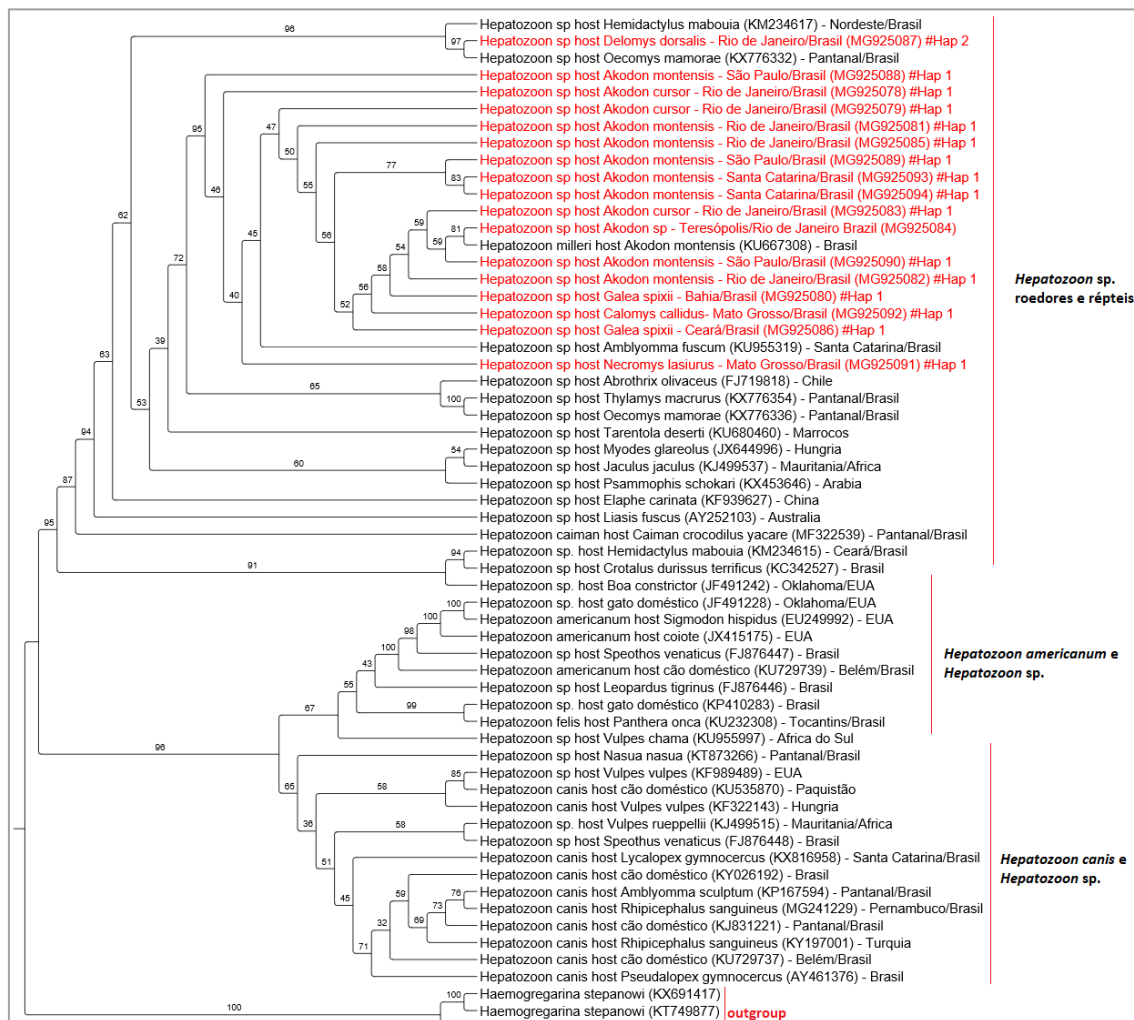
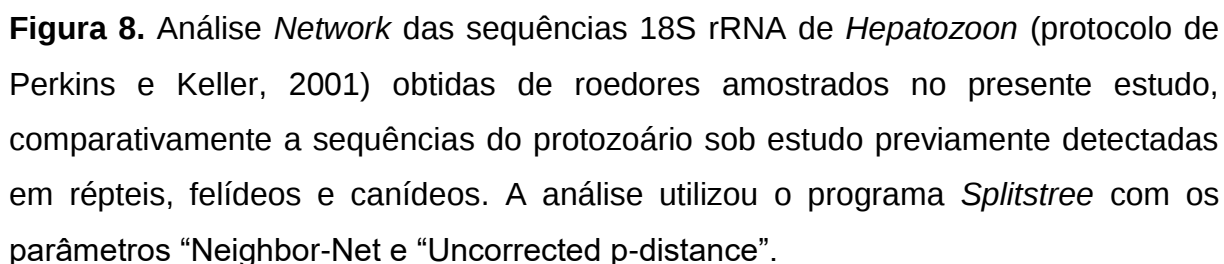


Figura 7. Posicionamento filogenético das sequências de *Hepatozoon* sp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 800pb (protocolo de Perkins and Keller, 2001), utilizando o modelo evolutivo TPM2+F+G4. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos estados.



Das 172 amostras positivas na PCR para *Hepatozoon* spp. segundo protocolo de Ujvari et al. (2004), 19 amplicons (11,04%) foram enviados ao sequenciamento, com base na qualidade da banda avaliada em gel de agarose. As sequências de *Hepatozoon* spp. (18S rRNA) obtidas de amostras

de baço de 16 roedores (MH111405, MH111406, MH111407, MH111408, MH111409, MH111410, MH111411, MH111412, MH111413, MH111415, MH111416, MH111417, MH111419, MH111420, MH111422, MH111423) mostraram 99-100% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de um roedor da espécie *Akodon* sp. (KU667308) capturado na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, utilizando o software BLAST (**Tabela 4**). Uma sequência (MH111418) mostrou 100% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de uma serpente da espécie *Psammophis schokari* (KX453646) capturada em Omã, na costa sudeste da Península Arábica. Uma amostra (MH111404) mostrou 100% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de uma serpente *Phymaturus calcogaster* (KX387861) amostrada na Espanha. Por fim, (MH111421) mostrou 100% de identidade com *Hepatozoon* sp. detectado em um roedor *Thylamys macrurus* (KX776354) amostrado no Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil (**Tabela 4**).

Tabela 4. Máxima porcentagem de identidade verificada pelo programa BLAST® para sequências de DNA de *Hepatozoon* spp. obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelo protocolo de Ujvari et al. (2004). Todas as sequências apresentaram 100% de *query coverage*.

Hospedeiro e número de acesso	Estado/Bioma	Máxima porcentagem de identidade pelo BLAST	Hospedeiro e localidade de origem
<i>Akodon cursor</i> (MH111404, MH111406, MH111409, MH111413, MH111422, MH111423)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil
<i>Akodon cursor</i> (MH111405)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Phymaturus calcogaster</i> (KX387861) - Espanha <i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Thylamys macruru</i> (KX776354) - Brasil – Pantanal
<i>Galea spixii</i> (MH111407)	Bahia (Caatinga)	100%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil
<i>Akodon montensis</i> (MH111408, MH111410, MH111411, MH111412)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil

<i>Galea spixii</i> (MH111415)	Ceará (Caatinga)	100%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil
<i>Akodon montensis</i> (MH111416, MH111417)	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	100%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil
<i>Rhipidomys macrurus</i> (MH111418)	Goiás (Cerrado)	98%	<i>Hepatozoon</i> sp CN8365 - <i>Psammophis schokari</i> (KX453646) – Arábia
<i>Calomys callidus</i> (MH111420)	Mato Grosso (Amazônia)	99%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil
<i>Necomys lasiurus</i> (MH111419)	Mato Grosso (Amazônia)	99%	<i>Hepatozoon milleri</i> (KU667308) – <i>Akodon montensis</i> - Botucatu –SP, Brasil
<i>Calomys expulsus</i> (MH111421)	Tocantins (Amazônia)	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Thylamys macrurus</i> (KX776354)- Brasil-Pantanal

Entre as 19 sequências obtidas, foi possível analisar a diversidade de haplótipos em 17 sequências devido à qualidade do alinhamento (277pb). Foram identificados cinco haplótipos, sendo a diversidade de nucleotídeos (P_i)= 0,00453, diversidade de haplótipos (h_d) = 0,426 e número de sítios variáveis (S) = 9, utilizando o software DnaSP v5 (Librado e Rozas, 2009) (**Tabela 5**) e a rede de haplótipos foi gerada pelo software TCS v.1.21 (Clement et al., 2000). O haplótipo #1 foi representado por 13 sequências (detectadas em roedores nos estados São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará), haplótipo #2 com uma sequência (São Paulo), haplótipo #3 com uma sequência (Mato Grosso), haplótipo #4 com uma sequência (Mato Grosso) e haplótipo #5 com uma sequência (Goiás) (**Figura 9**). O haplótipo #1 foi o mais distribuído geograficamente e atinge maior número de roedores.

Tabela 5. Polimorfismos e diversidade de sequências 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. (protocolo de Ujvari et al., 2004) obtidas em amostras de baço de roedores amostrados em cinco biomas brasileiros.

Gene	PB	N	SV	h	GC%	h_d (Média $\pm$ DP)	P_i (Média $\pm$ DP)	K
18S	276	17	9	5	0,319	0,426 $\pm$ 0,147	0,00453 $\pm$ 0,00250	1,25

NS, número de sequências analisadas; PB, tamanho do alinhamento; N, número de sequências analisadas; SV, número de sítios variáveis; h, número de haplótipos; GC, conteúdo

de G+C; hd, diversidade de haplótipos; Pi, diversidade de nucleotídeos; K, número médio de diferenças

Tabela 6. Alinhamento das sequências de *Hepatozoon* spp. de roedores obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelo protocolo de Ujvari et al. (2004) mostrando os sítios variáveis.

	Posição no alinhamento								
Número de acesso	195	198	201	202	224	238	250	258	275
MH111406	A	A	A	A	C	C	T	C	T
MH111405	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111408	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111412	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111413	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111417	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111410	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111423	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111411	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111422	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111407	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111409	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111415	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MH111420	.	.	.	.	T	.	.	.	.
MH111419	.	.	.	.	T	.	A	.	.
MH111422	.	.	.	.	.	T	.	.	.
MH111418	C	G	G	G	T	.	.	T	A

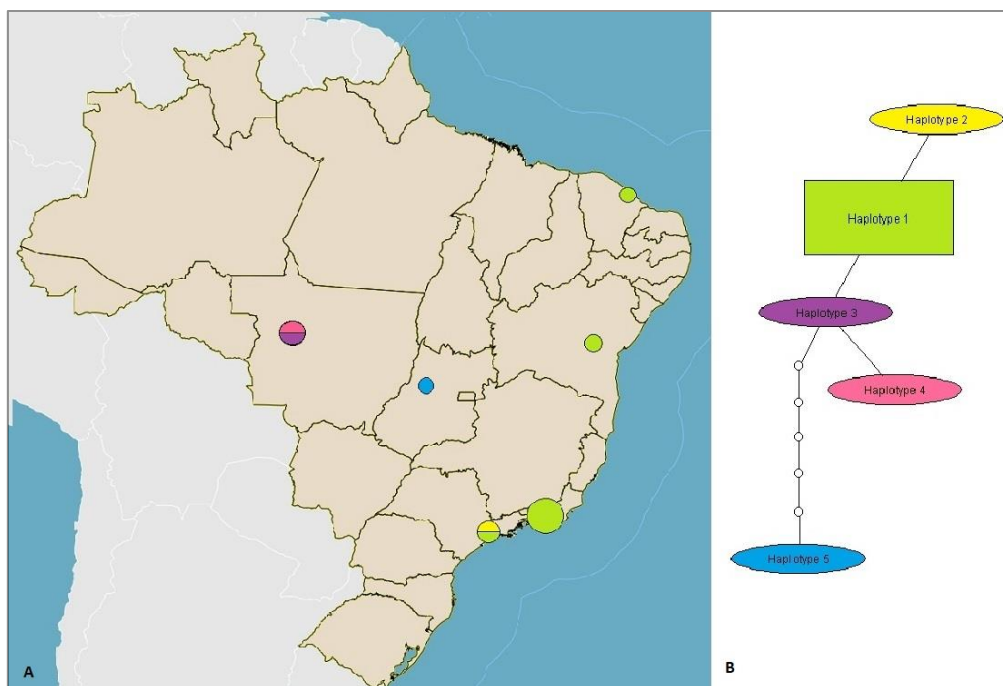


Figura 9. Distribuição **(A)** e rede de haplótipos **(B)** 18S rRNA de *Hepatozoon* detectados em roedores amostrados nos diferentes biomas brasileiros.

Tabela 7. Relação, frequência e alocação de haplótipos 18S rRNA de *Hepatozoon* de roedores no respectivo agrupamento da rede haplotípica (**Figura 9**) dos indivíduos amostrados nos diferentes estudos brasileiros.

Haplótipo	Frequência	Indivíduos que contêm o haplótipo
1	13	MH111406, MH111405, MH111408, MH111412, MH111413, MH111410, MH111423, MH111411, MH111422, MH111409 (Rio de Janeiro)
		MH111407(Bahia)
		MH111415 (Ceará)
		MH111417 (São Paulo)
		MH111416 (São Paulo)
2	1	MH111420 (Mato Grosso)
3	1	MH111419 (Mato Grosso)
4	1	MH111418 (Goiás)

A análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 600pb utilizando modelo evolutivo TIM1+I+G agrupou as sequências em três grandes clados, a saber: **i.)** um clado agrupando sequências de *Hepatozoon* spp. obtidas em roedores e répteis; **ii.)** um clado reunindo sequências de *H. canis* e *Hepatozoon* spp. detectados em canídeos domésticos e selvagens; **iii.)** um clado agrupando sequências de *H. americanum* e *Hepatozoon* spp. detectados em felídeos domésticos e selvagens, quatis e canídeos. Os clados apresentaram suporte estatístico considerável (acima de 85) (**Figura 10**). Foram utilizadas como grupos externos três sequências de hemogregarinas. A análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 600pb utilizando o modelo evolutivo TIM1+I+G apresentou topologia semelhante àquela descrita para a análise Bayesiana (**Figura 11**).

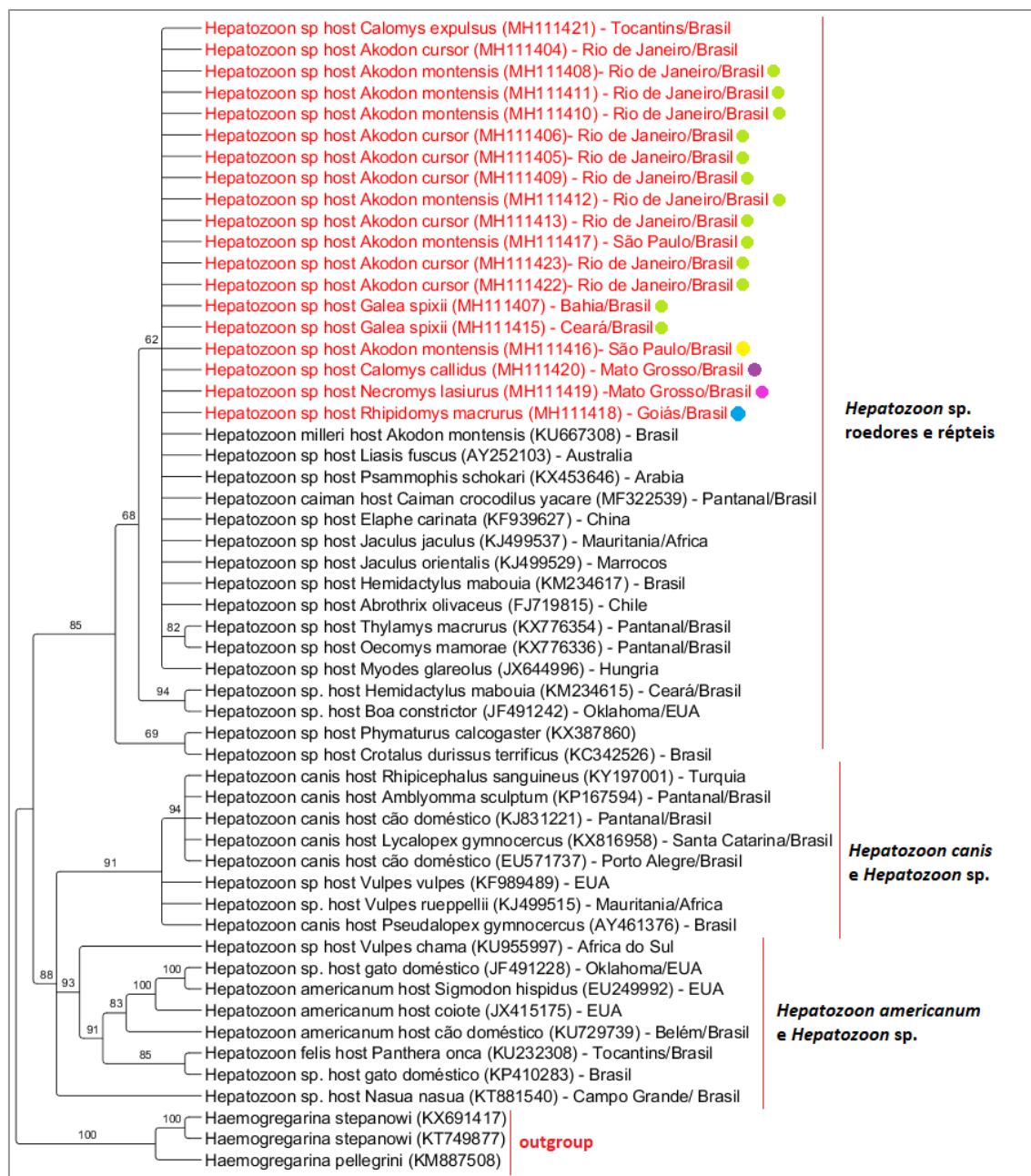


Figura 10. Posicionamento filogenético das sequências de *Hepatozoon* spp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 600pb (protocolo de Ujvari et al. 2004) utilizando o modelo evolutivo TIM1+I+G. Os números na árvore indicam valores de suporte de clado para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho.

A análise de distância realizada com o software *Splitstree* (HUSON e BRYANT 2006) (**Figura 12**) das sequências 18S rRNA de *Hepatozoon* obtidas de amostras de baço de roedores pelo protocolo de Ujvari et al. (2004) revelou que as sequências do presente estudo foram agrupadas em um grupo com sequências de outros roedores do Brasil e do mundo, próximas às sequências de répteis. As sequências de *Hepatozoon* obtidas de felídeos e canídeos formaram grupos distintos dos grupos de roedores, porém próximas a duas sequências de répteis (KC342525 e KX453608).

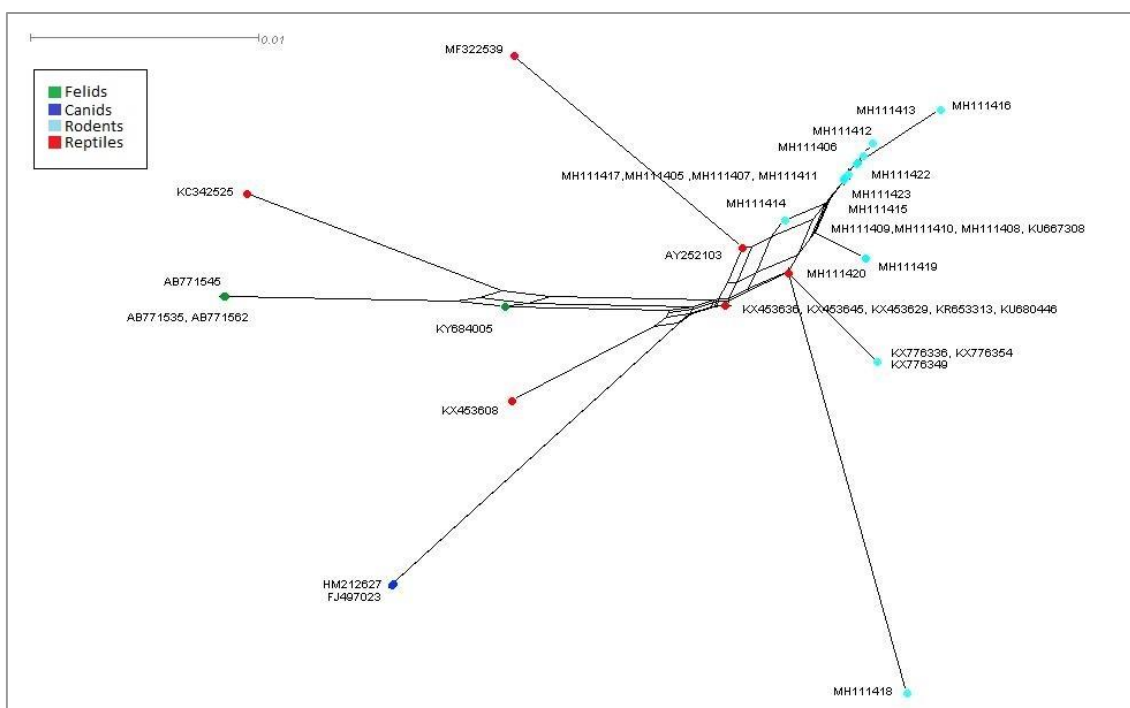


Figura 12. Análise *Network* das sequências 18S rRNA de *Hepatozoon* (protocolo de Ujvari et al., 2004) obtidas de roedores amostrados no presente estudo, comparativamente a sequências dos protozoários sob estudo previamente detectadas em répteis, felídeos e canídeos. A análise utilizou o programa *Splitstree* com os parâmetros “Neighbour-Net e “Uncorrected p-distance”.

Das sequências obtidas no sequenciamento, nove correspondiam aos amplicons obtidos de um mesmo hospedeiro pelos dois protocolos de PCR baseados no gene 18S rRNA, sendo então utilizadas na análise filogenética concatenada dos dois fragmentos (800 pb e 600 pb). Essa análise mostrou resultados semelhantes às análises dos fragmentos separados, dividindo as sequências nos três grandes clados previamente descritos (**Tabela 6**). Todas as sequências mostraram 99-100% de identidade com uma amostra de *Hepatozoon* sp. obtida de um carrapato do gênero *Ixodes* amostrado no Chile (MH174345), utilizando o software BLAST. As sequências concatenadas obtidas de um espécime de *Akodon* sp. amostrado no Rio de Janeiro e de um exemplar de *Galea spixii* amostrado no Ceará também mostraram 99% de identidade para uma sequência de *Hepatozoon* sp. detectada em um espécime

de *Tarentola deserti* no Marrocos (KU680460). Duas sequências detectadas em espécimes de *Akodon montensis* capturado no estado de São Paulo e *Calomys* sp. capturado no estado do Mato Grosso também mostraram 100% e 99% de identidade com uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de um marsupial (*Abothrix olivaceus*) capturado no Chile (FJ719818), respectivamente. Uma sequência de *Hepatozoon* sp. obtida de *Necomys lasiurus* amostrado no estado do Mato Grosso mostrou 99% de identidade com *Hepatozoon* sp. detectado em um réptil (*Elaphe carinata*) na China (KF939627). Uma sequência de *Hepatozoon* sp. detectada em um espécime de *Akodon montensis* capturado no estado de São Paulo mostrou 100% de identidade com sequência de *Hepatozoon caimani* obtida de um jacaré (*Caiman crocodilos*) amostrado no Pantanal, Brasil (MF435048).

Tabela 8. Máxima porcentagem de identidade verificada pelo programa BLAST® para sequências concatenadas de DNA de *Hepatozoon* spp. obtidas a partir de ensaios de cPCR baseados no gene 18S rRNA pelos protocolo de Ujvari et al. (2004) e Perkins and Keller (2001). Todas as sequências apresentaram 100% de *Query coverage*

Hospedeiro	Estado/Bioma	E-value	Máxima porcentagem de identidade pelo BLAST	Hospedeiro e localidade de origem
<i>Akodon</i> sp.	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	0.0	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile
<i>Galea spixii</i>	Bahia (Caatinga)	0.0	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile
<i>Akodon</i> sp.	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	0.0	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile
<i>Akodon</i> sp.	Rio de Janeiro (Mata Atlântica)	0.0	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile <i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460)- Marrocos
<i>Galea spixii</i>	Ceará (Caatinga)	0.0	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile
			99%	<i>Hepatozoon</i> sp. - <i>Tarentola deserti</i> (KU680460)- Marrocos
<i>Akodon montensis</i>	São Paulo (Mata Atlântica)	0.0	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Abothrix olivaceus</i> (FJ719818) - Chile <i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile
<i>Necomys lasiurus</i>	Mato Grosso (Amazônia)	0.0	100%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile
			99%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Elaphe carinata</i> (KF939627) - China
<i>Calomys</i> sp.	Mato Grosso (Amazônia)	0.0	99%	<i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Abothrix olivaceus</i> (FJ719818) - Chile <i>Hepatozoon</i> sp. host <i>Ixodes</i> sp. (MH174345) - Chile

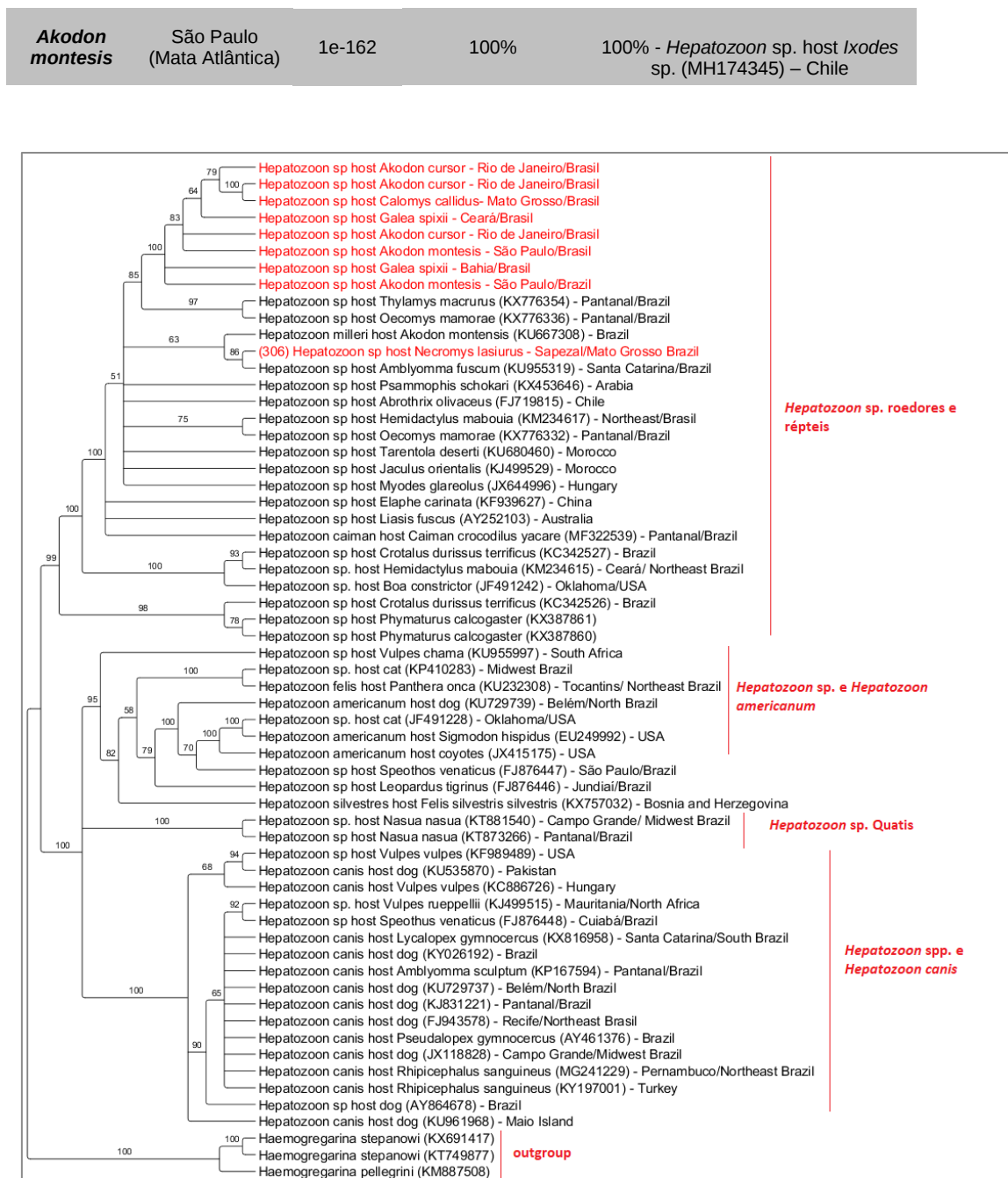


Figura 13. Posicionamento filogenético das sequências concatenadas de *Hepatozoon* spp. (18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Bayesiana de um alinhamento de 1462pb utilizando o modelo evolutivo TIM+G. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos biomas.

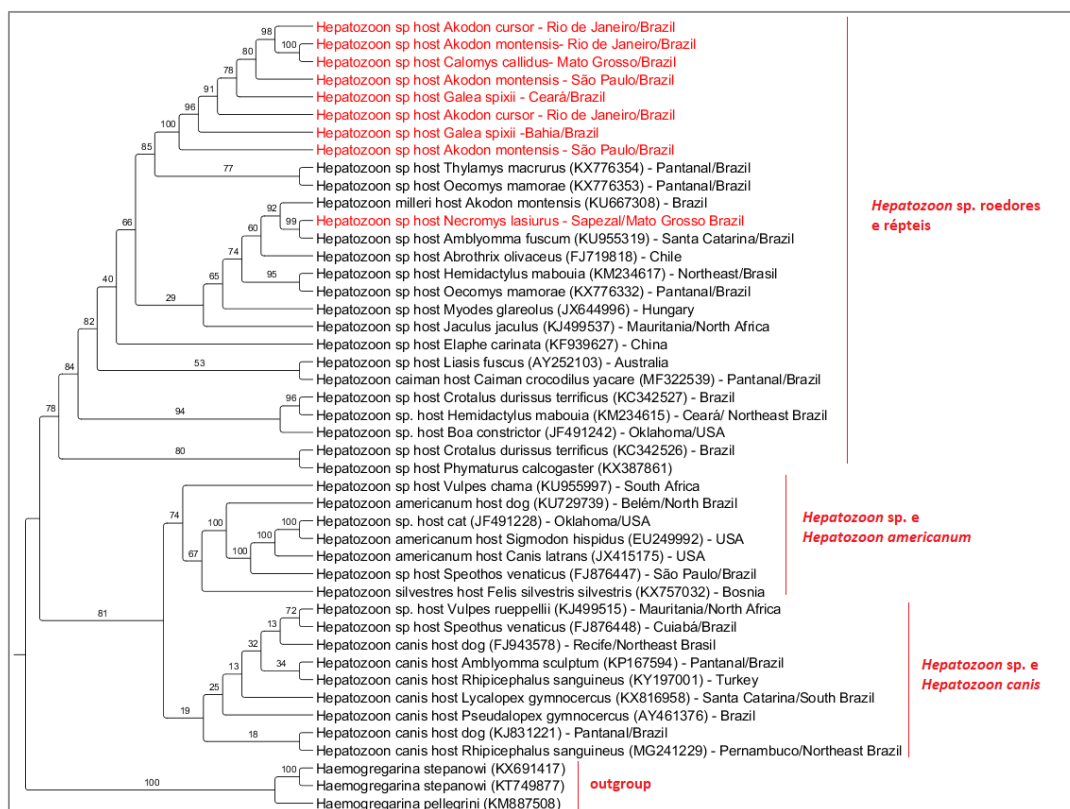


Figura 14. Posicionamento filogenético das sequências concatenadas de *Hepatozoon* sp.(18S rRNA) detectadas em roedores amostrados em cinco biomas brasileiros com base na análise filogenética Máxima Verossimilhança de um alinhamento de 1462pb utilizando o modelo evolutivo TIM+G. Os números na árvore indicam valores de *bootstrap* para os pontos de ramificação. Números de acesso estão em indicados ao lado das sequências. As sequências do presente estudo estão destacadas em vermelho com os respectivos biomas.

As análises de diversidade de haplótipos com o software softawe TCS v.1.21 (Clement et al., 2000) e de genealogia com o software *Splitstree* v4.11.3 (Huson e Bryant, 2006) não foram realizadas para as sequências concatenadas, uma vez que as mesmas apresentaram um “gap” de aproximadamente 100pb no alinhamento realizado pelo software MAFFT (Kato et al. 2017), impossibilitando a realização das referidas análises.

Adicionalmente foi realizada a construção da rede de haplótipos utilizando sequências 18S rRNA de *Hepatozoon* spp. detectados em roedores

em outros estudos realizados no Brasil até o presente momento (Demoner et al., 2016; Wolf et al., 2016; Sousa et al., 2017; Demoner et al., 2018). Para tal, foram selecionadas 26 sequências e a análise foi realizada com o software TCS v.1.21 (Clement et al., 2000) (**Figuras 15**). Por meio da análise TCS foram encontrados 6 haplótipos, que foram agrupados em dois grandes grupos de haplótipos: um agrupamento pertencente à região litorânea do país e Mato Grosso e outro pertencente à mais região central do país (Goiás e Mato Grosso do Sul). O haplótipo #1 foi representado por 15 sequências (detectadas em roedores nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará), haplótipo #2 com uma sequência (São Paulo), haplótipo #3, #4 com sequências do Mato Grosso, haplótipo #5 com quatro sequências de Mato Grosso do Sul e haplótipo #6 com sequência de Goiás. Adicionalmente, um haplótipo separado da rede foi formado (*threshold* 95%), composto de três sequências do Mato Grosso do Sul (KX776337, KX776344, KX776351) (**Tabela 9; Figuras 15**).

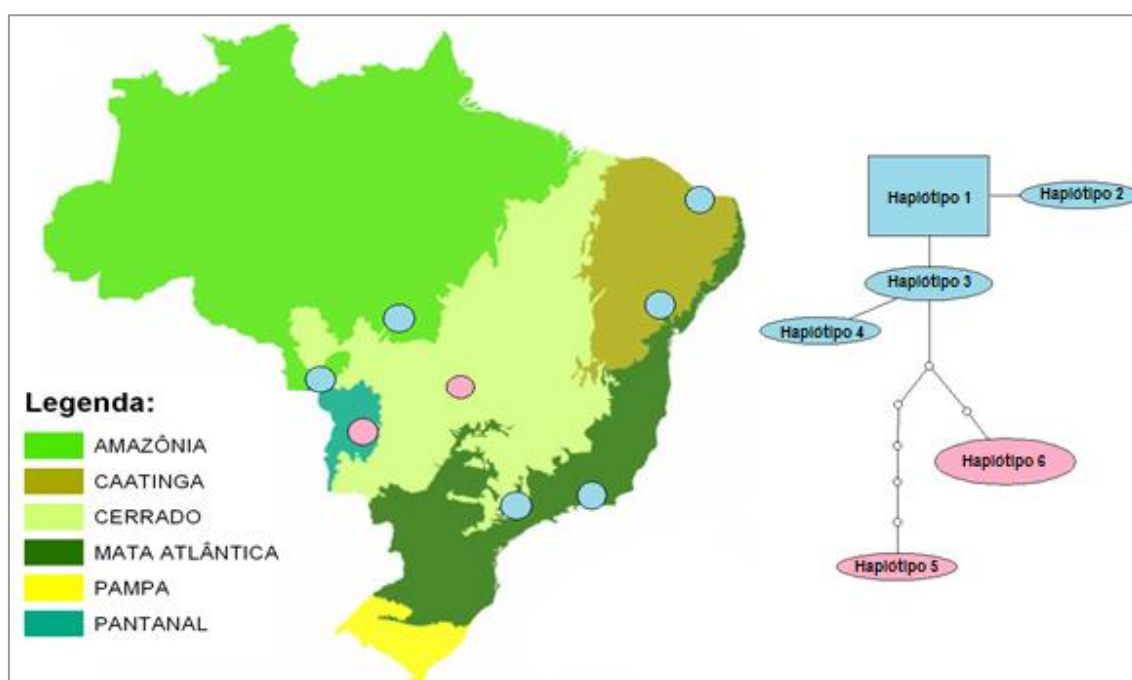


Figura 15. A) Distribuição dos agrupamentos de haplótipos 18S rRNA de *Hepatozoon* (1 representado pela cor azul e 2 representado pela cor rosa) detectados em roedores amostrados em diferentes biomas brasileiros. B) Rede de haplótipos não enraizada para *Hepatozoon* sp. gerada através das sequências do gene ribossomal 18S rDNA com o software TCS v.1.21 (Clement et al., 2000). Cada linha da rede representa um simples passo mutacional; os pequenos círculos indicam haplótipos hipotéticos que são intermediários necessários entre os haplótipos amostrados, mas que não foram observados

na amostra. O agrupamento 1 está identificado em azul e o agrupamento 2 está indentificado em rosa (**Tabela 9**).

Tabela 9. Relação, frequência e alocação de haplótipos 18S rRNA de *Hepatozoon* de roedores no respectivo agrupamento da rede haplotípica (**Figura 15**) dos indivíduos amostrados nos diferentes estudos brasileiros. O agrupamento 1 está identificado em azul e o agrupamento 2 está indentificado em rosa.

Haplótipo	Frequência	Indivíduos que contêm o haplótipo
1	14	MH111406, MH111405, MH111408, MH111412, MH111413, MH111410, MH111423, MH111411, MH111422, MH111409 (Rio de Janeiro) MH111407(Bahia) MH111415 (Ceará) KU667309, MH111417 (São Paulo)
2	1	MH111416 (São Paulo)
3	2	MH111420, KP757838 (Mato Grosso)
4	1	MH111419 (Mato Grosso)
5	1	MH111418 (Goiás)
6	1	KX776349, KX776343, KX776353, KX776345 (Mato Grosso do Sul)

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi aplicada a fim de se testar o grau de partição da variação genética entre as populações de *Hepatozoon* sp. amostradas. Considerou-se cada um dos agrupamentos (agrupamento 1 e 2) como uma população, de acordo com o resultado da análise de haplótipos realizada pelo software TCS. Os resultados desta análise foram todos significativos ($P < 0,1$) e evidenciaram elevada diferenciação genética entre os indivíduos dentro dos agrupamentos (**Tabela 10**). O alto valor

de FST resultante ($F_{ST} = 0,7267^*$) indica um elevado grau de estruturação genética entre os agrupamentos amostrados.

Tabela 10. Teste AMOVA. Nesse teste, cada um dos agrupamentos (agrupamentos 1 e 2) foi considerado como uma população.

Tipo de variação	Componentes da variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Entre populações	2,85953 Va	72,67%	$F_{ST} = 0,7267^*$
Dentro das populações	1,07566 Vb	27,33%	

*Valor significativo ($p < 0,1$).

6. DISCUSSÃO

A epidemiologia de *Hepatozoon* sp. em animais selvagens e domésticos no Brasil ainda não está totalmente elucidada. O papel dos roedores na epidemiologia das espécies de *Hepatozoon* spp. circulantes em vertebrados no Brasil deve ser melhor investigado. Pouco se sabe sobre a ocorrência e diversidade de *Hepatozoon* spp. em roedores no Brasil, visto que os trabalhos realizados até o presente momento pontuais e escassos.

Neste sentido, o presente estudo mostrou a ocorrência de *Hepatozoon* sp. em diversas espécies de roedores amostradas em cinco biomas brasileiros, Cerrado, Pantanal, Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica. Sessenta e nove (14,93%) amostras de baço de roedores mostraram-se positivas na PCR para *Hepatozoon* spp. baseada no gene 18S rRNA segundo o protocolo de Perkins and Keller (2001), sendo o parasita detectado em 18/31 (58,06%) gêneros diferentes de roedores. Cento e setenta e duas amostras (36,83%) mostraram-se positivas para *Hepatozoon* sp. segundo o protocolo de cPCR baseado no gene 18S rRNA descrito por Ujvari et al. (2004), sendo o agente detectado em 24/31 (77,41%) gêneros diferentes de roedores. No total, *Hepatozoon* sp. foi detectado em 24 gêneros diferentes de roedores (77,41%). A porcentagem de animais e gêneros positivos no presente estudo foi superior àquela relatada em outros estudos realizados no Brasil. Neste sentido, Sousa et al. (2017) relataram a presença de DNA de *Hepatozoon* sp. em 8% e 1,2% das amostras biológicas de roedores das espécies *Oecomys marmorae* e *Thrichomys fosteri* pelo protocolo de Perkins & Keller (2001), e em 36% e 15,5% das amostras

teciduais de roedores das mesmas espécies, respectivamente, pelo protocolo de Urvjvari et al. (2004). No estudo realizado no município de Botucatu por Demoner et al. (2016), 100% (4/4) dos gêneros amostrados naquele estudo mostraram-se positivos, embora a diversidade taxonômica de roedores amostrados tenha sido bem menor que aquela alcançada no presente estudo. Desta forma, o presente trabalho apresenta um alto número de gêneros de roedores positivos para *Hepatozoon* spp., sendo a primeira descrição de positividade para o parasita sob estudo em *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Proechimys roberti*, *P. cuvieri*, *G. spixii*, *Hylaeamys megacephalus*, *Gracilinanus agilis*, *Cerradomys scotti*, *C. akroai*, *C. marinhui* e *Wiedomys cerradensis*. Além disso, foram detectados roedores positivos em regiões brasileiras estudadas pela primeira vez, como Tremendal, Curaçá e Livramento (Bahia), Jaguaruana e Russas (Ceará), Florianópolis (Santa Catarina), Teresópolis e Sumidouro (Rio de Janeiro), Divinópolis e Novo Jardim (Tocantins) e Currálinho (Pará). O presente estudo mostra uma taxa de positividade para *Hepatozoon* spp. moderadamente alta entre os roedores amostrados, com descrição do parasitismo pela primeira vez em determinadas espécies e em localidades outrora não investigadas. Provavelmente a ampla amostragem, na qual 472 roedores foram amostrados em cinco diferentes biomas, com características climáticas e ambientais diversas, pode ter influenciado nos resultados obtidos.

As sequências detectadas em roedores no presente estudo apresentaram valores de *query coverage* e identidade elevados (98-100%) para sequências de *Hepatozoon* spp. obtidas de roedores, répteis e ectoparasitas e previamente descritas em estudos no Brasil e no mundo. A análise de identidade pelo BLAST e a filogenia (inferida pelos métodos de Máxima Verossimilhança, Bayesiana e Splitstree) apresentaram resultados semelhantes para ambos os fragmentos amplificados do gene 18S rRNA analisados separadamente e de forma concatenada. As sequências do presente estudo agruparam-se em um grande clado com sequências de *Hepatozoon* spp. de roedores e répteis. Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com resultados obtidos em outros trabalhos realizados no Brasil e no mundo. Hamšíková et al. (2016) observaram que as espécies de *Hepatozoon* encontradas em roedores amostrados na Eslováquia e República

Tchea encontravam-se filogeneticamente próximas às sequências detectadas em lagartos e serpentes, sendo distintas das sequências de *H. canis* obtidas em cães. Sousa et al. (2017), analisando sequências de roedores obtidas no Pantanal brasileiro encontraram resultados semelhantes, sendo as sequências de roedores e répteis agrupados em um grande clado, separadamente daquelas obtidas em canídeos e felídeos, as quais formaram um outro grande clado. Os achados sugerem que os roedores parecem possuir um papel importante como hospedeiros intermediários ou paratênicos para infecções por *Hepatozoon* em répteis.

A transmissão de *Hepatozoon* spp. para serpentes e lagartos usualmente envolve a predação de hospedeiros paratênicos ou intermediários contendo formas císticas do protozoário (Smith, 1996). Neste sentido, *Hepatozoon cuestensis* foi descrita parasitando a serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*, que tem como hábito alimentar a predação de roedores. Segundo os autores, essa espécie de serpente pode se infectar por meio da predação de roedores infectados ou infestados por carrapatos/ácaros infectados (O'Dwyer et al., 2013). Ainda no Brasil, Gomes et al. (2018) detectaram a presença de *H. cuestensis* (haplótipo CPV04) pela primeira vez em roedores da espécie *Hydrochoerus hydrochaeris*, sendo que este parasita havia sido descrito até aquele momento somente em répteis (O'Dwyer et al., 2013; Tomé et al., 2016). Uma vez que filhotes de capivaras podem ser predadas por serpentes (Moreira et al., 2013), sugere-se que a transmissão desta espécie de *Hepatozoon* possa ocorrer entre capivaras e serpentes por meio do carnivorismo.

A diversidade de haplótipos é controlada por diferentes processos, incluindo mutação, recombinação e demografia (Stumpf, 2004). A diversidade de haplótipos observada em nosso estudo foi superior àquela detectada em roedores em outros estudos brasileiros. Gomes et al. (2018) encontraram quatro haplótipos diferentes, CPV01/CTU01 (KY965141), CPV02 (KY965142), CPV03 (KY965143) e CPV04 (KY965144) na espécie *H. hydrochaeris*, em estudo realizado na Ilha do Marajó, região norte do país. No estudo realizado no Mato Grosso do Sul (Pantanal brasileiro), três haplótipos diferentes de *Hepatozoon* foram encontrados na espécie de roedor *T. fosteri*, ao se sequenciar um fragmento do gene 18S rRNA obtido pelo protocolo de Ujvari et al (2004). Já o alinhamento das sequências obtidas utilizando o protocolo de

cPCR de Perkins e Keller (2001) mostrou a presença de quatro haplótipos (Sousa et al., 2017). Entre as 13 sequências analisadas no presente trabalho obtidas pelo protocolo de cPCR de Perkins e Keller (2001), foram identificados dois haplótipos. Entre as 17 sequências obtidas pelo protocolo de cPCR de Ujvari et al. (2004) foram identificados cinco haplótipos, sendo a diversidade de nucleotídeos (P_i) = 0,00453 e diversidade de haplótipos (h_d) = 0,426. Baseado nesses resultados, sugere-se que a análise de haplótipos seja baseada em amplicons 18S rRNA obtidos pelo protocolo de Ujvari et al. (2004).

Diferentemente de estudos prévios, o presente trabalho analisou a diversidade de haplótipos 18S rDNA de *Hepatozoon* spp. descritos até o momento no Brasil. Na análise conduzida no presente estudo foram encontrados 6 haplótipos, mostrando uma grande heterogeneidade de *Hepatozoon* sp. parasitando esse grupo de hospedeiros. A existência de estruturação genética entre as populações foi testada através da análise de variância molecular com os grupos escolhidos através da análise de haplótipos realizada pelo TCS. Os dois agrupamentos demonstrados pelo TCS apresentaram elevado grau de estruturação genética quando comparados. O valor obtido de F_{st} (0,7267), o qual mostrou-se estatisticamente significativo, foi mais que suficiente para concluir que existe diferença entre os agrupamentos, uma vez que valores de F_{st} superiores a 0,25 caracterizam padrão positivo de estruturação genética (Wright, 1931). Aparentemente, existem dois grupos distintos de haplótipos de *Hepatozoon* sp. circulando em roedores no Brasil, sendo um grupo composto por sequências detectadas em roedores nas regiões litorâneas do país e no Mato Grosso, e outro grupo composto por sequências detectadas em roedores nas regiões mais centrais do País (Mato Grosso do Sul e Goiás). O Cerrado e Pantanal formam um mosaico vegetacional, intercalando formações savânicas, lenhosas e campestres, formações florestais e vegetação aquática (Eiten 1972). Esse mosaico vegetacional pode justificar o haplogrupo encontrado nos estados do Mato Grosso do Sul e Goiás. Para que essa análise seja melhor explorada, novos estudos no Brasil devem ser realizados, abrangendo maiores número de espécies e regiões geográficas.

Até o presente momento, as sequências do gene 18S rRNA compreendem os únicos marcadores moleculares para análise de diversidade de espécies de *Hepatozoon* (Modrý et al., 2017). É imprescindível que protocolos de PCR

baseados em outros genes menos conservados sejam utilizados, tanto para análise filogenética quanto para estudos de diversidade. Com a análise de outros genes talvez seja possível obter uma discriminação maior entre genótipos de *Hepatozoon* circulantes entre as espécies animais. Tal abordagem contribuiria para uma melhor definição/descrição de espécies, de *Hepatozoon* spp. possibilitando um melhor entendimento da epidemiologia da hepatozoonose em roedores no Brasil e no mundo. Futuros estudos são necessários a fim de traçar a história evolutiva de espécies de *Hepatozoon* parasitas de animais domésticos e selvagens na América do Sul.

8. CONCLUSÃO

- *Hepatozoon* spp. foi detectado, por meio de métodos moleculares, em 24 gêneros de roedores, com primeiro relato da infecção pelo referido parasita em *Rattus rattus*, *Mus musculus*, *Proechimys roberti*, *P. cuvieri*, *G. spixii*, *Hylaeamys megacephalus*, *Gracilinanus agilis*, *Cerradomys scotti*, *C. akroai*, *C. marinhui* e *Wiedomys cerradensis* em cinco biomas brasileiros diferentes;
- Novos haplótipos de *Hepatozoon* sp. foram encontrados infectando roedores nos diversos biomas brasileiros;
- Existe uma estruturação genética de acordo com a localidade geográfica das populações de *Hepatozoon* parasitas dos roedores amostrados.

9. REFERÊNCIAS

Allen KE, Yabsley MJ, Johnson EM, Reichard MV, Panciera RJ, Ewing SA, Little SE (2011) Novel *Hepatozoon* in Vertebrates from the Southern United States. **Journal of Parasitology** 97:648-653.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 215:403-410.

André MR, Adania CH, Teixeira RHF, Vargas GH, Falcade M, Sousa L, Salles AR, Allegretti SM, Felipe PAN, Machado RZ (2010) Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology** 173:134–138.

André MR, Herrera HM, Fernandes SJ, Sousa KC, Gonçalves LR, Domingos IH, de Macedo GC, Machado RZ (2015) Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases** 6:779-786.

Aydin MF, Sevinc F, Sevinc M (2015) Molecular detection and characterization of *Hepatozoon* spp. in dogs from the central part of Turkey. **Ticks and Tick Borne Diseases** 6:1388–392.

Bajer A, Welc-Faleciak R, Bednarska M, Alsarraf M, Behnke-Borowczyk J, Sinski E, Behnke JM (2014) Long-Term spatiotemporal stability and dynamic changes in the haemoparasite community of bank voles (*Myodes glareolus*) in NE Poland. **Microbial Ecology** 68:196–211.

Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS, Smith TG (2012) Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 59:171–180.

Baneth G e Weigler B (1997) Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 11:365–370.

Baneth G, Samish M, Alekseev E, Aroch I, Shkap V (2001) Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Journal of Parasitology** 87:606–611.

Baneth G, Mathew JS, Shkap V, Macintire DK, Barta JR, Ewing SA (2003) Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **TRENDS in Parasitology** 19:27-31.

Baneth G e Shkap V (2003) Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. **Journal of Parasitology** 89:379-381.

Baneth G. Hepatozoonosis. In: Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed., C. E. Greene (ed.) W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, p.698-705, 2006.

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

Barton CL, Russo EA, Craig TM, Green RW (1985) Canine hepatozoonosis: a retrospective study of 15 naturally occurring cases. **Journal of American Animal Association** 21:125-134.

Benson DA, Mizrachi IK, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DI (2002) GenBank. **Nucleic Acids Research** 30:17-20.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB (2003) Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology** 41:4172-4177

Bonvicino CR, Oliveira JÁ, D'Andrea PS (2008) Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan - Americano de Febre Aftosa.

Bouer A, André MA, Gonçalves LR, Luzzi MC, Oliveira JP, Rodrigues AC, Varani AM, Miranda VFO, Perles L, Werther K, Machado RZ (2017) *Hepatozoon caimani* in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia, Alligatoridae) from North Pantanal, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology** 26:352-358.

Breshears AM, Kocan KM, Johnson EM, Panciera RJ (2009) Light and transmission electron microscopic characteristics of a novel *Hepatozoon* spp. in naturally infected cotton rats (*Sigmodon hispidus*). **Parasitology Research** 105:1327–1332.

Cardoso L, Cortes HCE, Eyal O, Reis A, Lopes AP, Vila-Viçosa MJ, Rodrigues PA, Baneth G (2014) Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. **Parasites & Vectors** 7:113.

Clark GM (1958) *Hepatozoon griseisciuri* n. sp.; A New Species of *Hepatozoon* from the Grey Squirrel (*Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788), with Studies on the Life Cycle. **The Journal of Parasitology** 44:52-63.

Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology** 9:1657-1659.

Craig TM (1990) Hepatozoonosis. In: Infectious diseases of the dog and cat. first ed., C. E. Greene (ed.) W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, p.778-785, 1990.

Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC (2003) Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology** 114:173–194.

Criado-Fornelio A, Ruas JL, Casado N, Farias NA, Soares MP, Müller G, Brunt JG, Berne ME, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2006) New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology** 92:93-99.

Criado-Fornelio A, Buling A, Casado N, Gimenez C, Ruas J, Wendt L, Rosa-Farias N, Pinheiro M, Rey-Valeiron C, Barba-Carretero JC (2009) Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica** 54:187–193.

Dantas-Torres F, Otranto D, (2015) Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, 208:9–13.

Darriba, D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9:772.

Demoner LC, Rubini AS, Paduan KS, Metzger B, Antunes JMAP, Martins TF, Mathias MIC, O'Dwyer LH (2013) Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases** 4:542–546.

Demoner LC, Magro NM, da Silva MR, de Paula Antunes JM, Calabuig CI, O'Dwyer LH (2016) *Hepatozoon* spp. infections in wild rodents in area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases** 7:859–864.

Demoner LC, Silva MRL, Magro NM, O'Dwyer (2018) *Hepatozoon milleri* sp. nov. (Adeleorina: Hepatozoidae) in *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from southeastern Brazil. **Parasitology** 1-8.

de Miranda RL, de Castro JR, Olegário MM, Beletti ME, Mundim AV, O'Dwyer LH, Eyal O, Talmi-Frank D, Cury MC, Baneth G (2011) Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology** 11:392-396.

de Miranda RL, O'Dwyer LH, de Castro JR, Metzger B, Rubini AS, Mundim A.V., Eyal O, Talmi-Frank D, Cury MC, Baneth G (2014) Prevalence and molecular characterization of *Hepatozoon canis* in dogs from urban and rural areas in Southeast Brazil. **Research in Veterinary Science** 97:325-8.

Droleskey RE, Mercer SH, Deloach JR, Craig TM (1993) Ultrastructure of *Hepatozoon canis* in the dog. **Veterinary Parasitology** 50:83-99.

East ML, Wibbelt G, Lieckfeldt D, Ludwig A, Goller K, Wilhelm K, Schares G, Thierer D, Hofer H (2008) A *Hepatozoon* species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengeti ecosystem, Tanzania. **Journal of Wildlife Diseases** 44:45–52.

Eiten G (1972) The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review** 38: 201-341.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research** 8:175-1985.

Ewing B, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research** 8:186-194

Ewing SA, Mathew JS, Panciera RJ (2002) Transmission of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina) by Ixodids (Acari: Ixodidae). **Journal of**

Medical Entomology 39:631–634.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131:479-491.

Excoffier L e Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10:564-567.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** 39:783–791.

Ferreira EC, Gontijo CM, Cruz I, Melo MN, Silva AM (2010) Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 105:895-898.

Forlano M, Scofield A, Elisei C, Fernandes KR, Ewing SA, Massard CL (2005) Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology** 134:1–7.

Forlano M, Teixeira KRS, Scofield A, Elisei C, Yotoko KS, Fernandes KR, Linhares GF, Ewing SA, Massard CL (2007) Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. **Veterinary Parasitology** 145:21–30.

Gavazza A, Bizzeti M, Papini R (2003) Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue de Medicine Veterinaire** 154:565- 571.

Giannelli A, Ramos RA, di Paola G, Mencke, N, Dantas-Torres F, Baneth G, Otranto D (2013) Transtadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology** 19:1–5.

Giannelli A, Lia RP, Annoscia G, Buonavoglia C, Lorusso E, Dantas-Torres F, Baneth G, Otranto D (2016) *Rhipicephalus turanicus*, a new vector of *Hepatozoon canis*. **Parasitology** 21:1-8.

Glez-Peña D, Gomez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-riverola F, Posada D (2010) ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research** 38:14-18.

Gomes LA, Moraes PHG, Nascimento LCS, O'Dwyer LH, Nunes MRT, Rossi ARP, Aguiar DCF, Gonçalves EC (2016) Molecular analysis reveals the diversity of *Hepatozoon* species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks Tick Borne Disease** 7:1061-1066.

Gomes LA, Moraes LA, Aguiar DCF, Dias HLT, Ribeiro ASS, Rocha HPC, Nunes MRT, Gonçalves EC (2018) Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in

Hydrochoerus hydrochaeris and *Pecari tajacu* from eastern Amazon. **Ticks and Tick born diseases**, 9:314-318.

Gonçalves LR, Filgueira KD, Ahid SM, Pereira JS, Vale AM, Machado RZ, Andre MR (2014) Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 23:407-412.

Gordon D, Abajian C, Green P (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research** 8:195-202.

Guglielmone AA, Estrada-Pena A, Keirans JE, Robbins RG (2003) Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. In: International Consortium on Ticks and Tickborne Diseases (ICTTD-2), Atalanta, Houten, The Netherlands, 173.

Guglielmone AA, Nava S (2010) Rodents of the subfamily Caviinae (Hystricognathi: Caviidae) as hosts for hard ticks (Acari: Ixodidae). **Mastozoologia Neotropical** 17:279–286.

Guglielmone AA, Nava S, Díaz MM (2011) Relationships of South American marsupials (Didelphimorphia, Microbiotheria and Paucituberculata) and hard ticks (Acari: Ixodidae) with distribution of four species of Ixodes. **Zootaxa** 3086:1–30.

Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology** 52:696-704.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41:95–98.

Hamšíková Z, Silaghi C, Rudolf I, Venclíková K, Mahríková L, Slovák M, Mendel J, Blažejová H, Berthová L, Kocianová E, Hubálek Z, Schnittger L, Kazimírová M (2016) Molecular detection and phylogenetic analysis of *Hepatozoon* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. **Parasitology Research** 115:3897–3904

Harikrishnan T.J., G. Ponnudurai and T. Anna. Some observations on *Hepatozoon muris* in brown rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Veterinary Parasitology*, 25(1) 2011 : 72-75

Harris DJ, Pereira A, Halajian A, Luus-Powell WJ, Kunutu KD (2017) Screening for *Hepatozoon* parasites in gerbils and potential predators in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association** 88:1-4.

Hodžić A, Mrowietz N, Cézanne R, Bruckschwaiger P, Punz S, Habler VE, Tomsik V, Lazar J, Duscher GG, Glawischnig W, Fuehrer HP (2018) Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in

red foxes (*Vulpes vulpes*) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of *Hepatozoon canis*. **Parasitology** 145:335-344.

Huson DH, Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. **Molecular Biology Evolution** 23:254-267.

Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishi T (2002) Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology** 106:265–271.

Ivanov A, Tsachev I. *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog (2008) **Trakia Journal of Sciences** 6:27-35.

Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Ewing SA, Little SE, Reichard MV (2007) Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology** 150:27–32.

Johnson EM, Allen KE, Breshears MA, Panciera RJ, Little SE, Ewing SA, (2008a) Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. **Veterinary Parasitology** 151:164–169.

Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Little SE, Ewing SA (2008b) Infectivity of *Hepatozoon americanum* cystozoites for a dog. **Veterinary Parasitology** 154, 148–150.

Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Ewing SA, Little SE (2009a) Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and infectivity of cystozoites for a dog. **Veterinary Parasitology** 164, 162–166.

Johnson EM, Panciera RJ, Allen KE, Sheets ME, Beal JD, Ewing SA, Little SE (2009b) Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 23:1315–1318.

Karagenc TI, Pasa S, Kirli G, Hosgor M, Bilgic HB, Ozon YH, Atasoy A, Eren H (2006) A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. **Veterinary Parasitology** 135:113–119.

Karbowiak G, Rychlik L, Nowakowski W, Wita I (2005) Natural infections of small mammals with blood parasites on the borderland and temperate forest zones. **Acta Theriologica** 50: 31-42.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2017) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** 6:1-7

Kocan AA, Cummings CA, Panciera RJ, Mathew JS, Ewingii SA, Barker RW (2000) Naturally occurring and experimentally transmitted *Hepatozoon*

americanum in coyotes from Oklahoma. **Journal of Wildlife Diseases** 36:149-153.

Kubo M, Miyoshi N, Yasuda N (2006) Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cats. **Journal of Veterinary Medical Science** 68:833–837.

Laakkonen J, Sukura A, Oksanen A, Henttonen H, Soveri T (2001) Haemogregarines of the genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina) in rodents from northern Europe. **Folia Parasitologica** 48:263-267.

Lainson R, Paperna I, Naiff RD (2003) Development of *Hepatozoon caimani* (Carini 1909) Pessôa, de Biasi & de Souza, 1972 in the *Caiman caiman*, *C. crocodilus*, the frog *Rana catesbiana* and the mosquito *Culex fatigans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98:103-113.

Leal DD, Dreyer CS, da Silva RJ, Ribolla PE, Paduan S, Bianchi I, O'Dwyer LH (2015) Characterization of *Hepatozoon* spp. in *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus* from two regions of the Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Parasitology Research** 114:1541-9.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, 25:1451–1452.

Maia JP, Álvares F, Boratýnski Z, Brito JC, Leite JV, Harris DJ (2014) Molecular assessment of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission dynamics across taxonomic groups. **Journal of Wildlife Diseases** 50:837-48.

Macintire DK, Vincent-Johnson N, Dillon AR, Blagburn B, Lindsay D, Whitley EM, Banfield C (1997) Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989– 1994). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 210, 916–922

Melo AL, Witter R, Martins TF, Pacheco TA, Alves AS, Chitarra CS, Dutra V, Nakazato L, Pacheco RC, Labruna MB, Aguiar DM (2016) A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology** 30:112–116.

Metzger B, Paduan KS, Rubini AS, Oliveira TG, Pereira C, O'Dwyer LH (2008) The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology** 152:28-33.

Miller WW (1908) *Hepatozoon perniciosum* n.g., n. sp., a haemogregarine pathogenic for white rats; with a brief description of the sexual cycle in the intermediate host, a mite (*Laelaps echidninus* Berlese). **Bulletin of the Hygiene Laboratory of Washington** 46: 51 123.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA, p.1 – 8.

Modrý D, Beck R, Hrazdilová K, Baneth G (2017) A review of methods for detection of *Hepatozoon* infection in carnivores and arthropod vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** 17:66-72.

Moço TC, O'Dwyer LH, Vilela FC, Barrella TH, Silva RJ (2002) Morphologic and Morphometric Analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of Snakes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 97:1169-1176.

Moço TC, Silva RJ, Madeira NG, Paduan KS, Rubini AS, Leal DDM, O'Dwyer LH (2002) Morphological, morphometric, and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisoma durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitology Research** 110:1393–1401

Moreira JR (2013). Taxonomy, Natural History and Distribution of the Capybara. In: Moreira JR, Ferraz KMPMB, Herrera EA, MacDonald DW. Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species. Nova Iorque: Springer. pp. 3–39.

Mundim AV, Morais IA, Tavares M, Cury MC, Mundim MJ (2008a) Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa. A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology** 153:3-8.

Mundim ECS, Francisco MMS, Souza JN, Alencar MAG, Ramalho PCD (2008b) Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência** 12:107-115.

Murata T, Inoue M, Taura Y, Nakama S, Abe H, Fujisaki K (1995) Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.57, p.111–112, 1995.

Najm NA, Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Pfister K, Silaghi c (2014) *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: Molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. **Parasitology Research** 113:2679–285.

Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MPJ, Venzal JM, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone AA (2015) The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). **Veterinary Parasitology** 208: 2–8.

O'Dwyer LH, Moço TC, Silva RJ (2003) Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). **Parasitology Research** 92:110–112

O'DWYER LH. et al. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo (2018) **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 58:688-690.

O'DWYER, LH, Saito ME, Hasegawa MY, Kohayagawa A (2011) Brazilian canine hepatozoonosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 20:181–193.

O'Dwyer LH, Silva RJ, Madeira NG (2011b) Description of gamontogonic and sporogonic stages of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Caudisoma durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitology Research** 108: 845 – 851.

O'Dwyer LH, Moço TC, Paduan KS, Spenassatto C, da Silva RJ, Ribolla PE (2013) Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. **Experimental Parasitology** 135:200-207.

Ohbayashi M (1971) *Hepatozoon* sp. in northern voles, *Microtus oeconomus*, on St. Lawrence Island, Alaska. **Journal of Wildlife Diseases** 7:49-51.

Paludo GR, Friedmann H, Dell'Porto A, Macintire DK, Whitley EM, Boudreaux MK, Baneth G, Blagburn BL, Dykstra CC (2005) *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research** 97:167- 170.

Pessoa SB, de Biasi P, Puerto G (1974) Nota sobre a frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan** 38:69–118.

Perkins SL, Keller AK (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. **The Journal of Parasitology** 87:870-876.

Posada D, Buckley TR, Thorne J (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology** 53: 793-808.

Ramos R, Ramos C, Araújo F, Oliveira R, Souza I, Pimentel D, Galindo M, Santana M, Rosas E, Faustino M, Alves L (2010) Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research** 107:1115-1120.

Ramos CA, Babo-Terra VJ, Pedroso TC, Souza Filho AF, de Araújo FR, Cleveland HP (2015) Molecular identification of *Hepatozoon canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 24:247-50.

Randolph SE, Miklisová D, Lysy J, Rogers DJ, Labuda M (1999) Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. **Parasitology** 118:177–118.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 12:1572–1574.

Rubini AS, Paduan KS, Lopes VVA, O'Dwyer LH (2008) Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research** 102, 895–899.

Rubini AS, Paduan KS, Martins TF, Labruna MB, O'Dwyer LH (2009) Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology** 164:324–327.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 74:5463-5467.

Salgado FP (2006) **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do Centro de Controle de Zoonoses de Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

Shkap V, Baneth G, PIPANO E (1994) Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 6:121–123.

Silva MRL, Fornazari F, Martins TF, Hippólito AG, Rolim LS, Bisca JM, Teixeira CR, O'Dwyer LH (2018) A survey of hemoparasites and ectoparasites in *Nasua nasua* Linnaeus, 1766 with a redescription of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 based on morphological and molecular data. **Parasitology Research** 7:2159-2169.

Simpson VR, Birtles RJ, Bown KJ, Panciera RJ, Butler H, Davison N (2006) *Hepatozoon* species infection in wild red squirrels (*Sciurus vulgaris*) on the Isle of Wight. **Veterinary Record** 159: 202-205.

Smith TG (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of Parasitology** 82:565–585.

Smith TG, Desser SS (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Apicomplexa: Adeleorina). **Systematic Parasitology** 36:213–221.

Stumpf MP (2004) Haplotype diversity and SNP frequency dependence in the description of genetic variation. **European Journal of Human Genetics** 12:469-477.

Soares HS, Marcili A, Barbieri ARM, Minervino AHH, Moreira TR, Gennari SM, Labruna MB (2017) Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife** 6:115–121.

Sousa KCM, Fernandes MP, Herrera HM, Benevenuto JL, Santos FM, Rocha FL, Barreto WTG, Macedo GC, Campos JB, Martins TF, Pinto PCEA, Battesti DB, Piranda EM, Cançado PHD, Machado RZ, Andre MR (2017) Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology** 237:37-46.

Spolidorio MG, Labruna MB, Zago AM, Donatele DM, Caliri KM, Yoshinari NH (2009) *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology** 163:357-361.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Society of Systematic Biologists** 57:758–771.

Stover BC, Muller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics** 11:1-9.

Teel PD, Ketchum HR, Mock DE, Wright RE, Strey OF (2010) The gulf coast tick: a review of the life history, ecology, distribution, and emergence as an arthropod of medical and veterinary importance. **Journal of Medical Entomology** 47:707–722.

Thoisy B, Michel JC, Vogel I, Vié C (2000) A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. **Journal of Parasitology**, 86:1035-1040.

Tomé B, Rato C, Perera A, Harris DJ (2016) High Diversity of *Hepatozoon* spp. in Geckos of the Genus *Tarentola*. **Journal of Parasitology** 102:476-480.

Ujvari B, Madsen T, Olsson M (2004) High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. **The Journal of parasitology** 90:670-672.

Vincent-Johnson NA (2003) American canine hepatozoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 4:905–920.

Watkins RA, Moshier SE, Pinter AJ (2006) The Flea, *Megabothris abantis*: An Invertebrate Host of *Hepatozoon* sp. and a Likely Definitive Host in *Hepatozoon* Infections of the Montane Vole, *Microtus montanus*. **Journal of Wildlife Diseases** 42:386-390
volume = 42,

Wolf RW, Aragona M, Muñoz-Leal S, Pinto LB, Melo ALT, Braga IA, Costa JDS, Martins TF, Marcili A, Pacheco RDC, Labruna MB, Aguiar DM (2016) Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the

Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases** 7:449–456.

Wright S (1931) Evolution in Mendelian Populations. **Genetics** 16:97-159.

Wiger R (1973) Blood parasites of the norwegian lemming. **Journal of Wildlife Diseases** 9:125-128.