



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**INFECÇÃO POR *Trypanosoma* sp. EM *Boa constrictor* NA
REGIÃO NORDESTE DO BRASIL: ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

ANDERSON DE JESUS SANTOS

Salvador – BA
2020

ANDERSON DE JESUS SANTOS

**INFECÇÃO POR *Trypanosoma* sp. EM *Boa constrictor* NA
REGIÃO NORDESTE DO BRASIL: ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Coorientadora: Prof.^a Patrícia Oliveira Meira Santos (UFS)

**Salvador – BA
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Anderson de Jesus

Infecção por *Trypanosoma* sp. em *Boa constrictor* na
Região Nordeste do Brasil: alterações hematológicas e
caracterização molecular / Anderson de Jesus Santos. --
Salvador, 2020.

86 f. : il

Orientador: Ricardo Wagner Dias Portela.

Coorientadora: Patrícia Oliveira Meira-Santos.

Dissertação (Mestrado - Programa Pós-Graduação em
Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia,
Universidade Federal da Bahia, 2020.

1. Parasitologia. 2. Animais Silvestres . 3.
Estudo Filogenético . 4. Hematologia . 5. Répteis. I.
Portela, Ricardo Wagner Dias. II. Meira-Santos,
Patrícia Oliveira . III. Título.


ANDERSON DE JESUS SANTOS


"Infecção por *Trypanosoma sp.* em *Boa constrictor* na região nordeste do Brasil: alterações hematológicas e caracterização molecular"


Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 23 de janeiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Ricardo Wagner Dias Portela- Orientador 
Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais,
UFMG, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Thiago Campanharo Bahiense 
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
UFRRJ, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Bárbara Maria Paraná da Silva Souza 
Doutora em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil
Universidade Federal da Bahia

Ilika Biondi 
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana,
UEFS, Brasil.
Universidade Estadual de Feira de Santana

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDERSON DE JESUS SANTOS – Nascido em 14 de julho de 1994, na cidade de Catu – Ba. Concluiu seu ensino médio no ano de 2012, no Instituto Federal de Ciências e Tecnologia Baiano *Campus* Catu, Catu – BA, onde obteve o título de Técnico em Agropecuária. Em 2013 ingressou na Universidade Federal de Sergipe, no *campus* São Cristóvão – SE, no curso de Medicina Veterinária, formando-se em 2017. Durante sua graduação em Medicina Veterinária, foi bolsista CNPQ e FAPITEC, realizando pesquisas na área de parasitologia veterinária. Foi também bolsista voluntário, realizando pesquisas na área de microbiologia alimentar, patologia clínica e anatomia animal. Em 2017, realizou estágio supervisionado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (Labimuno) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde adquiriu conhecimentos na área de imunologia veterinária; neste estágio, desenvolveu pesquisa sobre a soropidemiologia da linfadenite caseosa em ovinos do estado de Sergipe, a qual foi apresentada como trabalho de conclusão de curso. Esse estudo ainda lhe rendeu uma coautoria no artigo científico “A panel of recombinant proteins for the serodiagnosis of caseous lymphadenitis in goats and sheep” na revista *Microbial Biotechnology*. Ingressou na Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFBA, no curso de mestrado, em 2018, onde pôde aperfeiçoar seus conhecimentos na área de imunodiagnóstico, biologia molecular e parasitologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Ana Meire, mulher negra e forte, que abdicou dos seus sonhos para me dar a vida e para que eu pudesse realizar os meus.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Portela, fonte de inspiração profissional e pessoal.

Aos meus amigos e familiares, que nunca deixaram de acreditar em mim.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois tudo que vivenciamos é uma dádiva de sua vontade, e desta forma toda a honra seja dada a ele.

Agradeço a minha mãe Ana Meire, por sempre me apoiar e por ser meu rochedo, a pessoa que diariamente me preenche de amor incondicional.

Não há palavras para descrever tamanha gratidão que tenho ao Prof. Ricardo Portela, por ter me acolhido, pela paciência, pela gentileza e pela fonte de inspiração; quando crescer quero ser igual ao senhor.

Ao meu irmão Denilson e as minhas irmãs Eva e Laena, vocês estão eternamente no meu coração.

Aos meus pais Evanildes e Edimário, pois me fazem lembrar sempre que os laços de sangue são mero detalhe formal.

Aos meus avós, Waldelice e Elias, amo muito vocês. Meus tios, Ana Claudia, Edmilson, Roberval, Adailton e Jaciara, vocês estão no meu coração. A minha bisavó dona Maria, e seus 106 anos de idade, vamos bater esse record mundial!

Aos amigos do grupo de pesquisa em Biotecnologia Aplicada à Saúde Animal, Marcos, Maysa, Gustavo, Laerte, Ana Rita, Kalil e Mayana.

Aos meus amigos de bancada: Barral, Julia Clara, Daniela e Bianca, o mundo todo será nosso!! Auuuuu!!!!

Às minhas confidentes Yânca e Letícia, meninas precisamos nos ver urgentemente.

Ao meu grande amigo Davi, meu pombo de estimação, e a Washington e suas mil e uma formas de me irritar.

A minha eterna orientadora Profa. Patrícia Meira Santos! Baiana arretada. Te adoro.

Agradeço a Taynara, Fernanda e Douglas, adoro vocês.

A meus eternos amigos da pensão da dona Luci, Nana, Peri, Romário e Jana, quero saber quando vamos nos reunir!

Aos meus amigos Felipe e Danilo, prometemos curtir juntos!!

Meus agradecimentos ao Henrique, a Waldira (Wall) e ao Rodrigo! Todo meu carinho a vocês.

Ao meu grande amigo Dionizio, melhor veterinário de Alagoas. A Ju, te adoro.

A todos os colegas e amigos, cujos nomes não listei aqui, mas que fazem parte da minha história e eu os amo.

Ao pessoal do LABIMUNO, por todo o suporte técnico e pela convivência, a dona Chica, dona Zilda, senhor Mário, pessoas que são patrimônios do lab.

Ao Prof. Roberto Meyer, por todo o apoio acadêmico e científico.

Ao pessoal do Zoológico de Aracaju, do SASE, do NOAP-UFBA e LAPH-UEFS.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e a todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

SANTOS, A. J. **Infecção por *Trypanosoma* sp. em *Boa constrictor* na região Nordeste do Brasil: alterações hematológicas e caracterização molecular.** 2020. 86f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, 2020.

Trypanosoma consiste em um gênero de hemoparasitas flagelados capazes de infectar vertebrados e ocasionar doenças de importância médica e veterinária. Apesar de ser descrita uma ampla ocorrência de *Trypanosoma* em répteis, em sua maioria lagartos e mais raramente em serpentes, pouco se sabe a respeito da ocorrência desse parasito em jiboias (*Boa constrictor*), bem como os efeitos do parasitismo na saúde dos animais. Diante da escassez de informação a respeito da ocorrência de *Trypanosoma* em serpentes da região Nordeste do Brasil, o presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência deste parasito em jiboias dos estados da Bahia e Sergipe, bem como avaliar as consequências fisiológicas da infecção e caracterizar molecularmente os parasitos isolados. Para isso, foram analisadas 61 jiboias, 47 na Bahia e 14 em Sergipe. Foi realizada a coleta de sangue das serpentes, sendo essas amostras submetidas a análise microscópica para identificação de formas flagelares, exames de hemograma, e também o soro foi obtido para realização de análises de bioquímica clínica. Foi realizada hemocultura com o intuito de isolar o parasito e caracterizá-lo por meio da técnica de PCR. A partir da análise de esfregaço sanguíneo, foram identificados 9 animais positivos, 01 no estado da Bahia e 08 em Sergipe. A análise dos valores hematológicos dos animais infectados e não infectados demonstrou diferença estatística significativa para volume globular ($p < 0,0005$), hemoglobina ($p < 0,005$), volume corpuscular médio ($p < 0,005$) e hemoglobina corpuscular média ($p < 0,05$), com os animais infectados apresentando menores valores. Na leucometria, houve diferença entre os níveis de eosinófilos ($p < 0,00005$) e heterófilos ($p < 0,05$), com o aumento do número desses dois tipos celulares nos animais parasitados. Não foi observado alterações nos valores de bioquímica clínica nos animais infectados. As análises de homologia dos genes GAPDH e SSU RNA identificaram os isolados como *Trypanosoma serpentis*. Com o presente trabalho foi possível identificar o primeiro relato da ocorrência de *Trypanosoma serpentis* em jiboias da Bahia e de Sergipe, e que há influência desse parasitismo em valores de hemograma e leucograma.

Palavras-chave: filogenia, diagnóstico molecular, répteis, serpentes, tripanossomíase.

ABSTRACT

SANTOS, A. J. **Infection by *Trypanosoma* sp. in *Boa constrictor* from Brazilian Northeast region: hematological changes and molecular characterization.** 2020. 83f. Dissertation (MSc in Biotechnology) – Health Sciences Institute – Federal University of Bahia, 2020.

Trypanosoma is a genus of flagellated hemoparasites that can infect vertebrates and cause diseases of medical and veterinary importance. Although a large occurrence of *Trypanosoma* is described in reptiles, mostly are lizards, and is more rarely described in snakes. Little is known about the occurrence of this parasite in *Boa constrictor*, as well as the effects of parasitism on animal health. Given the scarcity of information about the occurrence of *Trypanosoma* in snakes from northeastern Brazil, the present study aimed to investigate the occurrence of this parasite in *Boa constrictor* of the states of Bahia and Sergipe, as well as to evaluate the physiological consequences of infection and to molecularly characterize the isolated parasites. For this, 61 *Boa constrictors* were analyzed, 47 in Bahia and 14 in Sergipe. Serpent blood was collected, and these samples were submitted to microscopic analysis to identify flagellar forms, blood count tests, and serum was obtained for clinical biochemistry analysis. Blood culture was performed in order to isolate the parasite and characterize it by PCR. From the blood smear analysis, 09 positive animals were identified, 01 in the state of Bahia and 08 in Sergipe. Analysis of the hematological values of infected and uninfected animals showed a statistically significant difference for globular volume ($p < 0.0005$), hemoglobin ($p < 0.005$), mean corpuscular volume ($p < 0.005$) and mean corpuscular hemoglobin ($p < 0, 05$), with infected animals showing lower values. In leukometry, there was a difference between eosinophil ($p < 0.00005$) and heterophil ($p < 0.05$) levels, with increasing number of these two cell types in parasitized animals. No changes in clinical biochemistry values were observed in infected animals. Homology analysis of GAPDH and SSU RNA genes identified isolates as *Trypanosoma serpentis*. With the present work it was possible to identify the first report of *Trypanosoma serpentis* occurrence in Bahia and Sergipe *Boa constrictor*, and that there is influence of this parasitism on blood count and white blood cell values.

Keywords: molecular diagnosis, phylogeny, reptiles, snakes, trypanosomiasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Células hematológicas de jiboias (*Boa constrictor*).** Observação dos leucócitos sanguíneos de jiboias (setas): A – monócito; B – linfócito; C- heterófilo; D- eosinófilo; E – basófilo; F- trombócitos. É possível observar hemácias nucleadas em todas as figuras (ponta de seta). Esfregaços corados pelo corante de Giemsa e panótico rápido. Observação em objetiva de aumento 1000x.....7
- Figura 2 – Árvore filogenética baseada na concatenação dos genes subunidade menor (SSU) rRNA e glicosomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) agrupando os *Trypanosoma* em diferentes clados.** Arvore filogenética gerada pelos métodos de máxima verossimilhança (ML) e inferências bayesianas. As espécies foram agrupadas em oito clados, sendo estes: Clado aquático, clado *Trypanosoma grayi*, clado *T. lewisi*, clado *T. cruzi*, clado avian, clado *T. brucei*, clado lagarto/serpentes e clado *T. theileri*. 19
- Figura 3 - Comparação dos valores de eritrograma entre animais negativos e positivos para *Trypanosoma serpentina* em análise de esfregaço sanguíneo.** Parâmetros avaliados: hemácias (A), volume globular (B), hemoglobina (C), volume corpuscular médio (D), hemoglobina corpuscular média (E) e concentração de hemoglobina corpuscular média (F). Foram avaliados 61 animais, sendo 52 negativos e 9 positivos. Os resultados foram submetidos ao Teste t de Student e Mann-Whitney, e as diferenças estatisticamente significativas são representadas por * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001).....34
- Figura 4 - Comparação de valores de leucograma entre os grupos de animais negativos e positivos para infecção com *Trypanosoma serpentina* por análise de esfregaço sanguíneo.** Parâmetros avaliados: leucometria global (A), azurófilos (B), heterófilos (C), eosinófilos (D), linfócitos (E) e basófilos (F). Foram avaliados um total de 61 animais, 52 negativos e 9 positivos. Os resultados foram submetidos ao Teste t de Student e Mann-Whitney, e diferenças estatisticamente significativas são representadas por * (p < 0,05) e **** (p < 0,0001). Os pontos representam os outliers.35
- Figura 5 - Comparação de valores de bioquímica clínica entre os grupos de animais negativos e positivos para infecção com *Trypanosoma serpentina* por análise de esfregaço sanguíneo.** Parâmetros avaliados: Proteínas totais (A), Albumina (B) ALT (C), Glicose (D), Ferro (E), Creatinina (F), Ácido úrico (G) e Colesterol (H). Foram avaliados um total de 61

animais, 52 negativos e 9 positivos. Os resultados foram submetidos ao Teste t de Student e Mann-Whitney, e diferenças estatisticamente significativas são representadas por * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$). Os pontos representam os outliers.36

Figura 6 - Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma serpentis* em sangue de jiboia (*Boa constrictor*). As figuras A, B, C, D, E e F apresentam as principais conformações do *T. serpentis* observadas em esfregaços sanguíneos. Em A e B pode-se observar tripomastigotas em sua forma circular, sendo essas as formas predominantes nos esfregaços de sangue, e em A é possível observar uma figura de mitose. Em C, D e E é possível observar as tripomastigotas na forma semicircular e não circular. É possível observar também o cinetoplasto (cabeça de seta) como um pequeno ponto basófilico solto na membrana ou aderido ao corpo do parasito na região posterior; O flagelo (seta preta) é observado nas figuras A, B, C, E e F, emergindo do corpo na região anterior. O núcleo (N) é visível nas figuras B, C, D e E. Em D, é possível observar uma tripomastigota com uma membrana ondulante escassa (seta vermelha) e aderida ao corpo. Objetiva com aumento de 1000X.37

Figura 7 - Formas epimastigotas de *Trypanosoma serpentis* em cultivo com meio NNN-LIT. É possível observar o núcleo na região central (seta azul) do corpo do parasito, o cinetoplasto (seta vermelha) próximo ao núcleo, na região anterior do corpo do parasito, flagelo livre que emerge da região anterior (seta preta) do parasito e a membrana (cabeça de seta) ondulante iniciando a partir da região central do corpo das epimastigotas. Coloração pela técnica de Giemsa. Objetiva com aumento de 1000x..... 38

Figura 8 - Resultado da reação da PCR para o gene gGAPDH de diferentes espécies de *Trypanosoma*: Em PM é possível observar as bandas do padrão molecular. As amostras numeradas correspondem às espécies referência 1- *T. rangeli* cepa H-14; 2- *T. cruzi* cepa CL; 3- *T. conorhini* cepa Deane; 4-*T. conorhini* cepa LO/Z; 5-*T. rangeli* cepa SC-58; 6- *T. cruzi* cepa Dm28C; 7-*T. cruzi* cepa Y; 8- *T. rangeli* cepa San Agustín. É possível observar a formação da banda principal (gGAPDH) na linha de 600pb. Não foi observada nenhuma amplificação no controle negativo (CN).41

Figura 9 - PCR para o gene gGAPDH de diferentes espécies de *Trypanosoma*. Da esquerda para a direita, pode ser observado em PM as bandas do padrão molecular. Nos poços numerados de 1 a 3, encontram-se o DNA das cepas de referência de *Trypanosoma cruzi* cepa INPA 3663, *T. mega* e *T. rangeli* cepa Peita Gonzales, respectivamente. Nos poços de 4 a 8, encontra-se os

isolados de *Trypanosoma serpentis* obtidos durante o estudo, sendo o isolado 5 pertencente ao estado da Bahia e os demais ao estado de Sergipe. É possível observar que tanto a cepa de *T. mega* (2) e os isolados 4 (Sergipe) e 5 (Bahia) apresentaram a formação de duas bandas com pesos semelhantes, na faixa de peso molecular do gene gGAPDH (600pb). Não foi observado a formação de banda no poço destinado ao controle negativo (CN).41

Figura 10 - PCR para o gene r18S de diferentes cepas de *Trypanosoma*: Da esquerda para a direita, em PM é possível observar a disposição das bandas do padrão molecular, sendo que as amostras numeradas correspondem à duplicatas das espécies referência: 1- *T. rangeli* cepa H-14; 2- *T. cruzi* cepa CL; 3- *T. conorhini* cepa Deane; 4-*T. conorhini* cepa LO/Z; 5-*T. rangeli* cepa SC-58; 6- *T. cruzi* cepa Dm28C; 7-*T. cruzi* cepa Y; 8- *T. rangeli* cepa San Agustin e em 9 - *T. cruzi* cepa INPA. É possível observar a formação da banda principal (r18S) entre as linhas de 3000pb e 1500pb. Não foi observada nenhuma amplificação no controle negativo (CN)..42

Figura 11 - PCR para o gene r18S de diferentes cepas de *Trypanosoma*. Em PM encontra-se o padrão de peso molecular. Nos poços 1 e 2, encontra-se a duplicata do DNA das cepas de referência *T. mega* e *T. rangeli* cepa Peita Gonzales. Nos poços de 3 a 7, também em duplicata, encontra-se os isolados de *Trypanosoma serpentis* obtidos durante o estudo, sendo o isolado 4 pertencente ao estado da Bahia e os demais ao estado de Sergipe. É possível observar a formação da banda principal (r18S) entre as linhas de 3000pb e 1500pb.....42

Figura 12 – Arvore filogenética baseada na sequência do gene gGAPDH de *Trypanosoma serpentis*. A árvore foi construída a partir dos resíduos de aminoácidos codificado pelo gene gGAPDH para diferentes *Trypanosoma*. É possível observar que tanto o isolado obtido na Bahia (*T. serpentis* C538), quanto os isolados oriundos de Sergipe (*T. serpentis* C4, C125, C678 e C3), agrupam-se em um mesmo clado, junto com o isolado de *T. serpentis* (FJ236512.1) e *T. cascavelli* (FJ236511.11-551), sendo identificados como *T. serpentis*. É possível observar a presença do *Trypanosoma freitasi* (MF401952.11-518) no mesmo ramo que os isolados do presente estudo. As diferentes sequências de *T. conorhini*, *T. cruzi*, *T. rangeli* e *T. mega*, correspondem às cepas de referência sequenciadas no presente estudo. As sequências de *T. serpentis* (FJ236512.1), *T. cascavelli* (FJ236511.11-551) e *Trypanosoma freitasi* (MF401952.11-518) foram retiradas do banco de sequência de aminoácidos Uniprot. Árvore gerada pelo método de parcimônia, a partir do programa IQTREE, com 1000 replicações de árvores.43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Morfometria das formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma serpentis*, isoladas a partir de serpentes *Boa constrictor*: As medidas de 30 parasitos foram analisadas quanto ao comprimento total (TT), corpo sem flagelo (C), flagelo livre (FL), largura do corpo sem membrana ondulante (L), largura do corpo com membrana ondulante (LM), distância da região anterior até o núcleo (A-N), distância da região posterior até o núcleo (P-N), distância da região posterior até o cinetoplasto (P-K), distância do núcleo ao cinetoplasto. 39

Tabela 2 - Morfometria das formas epimastigotas de *Trypanosoma serpentis* em meio de cultivo. Foram contados 76 epimastigotas, avaliando-se o comprimento total (TT), corpo sem flagelo (C), flagelo livre (FL), largura do corpo sem membrana ondulante (L), largura do corpo com membrana ondulante (LM), distância da região anterior até o núcleo (A-N), distância da região posterior até o núcleo (P-N), distância da região posterior até o cinetoplasto (P-K) e distância do núcleo ao cinetoplasto. 39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
nM	Nanômetro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
µL	Microlitros
A-N	Distância da região anterior até o núcleo
BI	Inferência bayesiana
BSA	Soro albumina bovina
C	Corpo sem flagelo
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CV	Coefficiente de variação
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Flagelo livre
Fw	Primer forward
gGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase glicossomal
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
H2O- Milli-q	Água ultrapura
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
L	Largura do corpo sem membrana ondulante
LABIMUNO	Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
LM	Largura do corpo com membrana ondulante
ML	Máxima verossimilhança

Mg ⁺⁺	Magnésio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOAP	Núcleo de Ofidiologia e de Animais Peçonhentos
P	Parcimônia
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
P-K	Distância da região posterior até o cinetoplasto
P-N	Distância da região posterior até o núcleo
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
Rv	Primer reverso
S	Segundos
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SBH	Sociedade Brasileira de Herpetologia
SSU rRNA:	Subunidade menor do RNA ribossômico
TaqPol	Polimerase
T.5x	Tampão 5x concentrado
TM	Marca registrada
TT	Tamanho total
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VG	Volume globular
W	West
X	Vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 SERPENTES DA FAMÍLIA BOIDAE	4
2.2 Hematologia geral	4
2.3 Células do tecido sanguíneo das serpentes	5
2.4 Família <i>Trypanosomatidae</i>	8
2.5 Gênero <i>Trypanosoma</i>	9
2.5.1 Vetores dos <i>Trypanosoma</i> em répteis	10
2.5.2 Ciclo de vida em hospedeiros vertebrado e invertebrados	11
2.5.3 História evolutiva dos <i>Trypanosomatidae</i>	12
2.5.4 Principais genes utilizados na inferência de relação filogenética e taxonomia de <i>Trypanosoma</i>	15
2.5.5 Gene ribossômico rRNA 18S SSU (subunidade pequena)	16
2.5.6 gGAPDH (glicosomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)	17
3. JUSTIFICATIVA	20
4. OBJETIVOS:	21
4.1 OBJETIVO GERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
5. TRABALHO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO AO JORNAL	
International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife (fator de impacto JCR 2,075, Qualis A1)	22
5.1 INTRODUÇÃO	25
5.2 METODOLOGIA	26
5.2.1 Origem dos animais e aspectos éticos	26
5.2.2 Coleta das amostras	27
5.2.3 Avaliação dos esfregaços sanguíneos:	27

5.2.4	Ensaio hematológicos e bioquímicos:	27
5.2.5	Hemocultivo.....	28
5.2.6	Extração do DNA total.....	29
5.2.7	Reação de PCR.....	29
5.2.8	Reação de sequenciamento	30
5.2.9	Análise filogenética.....	30
5.2.10	Análise estatística.....	31
5.3	RESULTADOS	31
5.3.1	Resultados exames hematológicos e bioquímicos	32
5.3.2	Morfometria	33
5.3.3	PCR e filogenia	40
5.4	DISCUSSÃO	44
6.	CONCLUSÃO	55
7.	REFERÊNCIAS	56
8.	ANEXOS	64
8.1	ANEXO 1: Autorização SISBIO	64
8.2	ANEXO 2: Autorização CEUA	66
8.3	ANEXO 3: Registro SisGen	68

1. INTRODUÇÃO

As serpentes são animais que despertam grande atenção em zoológicos e centros conservacionistas, sendo grande parte dessa situação atribuída à sua heterogeneidade de cores e tamanhos, bem como a uma mítica que envolve esses animais (MAREŠOVÁ & FRYNTA, 2008; GARCIA et al., 2015). Atualmente são descritas no mundo aproximadamente 10.793 espécies de répteis, e desse total 3.709 são serpentes (UETZ, 2018). Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH), até 2015 o Brasil apresentava cerca de 773 espécies de répteis, compreendendo a terceira posição em diversidade no mundo, perdendo apenas para a Austrália (1022) e México (913) (COSTA & BÉRNILS, 2015).

No Brasil, as serpentes são encontradas amplamente distribuídas nos diferentes biomas e são agrupadas em 10 famílias, 81 gêneros, compreendendo 371 espécies. Dessas, as serpentes da família Elapidae (coral verdadeiras) e Viperidae (cascavel, surucucu pico de jaca e jararacas) são as de maior interesse médico devido aos acidentes com humanos e animais, relacionados a inoculação de peçonha, e pelo interesse biotecnológico na produção de medicamentos a partir de moléculas da bioativas. Apesar da importância das famílias citadas acima, o país possui uma imensa biodiversidade de serpentes sem peçonha, as quais desempenham um importante papel ecológico por meio do controle de roedores e outros animais, além de serem atualmente utilizadas como animais de companhia (BAUER & BAUER, 2014).

A família Boidae compreende serpentes de grande importância ecológica, nela incluindo-se as maiores serpentes do mundo (BARBOSA et al., 2006). A família é composta por cinco gêneros, *Boa*, *Chilabothrus*, *Corallus*, *Epicrates* e *Eunectes*, apresentando habitats variados (PYRON et al., 2014; CARVALHO et al., 2018). As jiboias são serpentes que pertencem ao gênero *Boa* e à espécie *Boa constrictor*, tem sua ocorrência em regiões neotropicais, sendo encontrada desde o México até a região norte da Argentina. No Brasil, são encontradas nas florestas tropicais, no semiárido, na região pantaneira e em campos abertos (HENDERSON, et al., 1995; LIMA, 2016). Devido ao desmatamento de áreas de florestas onde são encontradas, tem sido comum a ocorrência de jiboias em áreas periurbanas, alimentando-se de pequenos roedores e aves (SILVEIRA & MARTINS-NETO, 2007). Somado a isso, ocorre a adoção crescente de jiboias como animais de companhia e sua manutenção em zoológicos (MAREŠOVÁ & FRYNTA, 2008; VIANA et al., 2014), estreitando-se ainda mais o contato dos humanos com esses animais.

Assim como para as diversas espécies de animais domésticos, silvestres e o ser humano, as parasitoses compreendem um grupo de doenças de grande importância em serpentes, as quais podem ser ocasionadas por uma gama de organismos, tais como ectoparasitas, onde os carrapatos se afiguram como um dos principais parasitas das serpentes, podendo transmitir diversas doenças as mesmas (RAMO et al., 1998; FIORINI et al., 2014; CATHERINE et al., 2017), mas também pode-se citar ácaros (MARIANA et al., 2011), endoparasitas nematoides e trematódeos (SAMINDA et al., 2009; CARBAJAL-MARQUEZ et al., 2018; SOU et al., 2018) e protozoários (SANTOS et al., 2005; RINALDI et al., 2012; YIMMING et al., 2016; MCALLISTER et al., 2018). Entre esses últimos, o de maior ocorrência é o *Hepatozoon* sp. (MOÇO et al., 2002; TOMÉ et al., 2012; KAUFFMAN et al., 2017), podendo ser encontrado também *Plasmodium* sp. (THOISY et al., 2000) e raramente espécies de *Trypanosoma* (BAUER & BAUER, 2014). Esses agentes etiológicos afetam de forma variada a saúde das serpentes, podendo em alguns momentos atuarem de forma branda, e em outros serem fatais (DONALDSON et al., 1975), fazendo-se necessário a identificação desses agentes, as doenças que eles ocasionam e sua forma de transmissão, com vista à estabelecer tratamentos adequados e preventivos para a manutenção da saúde das serpentes, além de identificar e reduzir eventuais riscos de transmissão desses patógenos.

O gênero *Trypanosoma* compreende um grupo cosmopolita de hematozoários que infectam uma ampla gama de vertebrados, sendo descritos em mamíferos, aves, anfíbios, peixes, répteis e no homem (LIMA et al., 2012; ATTIAS et al., 2016; COOPER et al., 2017; MAFIE et al., 2018, PACHECO et al., 2018; SANTOS et al., 2018). Algumas espécies são agentes zoonóticos capazes de ocasionar severas doenças no homem e em animais de produção ao redor do mundo. São parasitas comumente transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, sendo os insetos triatomíneos, moscas e mosquitos os transmissores mais comuns entre os invertebrados terrestres (CURTIS-ROBLES et al., 2018). É descrita também a transmissão de *Trypanosoma* por algumas espécies de carrapatos, precisando de uma maior elucidação a respeito da importância desses ácaros na cadeia de transmissão desse patógeno (VIOLA et al., 2009).

Em répteis, é descrita a ocorrência de *Trypanosoma* em uma grande variedade de lagartos, serpentes e crocodilos (FERMINO et al., 2013; DVORÁKOVÁ et al., 2015). São descritas cerca de 23 espécies de *Trypanosoma* parasitas de serpentes, entretanto esse número precisa ser revisto, uma vez que a classificação desses parasitos muitas vezes foram baseadas na espécie do hospedeiro e na morfologia dos tripomastigotas sanguíneos,

podendo haver espécies sinônimas, uma vez que os *Trypanosomas* apresentam um grande polimorfismo, mesmo quando a amostra provém do mesmo hospedeiro (VIOLA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a). Pouco se sabe sobre a patogenicidade e a diversidade dos *Trypanosoma* para as serpentes, uma vez que os estudos realizados se concentram em relatar a presença do parasito e descrever sua morfologia, dificultando o tratamento clínico adequado.

Atualmente, a principal forma de diagnóstico das espécies de *Trypanosoma* de ocorrência nos animais domésticos e silvestres se dá pela observação direta das formas tripomastigotas por meio do esfregaço do sangue periférico. Entretanto, é técnica de baixa sensibilidade, uma vez que depende de uma considerável carga parasitária para detecção no sangue circulante, além do que o grande polimorfismo apresentado pelas formas tripomastigotas pode causar equívocos (MATTA et al., 2018). Uma forma de sanar esse problema é o uso integrado das técnicas convencionais com técnicas moleculares (VIOLA et al., 2008; VIOLA et al., 2009a).

Levando em consideração a situação anteriormente descrita, o presente projeto tem como objetivo descrever a ocorrência de *Trypanosoma* em serpentes *Boa constrictor* na Região Nordeste, realizar o diagnóstico molecular da infecção, caracterizar molecularmente os *Trypanosoma* encontrados e descrever possíveis alterações em padrões de hemograma e bioquímica clínica decorrentes dessa infecção

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SERPENTES DA FAMÍLIA BOIDAE

As serpentes são animais pertencentes a Classe Reptilia (répteis), Ordem Squamata, da qual fazem parte também os lagartos, e Subordem Serpentes (LILLYWHITE, 2014). Das 10 famílias de serpentes que ocorrem no Brasil, a família Boidae compreende as maiores espécies de serpentes de América Neotropical, sendo representadas no Brasil por quatro gêneros, *Eunectes*, *Boa*, *Corallus* e *Epicrates* (TEXEIRA, 2013).

As jiboias (*Boa constrictor*) são serpentes amplamente distribuídas nas Américas, desde o México, América Central, ilhas acessórias ao continente, como Antilhas, Dominica e Santa Lucia, até o sul da América do Sul (PRADO, 2006). Não apresentam restrição de habitat, podendo ser encontradas nos mais variados domínios morfoclimáticos, tais como florestas tropicais e neotropicais, regiões semiáridas, regiões pantanosas e campos abertos (LIMA, 2016).

São animais dotados de grande força constritora, com os adultos podendo alcançar quatro metros de comprimento, apresentando uma forte musculatura constritora, e machos e fêmeas são considerados adultos a partir de um metro de comprimento (GARCIA et al., 2015). Sua dieta é generalista, baseada na predação de pequenos e médios mamíferos, aves, anfíbios e lagartos (LIMA, 2016). Sua reprodução ocorre por viviparidade, sendo comum que as fêmeas sejam maiores do que os machos. Possuem uma grande variação em seu padrão de cores, sendo esse um dos critérios associados para a classificação de subespécies, aliado a características morfométricas, tais como a contagem do número de escamas dorsais, ventrais, caudais dentre outras, além da contagem de manchas e descrição do tamanho das mesmas (LIMA, 2016).

2.2 HEMATOLOGIA GERAL

O sangue desempenha uma função vital na vida dos organismos pluricelulares, compreende um tecido fluído, incluso em um compartimento fechado (vasos sanguíneos), sendo impulsionado em um sentido unidirecional por conta das contrações rítmicas do coração. A junção dos componentes figurados (células sanguíneas: eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e da parte líquida (plasma), confere a esse tecido um conjunto de funções fisiológicas que garantem a sobrevivência do organismo, tais como a hematose e a distribuição de oxigênio para os diversos tecidos orgânicos, a remoção do dióxido de carbono e o fornecimento de células e proteínas do sistema imunológico para os tecidos,

bem como o transporte de nutrientes (glicose, lipídeos, carboidratos, vitaminas, minerais, dentre outros) (LOPES, BIONDO, SANTOS, 2007). É da competência do sangue também o encaminhamento de metabólitos indesejados, o qual são metabolizados ou excretados por diferentes órgãos, tais como os rins e fígado. O tecido sanguíneo também é responsável pela manutenção da temperatura, do equilíbrio hídrico, além do transporte de hormônios e do processo de hemostasia (OZZETI, 2013).

Nos mamíferos em geral e no ser humano, as células sanguíneas são classificadas como eritrócitos e leucócitos, os últimos divididos em células mononucleares (monócitos e linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), além das plaquetas, as quais compreendem fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos medulares. Diferentemente dos mamíferos, onde só os leucócitos são nucleados, nos répteis, aves e anfíbios, todas as células sanguíneas são nucleadas, sendo as plaquetas não mais fragmentos celulares, e sim células nucleadas denominadas por alguns como trombócitos (LOPES, BIONDO, SANTOS, 2007; CAMPBELL, 2015). Assim como nas espécies de animais domésticos e no homem, a avaliação hematológica possui papel fundamental no auxílio ao diagnóstico e prognóstico de diversas patologias, como suporte à clínica e como fonte de conhecimento sobre a fisiologia normal de diversas espécies de animais silvestres (KINDLOVITS et al., 2017a).

2.3 CÉLULAS DO TECIDO SANGUÍNEO DAS SERPENTES

As hemácias das serpentes desempenham o mesmo papel do que as encontradas nos mamíferos, porém são morfologicamente distintas. Nos répteis, essas células possuem um formato ovalado, com a presença de um núcleo central, de cor variando do azul marinho ao roxo enegrecido, de mesmo formato. Possuem um citoplasma abundante e de coloração basofílica. Assim como nos demais vertebrados, são as células mais abundantes do sangue. Podem ser encontradas em esfregaço sanguíneo hemácias binucleadas ou em processo de divisão (KINDLOVITS et al., 2017a) (**Fig. 1**).

Em serpentes, os trombócitos desempenham o papel atribuído às plaquetas dos mamíferos, sendo células de aspecto pleomórfico, com núcleo semelhante ao dos eritrócitos (redondo ou ovalado e de coloração azul escuro a roxo enegrecido), apresentam citoplasma escasso, o qual pode atribuir um aspecto alongado ou até mesmo amebóide a célula. Essas células em répteis participam do processo de fagocitose de partículas estranhas (KINDLOVITS et al., 2017b) (**Fig. 1F**).

Os linfócitos são a categoria de leucócitos mais abundante no sangue das serpentes. São descritas como células pequenas, medindo cerca de 1/3 do comprimento dos eritrócitos, com formato predominantemente arredondado, assemelhando-se fortemente aos linfócitos de mamíferos. Seu citoplasma é escasso e cora-se em tons de cinza a basófilico (KINDLOVITS et al., 2017b) (**Fig.1B**).

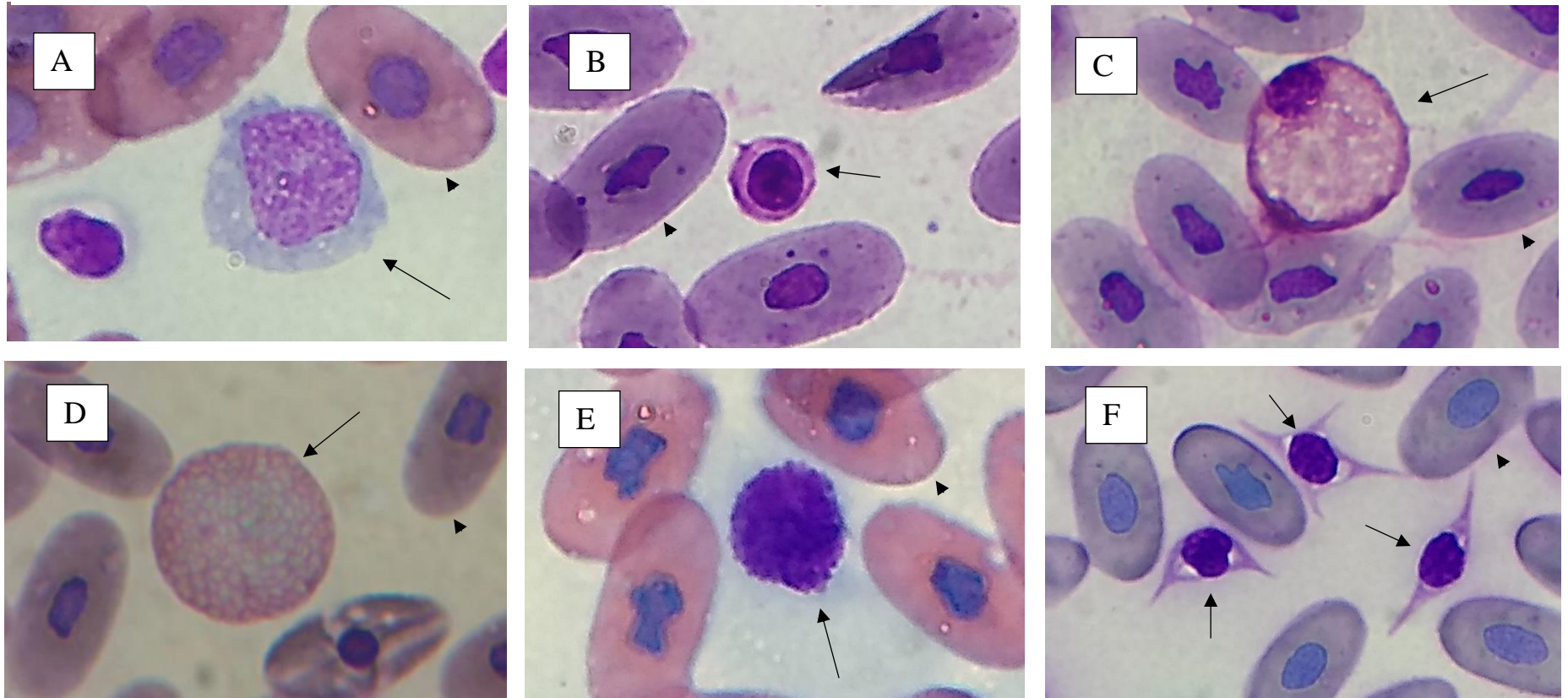
Os monócitos das serpentes são comumente denominados azurófilos, estando essa nomenclatura associada à coloração azulada dessas células quando coradas com panótico rápido, Wright e Giemsa. Apresentam-se como células grandes, com citoplasma e núcleo pleomórficos. O núcleo dessas células é excêntrico, podendo apresentar cromatinas com áreas densas, e no citoplasma dos azurófilos comumente são encontrados vacúolos de tamanhos variados, bem como grânulos arroxeados (CAMPBELL, 2015) (**Fig. 1A**).

Os heterófilos têm sido descritos como células arredondadas, de tamanho variável e com núcleo excêntrico, sendo o citoplasma abundante em grânulos pleomórficos e de coloração rosa (OZZETI, 2013). Em estudos citoquímicos e ultraestruturais, identificou-se que os heterófilos possuem semelhanças funcionais com os neutrófilos de mamíferos, participando do processo de fagocitose das bactérias e de antígenos em geral (KINDLOVITS et al., 2017b) (**Fig. 1C**).

Os eosinófilos em répteis assemelham-se morfológicamente aos heterófilos, apresentando grânulos acidófilos de formato arredondado em seu citoplasma. Diferentemente dos eosinófilos de aves e mamíferos, o núcleo dessa célula em répteis não é segmentado. Assim como nos mamíferos, seu aumento está associado ao combate a inflamações parasitárias e reações alérgicas (OZZETI, 2013; CAMPBELL, 2015) (**Fig. 1D**).

Os basófilos são descritos como células de núcleo periférico, apresentando grande quantidade de grânulos basófilicos difusos em seu citoplasma, os quais apresentam-se arredondados. A presença dos grânulos por muitas vezes dificulta a visualização do núcleo (CAMPBELL, 2015) (**Fig. 1E**).

Figura 1 - Células hematológicas de jiboias (*Boa constrictor*). Observação dos leucócitos sanguíneos de jiboias (setas): A – monócito; B – linfócito; C- heterófilo; D- eosinófilo; E – basófilo; F- trombócitos. É possível observar hemácias nucleadas em todas as figuras (ponta de seta). Esfregaços corados pelo corante de Giemsa e panótico rápido. Observação em objetiva de aumento 1000x.



Fonte: SANTOS (2020)

2.4 FAMÍLIA *TRYPANOSOMATIDAE*

A família Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea) compreende organismos protistas, eucariotos, unicelulares e flagelados, os quais apresentam um estilo de vida marcado, em sua maioria, pelo parasitismo obrigatório de uma infinidade de organismos vertebrados, invertebrados e plantas. É subdividida nos gêneros: *Trypanosoma*, *Blephomonas*, *Sergella*, *Wallacemonas*, *Hepertomonas*, *Phytomonas*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Crithidia*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Kentomonas*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (VOTÝPKA et al., 2015). Dentre esses, os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são, até o momento, os únicos que apresentam espécies capazes de parasitar o ser humano e a uma infinidade de animais domésticos e silvestres, possuindo assim interesse médico e veterinário (SIQUEIRA, 2005; FILGUEIRAS et al., 2018).

Os protozoários pertencentes a família Trypanosomatidae apresentam características comuns entre os diferentes gêneros e espécies, sendo a principal destas a presença de uma organela especial e característica denominada cinetoplasto, uma grande mitocôndria modificada e ramificada, a qual apresenta uma concatenação de moléculas de DNA dispostos em milhares de maxicírculos e minicírculos, conferindo a esses organismos aspectos únicos, além de ser a fonte energia para a manutenção desses organismos (SIMPSON, 1987). O nome da classe da qual faz parte esses protozoários, Kinetoplastea, deriva dessa mitocôndria (STUART & FEAGIN, 1992; LUKEŠ et al., 2010). Outra característica compartilhada entre os diferentes gêneros dessa família refere-se ao ciclo de vida, o qual pode ser monoxeno (sendo ciclo de vida completo em apenas um hospedeiro) ou heteroxeno (os quais necessitam de no mínimo dois hospedeiros para realizar ciclo de vida) (LUKEŠ et al., 2014). É comum também aos Trypanosomatidae a ocorrência de alternância em sua forma celular durante o desenvolvimento do seu ciclo biológico evolutivo, seja como uma forma de adaptação para a troca de hospedeiros, no caso dos protozoários de ciclo heteroxeno, ou como um mecanismo que lhe possibilita uma melhor adaptação fisiológica ao novo meio e/ou antecipação para próxima etapa do ciclo de vida, sendo essa característica comum aos organismos heteroxeno e monoxeno (SIQUEIRA, 2005).

A nomenclatura dada às formas celulares dos Trypanosomatidae varia de acordo com a posição em que o flagelo emerge da bolsa flagelar e do cinetoplasto, sendo a primeira estrutura intimamente ligada a segunda, ambas comparadas de acordo a sua

posição relativa ao núcleo. São então classificadas como amastigota, coanomastigota, epimastigota, esferomastigota, opistomastigota, paramastigota promastigota e tripomastigota (SIQUEIRA, 2005; HOARE & WALLACE, 1966).

2.5 GÊNERO *Trypanosoma*

Trypanosoma compreendem organismos eucariotos, protistas, unicelulares, pertencentes ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanomatina, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma*. Parasitas desse gênero são descritos em todas as classes de vertebrados e algumas classes de invertebrados (SIQUEIRA, 2005; FILGUEIRAS et al., 2018).

Didaticamente, as espécies pertencentes ao gênero *Trypanosoma* e que realizam parasitismo em organismos vertebrados são agrupadas em Stercoraria e Salivaria, de acordo com o local de desenvolvimento no hospedeiro intermediário artrópode e a forma de infecção para o hospedeiro vertebrado (SOUZA & VIDAL, 2017). Os pertencentes ao grupo Stercoraria tem seu desenvolvimento na porção do intestino posterior de insetos triatomíneos, sendo então as formas infectantes do parasito eliminadas nas fezes do inseto, constituindo essa a principal forma de infecção. Os principais representantes desse grupo são o *T. cruzi* e o *T. lewisi*. No grupo Salivaria, encontra-se os *Trypanosomas* que se desenvolve na porção anterior do intestino de dípteros (*Haematobia irritans*, *Tabanus* spp, *Chrysops* spp. e *Glossina* sp.), os quais são transmitidos por meio da picada desses insetos, sendo *T. brucei* (subespécies *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*), *T. evansi*, *T. congolense* e *T. vivax* exemplos desse grupo (RADWANSKA et al., 2018).

A classificação citada acima abrange de forma majoritária os parasitos capazes de infectar mamíferos e que tem sua transmissão veiculada por dípteros e triatomíneos, não sendo devidamente aplicadas a espécies que acometem répteis, anfíbios, peixes e aves, os quais possuem outros tipos de vetores do parasito (SIQUEIRA, 2005; FILGUEIRAS et al., 2018; OCAÑA-MAYORGA et al., 2018). É possível identificar também uma certa arbitrariedade nessa classificação, uma vez que em ambos os grupos a transmissão ao hospedeiro vertebrado (mamífero) pode ser dada através da ingestão dos hospedeiros invertebrados (insetos).

2.5.1 Vetores dos *Trypanosoma* em répteis

A transmissão de diversas espécies de *Trypanosoma* para os répteis e algumas espécies de mamíferos tem sido fortemente associada a mosquitos. GRAMICCIA et al (1989) em estudo a partir de flebótomos capturados na Itália, conseguiram identificar no abdômen anterior de *Sergentomyia minuta minuta* formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma platydactyli*, sendo esse parasito primeiramente descrito em lagartos da espécie *Tarentola mauritanica*. Em um estudo conduzido por Ayala & McKay (1971) nos Estados Unidos, foi realizada a captura de lagartos da espécie *Gerrhonotus multicarinatus* e flebotomíneos da espécie *Lutzomyia vexatrix occidentis* naturalmente infectados por *Trypanosoma*, sendo encontradas as formas epimastigotas longas e finas na região da cárdia do inseto. Os mesmos autores conduziram um ensaio de infecção de flebótomos por *Trypanosoma*, nos quais, ao se alimentarem de lagarto infectados e com 18 e 64 horas de repasto sanguíneo, foi possível identificar formas celulares do parasito, tais como epimastigotas, formas piriformes flagelares, esferomastigotas e por fim, formas promastigotas. Esse trabalho forneceu informações consistentes quanto o papel desses mosquitos na transmissão de *T. gerrhonoti* e *T. scclopori* para lagartos.

Em estudo realizado no Brasil, Viola et al. (2008a), foi feita a identificação de *Trypanosoma* sp. em moscas de areia *Viannamyia tuberculata*, o qual apresentou 98% de similaridade com *Trypanosoma cascavelli*, indicando uma possível relação de flebótomos na transmissão do protozoário em serpentes dessa região. Em estudos conduzidos por Zeledon & Rosabal (1969) na Costa Rica, os pesquisadores encontraram um Trypanosomatidae, o qual nomearam *Trypanosoma leonidasdeanei*, e o mesmo foi encontrado parasitando morcegos e mosquitos *Lutzomyia vespertilionis*, sugerindo um possível papel do flebótomo na transmissão do protozoário aos quiropteranos na América Central. Em 1975, Chrisensen & Herrer obtiveram a confirmação do papel do *L. vespertilionis* como hospedeiro intermediário do *T. leonidasdeanei*, como vetor deste para morcegos no Panamá. Para isso, os autores capturaram morcegos infectados com *T. leonidasdeanei* e os expuseram a fêmeas de *L. vespertilionis* criadas em laboratório, obtendo assim mosquitos infectados. Formas tripomastigotas e epimastigotas do protozoário foram isoladas de diferentes regiões do intestino do mosquito, estando aderidas ou não ao epitélio intestinal cinco a 12 dias após o repasto sanguíneo.

2.5.2 Ciclo de vida dos *Trypanosoma*

Em seu ciclo de vida, algumas espécies de *Trypanosoma* podem infectar células sanguíneas de diferentes tecidos dos seus hospedeiros vertebrados, como é o caso do *T. cruzi* e *T. equiperdum*. Diferentemente dessas espécies, *T. evansi* possui ciclo de vida extracelular, permitindo um contato constante desse parasito com o sistema imunológico dos hospedeiros; como uma forma de evasão apresenta pelo protozoário, o mesmo tende a modificar constantemente glicoproteínas da superfície da membrana, provendo em seus hospedeiros sintomatologias clínicas de forma cíclica a medida que o sistema imunológico tenta reconhecer novamente o parasita (FILGUEIRAS et al., 2018; RADWANSKA et al., 2018).

Apesar da grande variedade de vetores de espécies de *Trypanosoma* e inúmeros hospedeiros vertebrados, o ciclo de vida dos *Trypanosoma* assemelha-se na medida em que formas tripomastigotas sanguíneas são ingeridas pelo vetor hematófago, chegam ao intestino médio, onde transformam-se em tripomastigotas procíclicas, e a partir daí tem-se uma diferenciação. Para os *Trypanosoma* do subgrupo Salivaria, ocorre a migração das formas flagelares para o intestino anterior e proventrículo do inseto e nesse local as formas tripomastigotas procíclicas diferenciam-se em epimastigotas; essas formas migram para a glândula salivar do inseto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas infecciosas, aptas a infectar um novo hospedeiro vertebrado, no momento do repasto sanguíneo do mesmo (RADWANSKA et al., 2018). Já no subgrupo Stercoralis, após a ingestão das formas tripomastigotas livres no sangue, ocorre a mudança para formas esferomastigotas e epimastigotas, sendo que essas últimas passam para o intestino médio, onde sofrem multiplicação, e parte das epimastigotas seguem o trajeto do bolo alimentar até o bolo fecal no reto, onde ocorre uma última mudança estrutural, surgindo então as formas tripomastigotas metacíclicas altamente infectivas para os vertebrados. A infecção é dada por meio do contato das fezes contaminadas com mucosas, feridas ou o local da picada do inseto no hospedeiro vertebrado; ocorre então a penetração das formas tripomastigotas metacíclicas em células teciduais, seguida da mudança de forma para amastigota intracelular e divisão por fissão binária. Ainda na célula infectada, ocorre a mudança do protozoário para tripomastigotas sanguíneas, as quais caem na circulação e infectam outros tecidos ou podem ser novamente capturadas pelos triatomíneos e retomar o ciclo no hospedeiro invertebrado (VILLALBA-ALEMÁN et al., 2018).

Pouco se sabe sobre a cadeia de transmissão e o ciclo de vida dos *Trypanosoma* em espécies de vertebrados não mamíferos, entretanto tem-se descrito fortemente a influência de insetos hematófagos flebótomos como possíveis hospedeiros invertebrados e vetores desse parasita a répteis, anfíbios e aves (PHUMEE et al., 2016). Baseada na localização das formas evolutivas do parasita no hospedeiro intermediário e da via de inoculação das tripomastigotas no hospedeiro vertebrado, leva-se a crer que o ciclo de transmissão dos diversos tipos de *Trypanosoma* encontrados nessas espécies seja semelhante ao descrito para o subgrupo Salivaria, onde o mosquito se infecta ao realizar o repasto sanguíneo das tripomastigotas sanguíneas, (GRAMICCIA, GRANDONI, MAROLI, 1989). Em experimento conduzido por VIOLA et al., (2008a), os quais realizaram infecção em serpentes, não foram identificadas formas intracelulares nos tecidos animais, sugerindo um possível caráter extracelular do parasito nesses indivíduos, semelhantes ao que é descrito para os protozoários do subgrupo Salivaria.

2.5.3 História evolutiva dos Trypanosomatidae

Os protozoários pertencentes a família *Trypanosomatidae* compreendem microrganismos especializados no parasitismo de indivíduos vertebrados e invertebrados. Diversas pesquisas foram realizadas ao redor do mundo com o intuito de compreender a origem do parasitismo desses organismos, sendo essas baseadas nas características morfológicas compartilhadas entre os diversos gêneros, organização e estrutura das organelas, vias metabólicas, tipos de hospedeiros e, mais recentemente, o sequenciamento de genes específicos ou do genoma completo.

Dada a diversidade de espécies apresentada pela família Trypanosomatidae, a capacidade desses de parasitar de forma bem-sucedida uma infinidade de organismos vertebrados e invertebrados, a grande conservação morfológica compartilhada pelos mesmos e a organização de estruturas internas distintas dos demais eucariotos, como a presença de uma única mitocôndria e kDNA, agrupamentos de enzimas da via glicolíticas em estruturas glicossômicas, edição de RNA, transporte de moléculas via bolsa flagelar, dentre outras características não observadas na maioria dos organismos eucariotos, reforça-se a crença de que os *Trypanosoma* sejam organismos antigos, divergindo dos demais organismos eucariotos logo após o evento de surgimento da mitocôndria (VICKERMAN, 1994). A presença do kDNA, organizado em maxi e minicírculos, bem como a existência de rRNA 9S e 12S (RNAs ribossômicos mitocondriais), estruturas

altamente divergentes quando comparadas ao rRNA encontrado nas demais eucariotos, reforça a crença na divergência precoce desses organismos (GRAY, 1992).

O estudo das relações de ancestralidade e origem dos Trypanosomatidae precedem a atual era da biologia molecular. Diferentemente das técnicas empregadas na inferência evolutiva para organismos capazes de formar fósseis, as ferramentas utilizadas na investigação dos organismos dessa família baseavam-se no estudo comparativo da morfologia desses parasitos, associado à investigação dos ciclos de vida e tipos e distribuição dos hospedeiros infectados (VICKERMAN, 1994). Sendo atualmente esses dados confrontados com as informações obtidos a partir do sequenciamento de genético.

A princípio, foi proposto que *Trypanosoma* parasitas de vertebrados (ciclo de vida heteroxeno) derivavam dos *Trypanosoma* moxonenos encontrados no trato gastrointestinal de insetos não hematófagos e sanguessugas, e que o surgimento desse novo hábito alimentar por parte dos insetos possibilitou o aperfeiçoamento do parasitismo de animais por parte dos protozoários (HOARE, 1972). Uma teoria proposta, contrária a essa, diz que os *Trypanosoma* haviam surgidos primariamente em hospedeiros vertebrados aquáticos, como parasitas do trato gastrointestinal desses, tendo o ancestral dos Trypanosomatidae atual colonizado o sangue desses animais, de onde por meio de sanguessugas e insetos hábito hematófagos, houve a disseminação para diversas classes de vertebrados. Nos invertebrados, esses organismos hemoflagelados aos poucos se aperfeiçoaram para um ciclo de vida monóxeno (MINCHILL, 1908; HOARE & WALLACE, 1966). Em estudos baseados no sequenciamento do gene codificador da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), obteve-se árvores que reafirmam o surgimento primeiro do ancestral dos *Trypanosoma* em hospedeiros invertebrados, sendo por meio desses realizada uma ampla disseminação para uma infinidade de organismos vertebrados (HAMILTON et al., 2004)

Com o surgimento das técnicas moleculares e o sequenciamento, Lake e colaboradores, em 1988, analisando as sequências gênicas das subunidades 9S e 12S do rRNA mitocondrial, confirmou a teoria de Hoare, construindo uma árvore baseada em algoritmos de parcimônia e parcimônia evolutiva e comparando as espécies heteroxênicas *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania tarentolae*, e as espécies monoxênicas de insetos *Leptomonas* sp e *Crithidia* sp, notou que as espécies de kinetoplastida de ciclo monóxeno se enraizaram primeiro, sendo que as de ciclo heteroxeno o fizeram mais tardiamente. Ao atribuir uma escala de tempo provisória aos nós da árvore, e levando em consideração o surgimento dos ancestrais monoxênicos dos *Trypanosoma* antes do evento de separação

dos continentes africanos e americanos, porém posterior ao surgimento dos ancestrais da mosca tsé-tsé, principal vetor da tripanossomíase na África, os autores obtiveram predições dos nós mais profundos para os cinetoplastídeos datados de 264 ± 51 milhões de anos atrás, compatível com o período de surgimento do ancestral hospedeiro inseto.

Estudos posteriores ao realizado por Lake et al., em 1988, comparando genes que codificam RNAs ribossômicos mitocondriais e nucleares, se propuseram a identificar se os *Trypanosoma* tiveram uma única origem evolutiva (monofiléticos) ou se os mesmos tinham surgido de uma convergência evolutiva de espécies diferentes (parafiléticos). A dificuldade no processamento dos dados obtidos pelo sequenciamento, e a consequente impossibilidade em montar árvores com topologias robustas, levantava dúvidas se as diferenças apresentadas entre o gênero *Trypanosoma* e os demais membros da família Trypanosomatidae indicava uma parafilia do mesmo (GOMEZ et al., 1991; LANDWEBER; GILBERT, 1994). Resultados semelhantes foram obtidos por Maslov et al., 1996, o qual analisando a subunidade maior e menor do rRNA de diferentes *Trypanosoma* de vertebrados, identificou uma parafilia, na medida que *T. brucei* foi o primeiro a formar um ramo divergente, sendo o *Trypanosoma* parasitas de peixes e veiculados por sanguessugas e os parasitas das espécies de animais terrestres e veiculados por insetos formaram um clado a parte; o autor passou então a postular que os *Trypanosoma* desenvolveram-se de forma distinta de seus hospedeiros vertebrados, com curto período de evolução conjunta.

O uso de marcadores alternativos ao SSU rRNA, como o gene codificador da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ofereceu novas formas de se observar as relações evolutivas dos *Trypanosoma*. (ALVAREZ; CORTINAS; MUSTO, 1996), analisando o uso desse gene, não somente se reafirmou a monofilia do gênero *Trypanosoma*, como observou-se que as distâncias evolutivas entre *T. cruzi* e *T. brucei* eram menores que as previstas utilizando o gene SSU rRNA, além de uma maior proximidade de *T. cruzi* com *Leishmania* e *Crithidia* do que com *T. brucei*. Em estudo realizado por Hamilton et al. (2004), todas as árvores geradas baseando-se na sequência de gGAPDH apoiaram fortemente a monofilia dos *Trypanosoma*, e os mostram como uma linhagem relativamente tardia dentro dos Trypanosomatidae, ou seja, uma única origem evolutiva.

Um estudo posterior ao realizado por Alvarez et al (1996), ampliando o número de táxons, possibilitou a constatação da monofilia do gênero *Trypanosoma*, tendo como base o gene SSU rRNA. Essa nova abordagem possibilitou incluir *T. brucei* no clado, o

qual sempre aparecia como sendo precocemente divergente dos demais *Trypanosoma*, dando ao gênero uma origem parafilética. A observação de que os grupos de *Trypanosoma* se agrupavam na árvore de acordo com seu modo de transmissão ia de encontro às teorias propostas da aquisição de um ancestral dos *Trypanosoma* por hospedeiros invertebrados (LUKEŠ et al., 1997)

A dificuldade inicial em se estabelecer uma relação confiável entre os parasitas do gênero *Trypanosoma* (monofilética ou parafilética), as interações das espécies dentro do gênero e a relação do mesmo com os demais gêneros contidos na família Trypanosomatidae tiveram sua raiz em variações e qualidade das sequências gênicas analisadas, na quantidade de táxon incluídos, na escolha do grupo externo e na metodologia envolvida no refinamento dos dados e na inferência da filogenia (HAMILTON et al., 2004;; SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006; LUKEŠ et al., 2014). Em um estudo de bioinformática (LEONARD et al., 2011; STEVENS, 2011), foram analisados 599 marcadores genéticos dentro do grupo dos cinetoplastídeos, e identificou-se 75 família de genes codificadores de proteínas, que demonstravam monofilia dos cinetoplastídeos dentro de uma filogenia eucariótica mais ampla. Os dados foram tratados para análise filogenética por meio de uma concatenação genética em larga escala, obtendo um resultado robusto que apoia a monofilia do gênero *Trypanosoma*.

2.5.4 Principais genes utilizados na inferência de relação filogenética e taxonomia de *Trypanosoma*

Inicialmente, a classificação dos gêneros da família Trypanosomatidae, sejam eles monoxenos ou heteroxenos, se deu pela visualização dos mesmos por microscopia de luz e comparação de suas características morfológicas. A partir da década de 60 houve o aprimoramento desse método, por meio da padronização de alguns morfotipos compartilhados na família, proposta por Hoare e Wallace (1966), onde os gêneros passaram a ser definidos baseados na morfologia apresentada pelas diversas formas evolutivas dos protozoários e levando em consideração a forma evolutiva predominante em cada fase do ciclo de vida e a especificidade dos mesmos pelos seus hospedeiros invertebrados e vertebrado (HOARE & WALLACE, 1966; MASLOV et al., 2013). Posteriormente, informações como caracterizações ultraestruturais e dados bioquímicos a respeito do metabolismo desses parasitos passaram a ser incluídos como critérios para a identificação das espécies (LWOFF, 1951; WALLACE et al., 1983; WALLACE & HERTIG, 1968).

Com base nessas características apontadas acima, diversas espécies de Trypanosomatidae foram descritas. Entretanto, muitas dessas acabaram sendo apontadas como sinônimas, fato esse decorrente da descoberta da versatilidade de algumas espécies em parasitar vários hospedeiros, sendo hoje em dia factual que o uso da especificidade do hospedeiro por si só e a caracterização das formas evolutiva encontradas nesses não é o suficiente para o reconhecimento e descrição formal das espécies, dada a semelhança estrutural apresentada pelos mesmos e a possibilidade de infecções mistas em um mesmo hospedeiro (VOTÝPKA et al., 2010).

O uso de sequências moleculares surgiu como um complemento das formas tradicionais de classificação taxonômica dos Trypanosomatidae. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos apresentam centenas de caracteres, os quais podem ser comparados entre os diversos microrganismos, permitindo a identificação de sutilezas empregadas não somente na reclassificação das espécies existentes, bem como a identificação de novas, além de auxiliar na determinação de relações filogenéticas dentro da família (BRIONES et al., 1992; SOGIN; SILBERMAN, 1998). Diversas tem sido as sequências gênicas utilizadas na detecção dos *Trypanosoma* em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, identificação das espécies e inferência de relações filogenéticas, sendo os mais utilizados o RNA rRNA 18S SSU (subunidade pequena), o gGAPDH (glicosomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), espaçadores internos transcritos (ITSs) 1 e 2 e SL (spliced leader) RNA genes (TEIXEIRA et al., 2011; MASLOV et al., 2013; VOTÝPKA et al., 2014).

2.5.5 Gene ribossômico rRNA 18S SSU (subunidade pequena)

O gene cromossômico codificador da subunidade menor ribossômica (RNA rRNA 18S SSU) foi utilizado como primeiro marcador para identificação e classificação filogenética em Trypanosomatidae, sendo ainda amplamente utilizado nos dias atuais, seja de forma única ou associada a outros genes. Sua escolha se deu pelo fato de que está presente em todos os eucariotos e apresenta função equivalente em todos os microrganismos, bem como sequências altamente e parcialmente conservadas, o que favorece estudos de comparação entre microrganismos, sendo o genes que apresenta maior número de sequências depositas em bancos específicos (SOGIN et al, 1986).

Sua estrutura e processamento nos *Trypanosoma* é complexa. Os genes codificantes dessa molécula são formados por unidades de repetições, as quais possuem unidades de transcrição (cístrons) intercaladas por espaçadores intergênicos (IGS), o qual

apresenta uma repetição em “tandem” de mais de 100 vezes no genoma. O transcrito dá origem a um pré-rRNA, o qual é processado, dando origem às formas maduras 18S (SSU) 5.8S e 24S (HERNÁNDEZ; CEVALLOS, 2014). A subunidade maior nesses organismos é composta por dois fragmentos de alto peso molecular, 24S α e 24S β , e quatro subunidades de baixo peso molecular, denominadas S1, S2, S3 e S4 (DIETRICH et al., 1993). As sequências 18S e 24S constituem sequências bastante conservadas no DNA da família Trypanosomatidae, sendo essas intercaladas por espaçadores com conservação intermediária denominados de ITS (espaçadores internos transcritos), numerados de 1 a 7, e por espaçadores externos transcritos, os quais são flanqueados pelo espaçador intergênico, sendo esse último formado por sequências de alta variabilidade (VIOLA, 2007).

A subunidade menor ribossômica, SSU, é composta por oito regiões universalmente conservadas, denominadas de U1 a U8, e nove regiões variáveis, V1 a V9, sendo bastante utilizadas por apresentarem bom tamanho, facilidade de ampliação em reação de PCR e a presença de regiões variáveis flanqueando regiões conservadas. Essas regiões variáveis são responsáveis pelo tamanho variado dos genes SSU nos diferentes gêneros e espécies de *Trypanosoma* (HERNÁNDEZ et al., 1990; VIOLA, 2007).

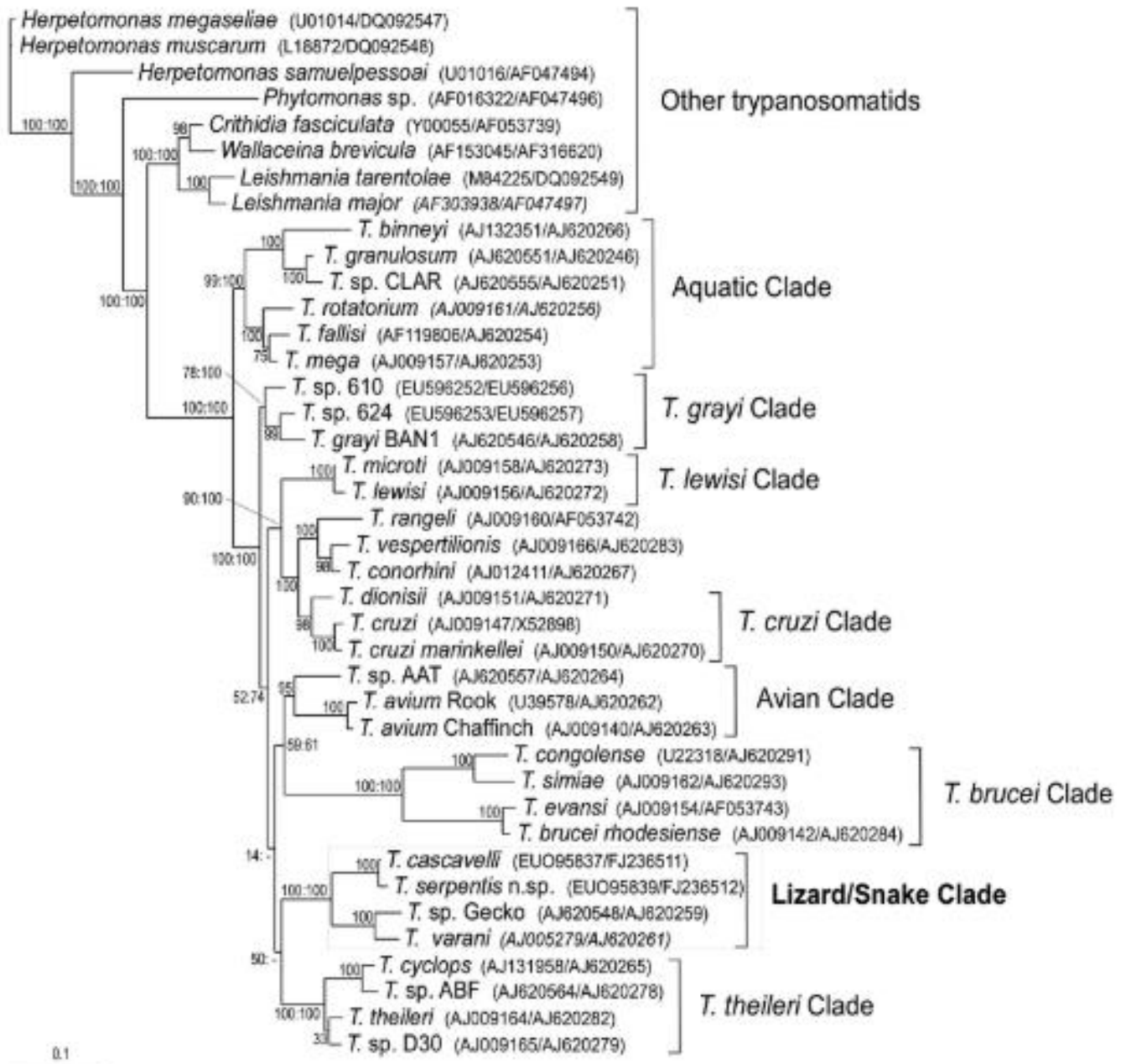
2.5.6 gGAPDH (glicosomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

Nos protozoários da família Trypanosomatidae as sete primeiras enzimas ligadas a via glicolítica, responsáveis pela conversão da glicose em 3-fosfoglicerato, estão organizadas no interior de uma organela denominada glicossomo (um peroxoma modificado), sendo as últimas três enzimas da via dispersas no citosol. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) encontra-se no glicossomo dos kinetoplastida e em seu citosol, é responsável pela fosforilação oxidativa do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato (OPPERDOES; BORST, 1977). Três genes genômicos são responsáveis por codificar dois subtipos da enzima, sendo dois codificantes do subtipo glicossomal (gGAPDH) e um codificante da subunidade citosólica (cGAPDH) (HANNAERT et al., 1992). Ambos os genes que codificam a enzima glicossomal apresentam cópias únicas, e apresentam uma taxa de evolução e pressão seletiva menor que a observada para o gene SSU rDNA, se mostrando um marcador de inferência filogenética em Trypanosomatidae melhor que esse último (HANNAERT; OPPERDOES; MICHELS, 1998).

Seu uso, independente ou associado ao SSU, permite bons alinhamentos confiáveis de organismos geneticamente distantes. Diferente do uso individual do gene SSU rDNA, o qual em algumas análises apresenta árvores com topologias parafiléticas, a filogenia baseada na sequência de nucleotídeo ou aminoácidos da enzima gGAPDH suporta fortemente a monofilia do gênero *Trypanosoma* em mamíferos, classificando-o em cinco principais clados: *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. grayi*, *T. lewisi* e *T. theileri*, (HAMILTON et al., 2004).

As sequências de DNA ou aminoácidos da subunidade glicossomal da enzima GAPDH também têm sido amplamente utilizadas na inferência de relações de ancestralidade em *Trypanosoma* isolados de diferentes classes de hospedeiros não mamíferos. Desta forma foram as espécies agrupadas nos clados: aquático, o qual alberga os *Trypanosoma* de peixe/sanguessugas (*T. marv*, *T. granulosum*, *T. binneyi*, *T. boissoni*, *T. clar*), anuros (*T. rotatotium*, *T. mega* e *T. fallisi*) (ATTIAS et al., 2016), cobra d'água e tartarugas e crocodilos (*T. terena*, *T. grayi*, *T. ralphi*) (FERMINO et al., 2015); serpente/lagarto (*T. cascavelli*, *T. serpentis*, *T. gecko*, *T. varani*) albergando as espécies que acometem serpentes terrestre e lagartos (**Figura 2**) (VIOLA et al., 2009a); e aviário, agrupando as espécies que infectam aves.

Figura 2 – Árvore filogenética baseada na concatenação dos genes subunidade menor (SSU) rRNA e glicosomal gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) agrupando os *Trypanosoma* em diferentes clados. Arvore filogenética gerada pelos métodos de máxima verossimilhança (ML) e inferências bayesianas. As espécies foram agrupadas em oito clados, sendo estes: Clado aquático, clado *Trypanosoma grayi*, clado *T. lewisi*, clado *T. cruzi*, clado avian, clado *T. brucei*, clado lagarto/serpentes e clado *T. theileri*.



Fonte: VIOLA et al (2009a)

3. JUSTIFICATIVA

O homem tem interferido de forma significativa sobre os ecossistemas terrestres, destruindo meios onde diversos organismos convivem em uma teia homeostática. Existe uma relação entre o declínio da biodiversidade causado por atividades antropogênicas e o aumento da disseminação de doenças infecciosas e parasitárias de caráter zoonótico. A diminuição progressiva dos biomas que servem como habitat das serpentes ocasiona a migração desses animais para centros urbanos, e existe a possibilidade desses animais estarem servindo de reservatórios e/ou vetores de agentes zoonóticos para animais domésticos e para o homem. Desta forma, a identificação de novas espécies de parasitas, além do mapeamento dos animais infectados e de seus locais de ocorrência, é de grande importância médico-veterinária e de saúde pública, inserindo-se dentro do conceito de saúde única. Práticas como a adoção de serpentes como animais de companhia reforçam a preocupação a respeito das consequências desse contato mais próximo com o homem.

Pouco se sabe a respeito da diversidade molecular e da patogenicidade dos *Trypanosoma* de serpentes, sendo que a maioria dos estudos presentes em literatura se restringe a identificar a ocorrência dos mesmos e realizar a identificação baseado no hospedeiro, nas características morfométrica das formas sanguíneas e na origem geográfica, o que por si só não demonstra a real diversidade dos mesmos, uma vez que os *Trypanosoma* podem parasitar mais de uma espécie de serpentes.

A realização desse estudo reveste-se de importância pois é atividade de medicina de conservação de *Boa constrictor*. Desconhece-se a ocorrência da infecção de serpentes por *Trypanosoma* no Nordeste brasileiro e as consequências fisiopatológicas associadas.

4. OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo filogenético de isolados de *Trypanosoma sp.* obtidos a partir de *Boa constrictor*, montando assim uma árvore filogenética entre os *Trypanosoma* encontrados e outros do mesmo gênero, identificar a ocorrência em *Boa constrictor* da Região Nordeste e avaliar alterações bioquímicas e hematológicas nos animais parasitados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Cultivar e isolar *in vitro* tripomastigotas do sangue de serpentes da espécie *Boa constrictor*;
- Montar um painel bioquímico clínico e hematológico das serpentes parasitadas pelo protozoário;
- Comparar os resultados de bioquímica clínica e hematológico dos animais infectados com aqueles de animais saudáveis;
- Caracterizar morfologicamente as formas flageladas encontradas no sangue circulante das serpentes por meio de microscopia de luz;
- Realizar a análise filogenética dos *Trypanosoma* baseada nos genes 18S rRNA e gGAPDH;
- Inferir a relação filogenética entre as espécies de *Trypanosoma* encontradas e outras espécies de *Trypanosoma* descritas em serpentes, lagartos e mamíferos;
- Identificar a ocorrência de *Trypanosoma* em serpentes da espécie *Boa constrictor* da Região Nordeste.

**5. TRABALHO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO AO JORNAL
International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife (fator
de impacto JCR 2,075, Qualis A1)**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
Trypanosoma serpentis E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM
Boa constrictor INFECTADAS**

**Anderson J. Santos¹, Maisa S. Fonseca¹, Marcos A. Mendonça¹, Gustavo R.
Macêdo¹, Clara C. Fernandez¹, Ilka Biondi², Rejane M. Lira-da-Silva³, Flavia F.
Aburjaile⁴, Roberto Meyer¹, Ricardo Wagner Dias Portela^{1*}**

¹Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100;

²Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Departamento de Ciências
Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia State,
Brazil, 44036-960;

³Núcleo Regional de Ofiologia e Animais Peçonhentos da Bahia, Departamento de
Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State,
Brazil, 40170-290;

⁴Laboratório de Genética de Plantas e Biotecnologia, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, Pernambuco State, Brazil.

Palavras-chave: análise filogenética, répteis, tripanossomíase

Keywords: filogenetics analysis, reptiles, trypanosomiasis

Corresponding author: RW Portela, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular,
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Avenida Reitor Miguel
Calmon s/n, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100; Telephone: +55 71 3283 8936. E-
mail: rwportela@ufba.br

RESUMO

Há poucos relatos da ocorrência de *Trypanosoma* em serpentes, quando comparado a outras classes de répteis, bem como pouca informação a respeito da diversidade filogenética dos mesmo e acerca da sua patogenicidade nessa classe de animais. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de infecção por *Trypanosoma* em serpentes da espécie *Boa constrictor* (jiboia) da região Nordeste do Brasil, avaliar a influência do parasitismo em parâmetros hematológicos e de bioquímica clínica dos animais infectados, caracterizar por meio de microscopia óptica as formas sanguíneas e isoladas em cultivo, realizar o diagnóstico molecular e a inferência filogenética dos isolados. Foram analisadas amostras de sangue de 61 jiboias de dois estados da região Nordeste para a presença de formas tripanosomatídeas, e essas amostras foram utilizadas para cultivo celular, exames hematológicos (eritrograma e leucograma) e de bioquímica clínica. Foi realizada a morfometria das formas tripomastigotas e epimastigotas. Cinco isolados foram mantidos em cultivo e o DNA total foi extraído, sendo realizado PCR para fragmentos dos genes SSU rRNA e gGAPDH. A sequência de nucleotídeos do gene gGAPDH, foi convertida em aminoácidos e uma árvore filogenética foi criada. A partir da análise de esfregaços sanguíneos, foram identificados 09 animais positivos, 01 no estado da Bahia e 08 em Sergipe. A análise dos valores hematológicos dos animais infectados e não infectados demonstrou diferença estatística significativa para volume globular ($p < 0,0005$), hemoglobina ($p < 0,005$), volume corpuscular médio ($p < 0,005$) e hemoglobina corpuscular média ($p < 0,05$), com os animais infectados apresentando menores valores. Na leucometria, houve diferença entre os níveis de eosinófilos ($p < 0,00005$) e heterófilos ($p < 0,05$), com o aumento do número desses dois tipos celulares nos animais parasitados. Não houve diferenças estatísticas nos valores de bioquímica clínica entre os grupos infectados e não infectados. A análise morfometria demonstrou a presença de formas tripomastigotas grandes, 53 μ m de comprimento e largas, 11,86 μ m, de formato circular. As formas epimastigotas apresentaram um comprimento médio de 47 μ m e largura média de 3 μ m. A partir das análises moleculares, foi realizada a identificação dos isolados como sendo *Trypanosoma serpentis*, com todos os isolados agrupados em um mesmo clado, ao lado de *Trypanosoma cascavelli*. Essa é a primeira descrição desse *Trypanosoma* parasitando serpentes da espécie *Boa constrictor* e de alterações clínicas da infecção por tripanosomatídeos em serpentes.

ABSTRACT

There are few reports of the occurrence of *Trypanosoma* in snakes when compared to other classes of reptiles, as well as little information about their phylogenetic diversity and their pathogenicity in this class of animals. Thus, the present study aimed to evaluate the occurrence of *Trypanosoma* infection in *Boa constrictor* snakes from Northeast Brazil, to evaluate the influence of parasitism on hematological and clinical biochemistry parameters of the infected animals, to characterize the blood and isolated forms in culture, perform molecular diagnosis and phylogenetic inference of the isolates. Blood samples from 61 *Boa constrictor* from two states of the Brazilian Northeast region were analyzed for Trypanosomatid forms, and these samples were used for *in vitro* cultivation, hematological (erythrogram and leukogram) and clinical biochemistry examinations. The morphometry of the trypomastigote and epimastigote forms was performed. Five isolates were kept in culture, total DNA was extracted and PCR was performed for SSU rRNA and gGAPDH gene fragments. The nucleotide sequence of the gGAPDH gene was converted to amino acids and a phylogenetic tree was created. From the analysis of blood smears, 9 positive animals were identified, 1 in the state of Bahia and 8 in Sergipe. Analysis of the hematological values of infected and uninfected animals showed a statistically significant difference for globular volume ($p < 0.0005$), hemoglobin ($p < 0.005$), mean corpuscular volume ($p < 0.005$) and mean corpuscular hemoglobin ($p < 0.05$), with infected animals showing lower values. In leukometry, there was a difference between eosinophil ($p < 0.00005$) and heterophil ($p < 0.05$) levels, as the number of these two cell types increased in parasitized animals. There were no statistical differences in clinical biochemistry values between infected and uninfected groups. Morphometric analysis showed the presence of large, 53 μm long and 11.86 53 μm wide trypomastigote forms, circular in shape. The epimastigote forms had an average length of 47 μm and an average width of 3 μm . Molecular analyzes identified the isolates as *Trypanosoma serpentis*, with all isolates grouped in the same clade, next to *Trypanosoma cascavelli*. This is the first description of this *Trypanosoma* parasitizing *Boa constrictor* snakes and of clinical alterations of trypanosomatid infection in snakes.

5.1 INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* (Euglenozoa: Kinetoplastea) compreendem organismos flagelados, capazes de infectar mamíferos, aves, anfíbios, peixes e répteis (STEVENS et al., 1999; MARTIN et al., 2002; SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006). A transmissão aos vertebrados está associada ao hábito alimentar de artrópodes hematófagos (moscas, mosquitos, tabanos e triatoma) e sanguessugas, os quais agem como hospedeiros intermediários e vetores desses organismos (SIDALL; DESSER, 1992; FERMINO et al., 2015; ESPINOSA-ÁLVAREZ et al., 2018). O *Trypanosoma* são responsáveis por ocasionar importantes doenças ao homem e aos animais, como a doença de Chagas e tripanossomíase humana africana, ocasionadas por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente, além da tripanossomose animal africana, ocasionada por *T. vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*, *T. theileri* e *T. grayi* (KAUFER et al., 2017; PAGUEM et al., 2019). O conhecimento acerca da patogenicidade do *Trypanosoma* em espécies de animais silvestres é limitado, principalmente em espécies de animais não mamíferos.

A primeira descrição de *Trypanosoma* em serpentes ocorreu no início do século XX. Wenyon (1908) caracterizou um protozoário a partir do esfregaço sanguíneo de *Erythrolamprus aesculapii* oriunda da região da América tropical, dando-lhe o nome de *Trypanosoma erythrolampri*. No Brasil, as primeiras descrições foram feitas por Pessoa (1928), com a descoberta do *T. phylodriasi*, seguido por Arantes e Fonseca (1931) com a identificação do *Trypanosoma butantanense*. Em 1995, Telford fez um compilado descrevendo a ocorrência de 23 espécies de *Trypanosoma* de serpentes ao redor do mundo. É provável que muitas das espécies descritas atualmente parasitando serpentes sejam sinônimas, uma vez que a principal forma de descrição e classificação de novas espécies, toma como base a descrição do hospedeiro vertebrado, morfologia das formas sanguíneas, localidade geográfica e quando possível, o vetor invertebrado. Entretanto, tais informações por si só não garantem uma adequada identificação, dada a morfologia estereotipada do *Trypanosoma* de serpentes, além da possibilidade de infecções mistas no mesmo hospedeiro (VIOLA et al., 2008; VOTÝPKA et al., 2010). Recentemente, Viola et al., (2009), investigando a ocorrência de *Trypanosoma* em diferentes populações de serpentes do Brasil, realizou a redescoberta de *Trypanosoma cascavelli* e a identificação morfológica e molecular de uma nova espécie, a qual recebeu o nome de *Trypanosoma serpentis*.

Diante da eficácia relativa da classificação de novas espécies *Trypanosoma*, passou-se a se utilizar técnicas moleculares baseadas na determinação de sequências de nucleotídeos e aminoácidos e inferência filogenética (BRIONES et al., 1992; SOGIN; SILBERMAN, 1998). Os principais genes empregados na identificação de novas espécies de *Trypanosoma* tem sido o SSU rRNA e o gGAPDH, sendo esses submetidos a análise filogenética de forma individual ou em conjunto (HANNAERT; OPPERDOES; MICHELS, 1998; GIBSON, 2007; HAMILTON et al. 2009; VIOLA et al. 2009). Em estudos baseados nesses genes, o *Trypanosoma* isolados de serpentes foram agrupados no clado pertencentes aos *Trypanosoma* de lagartos (VIOLA et al., 2008, 2009b)

Apesar do longo tempo da descoberta dos *Trypanosoma* em serpentes, pouco se sabe a respeito da patogenicidade desses nas serpentes e em répteis de forma geral. Experimentos de infecção obtiveram resultados conflitantes, uma vez que nem sempre as serpentes infectadas demonstraram algum sinal clínico. Sabe-se pouco também a respeito da diversidade desses, uma vez que existe poucos estudos voltados para a identificação molecular dos mesmos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *Trypanosoma* em serpentes da espécie *Boa constrictor* oriundas da região Nordeste do Brasil, identificar por meio do sequenciamento dos genes 18S e gGAPDH as espécies encontradas, realizar a caracterização estrutural em microscopia de luz e avaliar a influência do parasitismo sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do hospedeiro.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Origem dos animais e aspectos éticos

Para a realização do presente estudo, 61 serpentes pertencentes a espécie *Boa constrictor* (jiboia) foram avaliadas. Dessas, 47 foram originárias de resgate pela polícia ambiental em áreas periurbanas e domiciliares no estado da Bahia, e 14 animais eram pertencentes ao Zoológico Municipal da cidade de Aracaju, localizado no estado de Sergipe, Brasil.

Esse estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), documento número 63053-1, emitido em 08 de outubro de 2019 (**Anexo 1**). Também teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, registro de nº 94/2018, emitido em 01 de novembro de 2018 (**Anexo 2**). O estudo foi também cadastrado no

Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com o número A789EC8, na data de 07/08/2018 (**Anexo 3**).

5.2.2 Coleta das amostras

As serpentes foram avaliadas clinicamente quanto a presença de lesões externas, ectoparasitismo, escore corporal e resposta a manipulação, e submetidas a coleta do sangue, por meio da punção dos plexos sanguíneos inter ou paravertebral. O sangue coletado foi acondicionado em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou tubos contendo ativador de coágulos, e mantidos a temperatura de 4°C. A partir do sangue coletado com anticoagulante foram feitos esfregaços sanguíneos, exames hematológicos e hemocultivo. Com o sangue coletado sem anticoagulante foi realizada a obtenção de soro e posterior análise dos componentes bioquímicos.

5.2.3 Avaliação dos esfregaços sanguíneos:

Os esfregaços sanguíneos confeccionados foram fixados com metanol a 99% e corados com corantes hematológicos rápido ou May-Grunwald-Giemsa. A observação foi feita em de microscopia de luz, na objetiva com aumento de 100x. Animais infectados tiveram sua parasitemia estimada por meio da contagem de formas tripomastigostas em 100 campos na lâmina. A partir desses, foi realizado também a avaliação morfológica das formas encontradas por meio da mensuração das estruturas em microscopia óptica, com objetiva de 100x e escala de 20µm, associado a um software de fotografia e medições, sendo avaliados o comprimento total do parasito (TT), tamanho do corpo sem flagelo (C), flagelo livre (FL), largura do corpo sem membrana ondulante (L), largura do corpo com membrana ondulante (LM), distância da região anterior até o núcleo (A-N), distância da região posterior até o núcleo (P-N), distância da região posterior até o cinetoplasto (P-K), e distância do núcleo ao cinetoplasto. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de estatística no programa Graph Pad Prism versão 6.01, onde foram analisados os valores de média, mediana, desvio e coeficiente de variação.

5.2.4 Ensaios hematológicos e bioquímicos:

No ensaio hematológico foram mensurados os valores de eritrograma e leucograma. Para a realização da estimativa do número total de eritrócitos no sangue circulante, foi feita a contagem em câmara de Neubauer, a partir da diluição do sangue total em solução de Gower na proporção 1:100µL, e leitura em microscópio óptico, com

objetiva de 40x de aumento. O resultado foi expresso em eritrócitos $\times 10^6 / \mu\text{L}$. Foi realizada também a determinação dos volumes globulares por meio da técnica de microhematócrito. Foram então calculados os índices hematimétricos, hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), seguindo a metodologia descrita por THALL et al., 2007, e SILVA, 2008.

A estimativa do número leucocitário total, assim como na contagem eritrocitária, foi realizada por meio da contagem em câmara de Neubauer. Para isso, foi utilizado como diluente o líquido de Gower na proporção de 1:100. O resultado obtido pela contagem de 25 campos foi multiplicado por 1.000.

O leucograma diferencial foi feita por meio da leitura dos esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido e May-Grunwald-Giemsa-Wright, em microscópio ótico sob a objetiva de aumento de 100x. O percentual leucocitário foi estimado por meio da contagem em 100 diferentes campos de subtipos de leucócitos, sendo esses: linfócitos, eosinófilos, basófilos, monócitos e heterófilos. A partir da contagem, calculou-se a quantidade absoluta de cada categoria celular, tomando como base o valor de leucograma total, aplicando a seguinte fórmula: valor total de leucócito (células/ μL) \times contagem de leucócito por categoria (%) / 100 = valor absoluto de cada categoria (células/ μL) (WEISER, 2015).

Para análise dos componentes bioquímicos clínica, foram utilizados kits comerciais de dosagens bioquímicas (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) para os parâmetros proteínas totais, albumina, ALT, glicose, ferro, creatinina, ácido úrico e colesterol. As dosagens foram realizadas de acordo com as especificações de cada kit.

5.2.5 Hemocultivo

O cultivo a partir do sangue coletado com anticoagulante foi realizado em meio básico para crescimento de *Trypanosoma*, segundo metodologia descrita por FERREIRA et al (2007). A técnica consistiu na inoculação de 50 μL de sangue das serpentes parasitadas em meio bifásico constituído por 15% de sangue de coelho, 4% de ágar sangue sobreposto a meio LIT líquido suplementado com 10% de soro fetal bovino, e cultivo a 26°C. Foram realizadas suplementações periódicas do meio com LIT e repiques a cada 15 a 20 dias, inoculando-se 50 μL da cultivo antigo em nova garrafa contendo NNN-LIT.

5.2.6 Extração do DNA total

A partir das formas epimastigotas em cultivo foi realizada a extração do DNA total utilizando o kit de extração PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas e analisadas com relação à sua pureza em espectrofotometria a 260 e 280 nM e uso de aparelho Nanodrop (ThermoFisher), e depois armazenadas a temperatura de -20°C até o momento de uso.

5.2.7 Reação de PCR

O DNA total extraído a partir das formas promastigotas em cultivo foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR) para fragmentos do gene da subunidade menor do RNA 18s ribossomal (SSU rRNA) e do gene gGAPDH.

Os parâmetros da reação de PCR para o gene 18S foram os seguintes: água ultrapura (H₂O- Milli-Q) 22,5µL; tampão 5x (10,0µL); íons magnésio (Mg⁺⁺) 1,5 µM (3,0µL); desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) 10µM (1,25µL); primer forward (Fw) 20µM (2,5µL); primer reverse (Rv) 20µM (2,5µL); soroalbumina bovina (BSA) 1,0µL; dimetilsulfóxido (DMSO) 2,0µL; polimerase (TaqPol) 5u/µL (0,25µL) e 5 µL de DNA, com um volume final 50 µL. A reação foi realizada por 5 ciclos de desnaturação inicial, por 5min a 95°C, desnaturação por 1min a 95°C, anelamento por 30s a 45°C e extensão por 2min10s a 65°C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1min, anelamento a 50°C por 30s, extensão por 2min10s à 72°C e extensão final por 30min à 65°C, sendo o produto final mantido a 16°C.

A PCR para o gene da proteína GAPDH foi realizada a partir da modificação da técnica proposta por Hannaert et al., (1998), com as seguintes condições: H₂O Milli-Q 28,75µL; e os reagentes nas seguintes concentrações: tampão 5x (10,0 µL); Mg⁺⁺ 1,5µL (3,0µL); dNTPs 10mM (1,25µL); primer Fw 20 mM (2,5µL); primer Rv 20 mM (2,5µL) e TaqPol 5u/µL (0,25µL), com um volume final de reação de 50µL. A reação foi realizada por meio de 5 ciclos iniciais com desnaturação inicial de 5min a 95°C, desnaturação por 1min a 95°C, anelamento por 30s a 45°C, extensão por 2min10s a 65°C e mais 35 ciclos de desnaturação por 1min a 95°C, anelamento por 30s a 50°C, extensão por 2min e 10s a 72°C, extensão final por 30min a 65°C, sendo o produto final mantido a 16°C.

Os DNAs de *Trypanosoma cruzi* cepa INPA, 3663, *T. conorhini* cepa Deane, *T. conorhini* cepa LO/Z, *T. cruzi* cepa DM28C, *T. cruzi* cepa CL Brenner, *T. mega*, *T.*

rangeli cepa H-14, *T. cruzi* cepa Y, *T. rangeli* cepa SC-58, *T. rangeli* cepa Peita Gonzales e *T. rangeli* cepa San Agostin foram gentilmente cedido pela Dra. Cláudia Levy, do IOC-FIOCRUZ, e utilizadas como controles positivos na reação de PCR e também utilizados na montagem da árvore filogenética.

Os produtos oriundos das reações de PCR foram examinados por reação de eletroforese vertical em gel de agarose na concentração de 1,5%, utilizando o brometo de etídio como intercalante e 3 µL de marcador de peso molecular (Kasvi), sendo feita a observação em luz UV. As bandas visualizadas na eletroforese foram cortadas individualmente do gel de agarose e extraídas utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific). O material purificado foi submetido ao sequenciamento pelo método de Sanger.

5.2.8 Reação de sequenciamento

O produto da reação da PCR para os genes SSU rRNA e gGAPDH foram submetidos ao processo de sequenciamento pelo método de Sanger. Para isso, 80µL de álcool isopropílico a 70%, foram adicionados ao produto da reação de PCR, a mistura então foi centrifugada sob refrigeração por 45min a 5000 x g. Pós centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e a placa contendo o material foi novamente centrifugada, desta vez invertida, durante 1 min a 1500 x g. Em seguida, a placa foi seca com o auxílio do termociclador, sendo incubada a 75°C por 5min. O material precipitado foi então ressuspenso em formamida, adicionando-se 10µL em cada amostra, sendo em seguida submetido ao processo de desnaturação por choque térmico, afim de manter as sequências de DNA em sua estrutura conformacional primária; para isso, o material foi novamente levado ao termociclador, onde foi submetido a temperatura de 95°C por 5min, sendo então resfriado rapidamente por imersão em gelo durante 1min. O material então foi levado ao sequenciador (Applied Biosystems ABI 3130xI), sendo o resultado da sequência de nucleotídeo de cada gene disponibilizado em formato de arquivo FASTA.

5.2.9 Análise filogenética

A partir da sequência de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento do gene GADPH, foi realizada a tradução para a sequência de aminoácidos, em seguida, foi criado um banco de dados de proteínas em formato FASTA, recuperadas a partir da análise de similaridade no site Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). As sequências mantidas no banco foram alinhadas utilizando o programa alinhador de comando MAFFT e posteriormente

foram geradas árvores filogenéticas pelos métodos de parcimônia máxima verossimilhança e inferência bayesiana no programa IQ-TREE versão multicore 1.6.11.

5.2.10 Análise estatística

Os dados obtidos a partir do eritrograma, leucograma, bioquímica clínica e da morfometria foram organizados e armazenados em planilhas no software EXCEL (Microsoft Office 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington). A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico GraphPad Prism v. 6. Inicialmente os dados foram submetidos a uma análise de estatística descritiva, obtendo-se valores de máximos e mínimos das amostras, mediana, média, e identificação dos valores presentes entre o segundo e terceiro quartis (25% a 75%) e coeficiente de variação (apenas para morfometria). Para determinar se os dados seguiam uma distribuição Gaussiana, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk com um nível de confiabilidade de 95% ($p < 0,05$). Os valores aberrantes ou atípicos (*outliers*) foram identificados pelo teste *t* de Tukey e pelo teste de Rout.

Para comparação dos grupos estabelecidos neste estudo, foram realizados testes de variância para comparações entre dois grupos, sendo o Teste *t* de Student para os dados paramétricos e teste de Mann-Whitney para os dados não-paramétricos. Os valores cujo $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os resultados do eritrograma, leucograma e bioquímica clínica foram representados sob a representação gráfica de *boxplot*. Os dados oriundos da morfometria foram expostos na forma de tabela.

5.3 RESULTADOS

Das 61 jiboias avaliadas, por meio da análise de esfregaços sanguíneos em microscopia óptica, 09 animais (15%) foram identificados com infectados por *Trypanosoma* sp., sendo apenas um animal (2%) de um total de 47 animais nativos do estado da Bahia, e 08 (57%) dos 14 animais do estado de Sergipe.

Os animais avaliados no experimento tinham um comprimento variando entre 0,95 a 2,50 m. Desses, 24 foram identificados como fêmeas e 22 como machos, não sendo possível realizar a identificação do sexo de 15 animais. Dos animais parasitados, quatro se apresentavam extremamente magros, com fácil percepção das costelas e vértebras, possuindo coloração de escamas opaca e restos de muda. Um animal apresentou diversos

nódulos na região costal, espalhados por todo o corpo, não aderidos a musculatura. Quatro animais apresentavam-se com escore corporal satisfatório, apesar de apresentarem-se mais magros quando comparados a animais não parasitados. Na estimativa da parasitemia, seis animais apresentaram 1% de parasitemia, um animal teve 3%, um animal com 4% de parasitemia, e uma jiboia com 7%. A contagem da parasitemia acompanhou o estado clínico dos animais, onde os animais com menor escore corporal e se apresentando mais debilitados apresentaram parasitemia de 4 e 7%, e animais com escore corporal melhor apresentaram parasitemia de 1 a 3%.

5.3.1 Resultados exames hematológicos e bioquímicos

Com a realização da análise dos valores de eritrograma, foi possível observar que os valores de contagem de hemácias (**Fig. 3A**) não diferiram estatisticamente entre os grupos de animais parasitados e não parasitados. Também não foi possível identificar diferença estatística quando comparados os valores de CHCM (**Fig. 3F**). Houve diferença estatística entre os valores de VG (**Fig. 3B**) ($p = 0,0008$), onde os animais parasitados apresentaram uma massa eritrocitária menor que os animais não parasitados. Resultado similar pôde ser observado quanto aos valores de hemoglobina (Hb) (**Fig. 3C**), apresentando $p = 0,001$. Os valores de VCM (**Fig. 3D**) e HCM (**Fig. 3E**), também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores dos grupos infectados e não infectados.

Na avaliação do leucograma (**Fig. 4**), apenas as contagens de heterófilos (**Fig. 4C**) e eosinófilos (**Fig. 4D**) apresentaram diferenças significativas, quando comparados os grupos de serpentes infectadas e não infectadas, com $p < 0,05$ e $p = 0,0005$, respectivamente. Apesar de não apresentar significância estatística, o valor de leucometria total (**Fig. 4A**) nos animais parasitados apresentou o valor da mediana e do terceiro quartil maior do que nos animais não parasitados, sugerindo uma possível tendência a elevação do mesmo.

A partir dos parâmetros bioquímicos obtidos não foram identificadas variações significantes entre os valores correspondentes ao grupo de animais infectados e o de animais não infectados (**Fig. 5**).

5.3.2 Morfometria

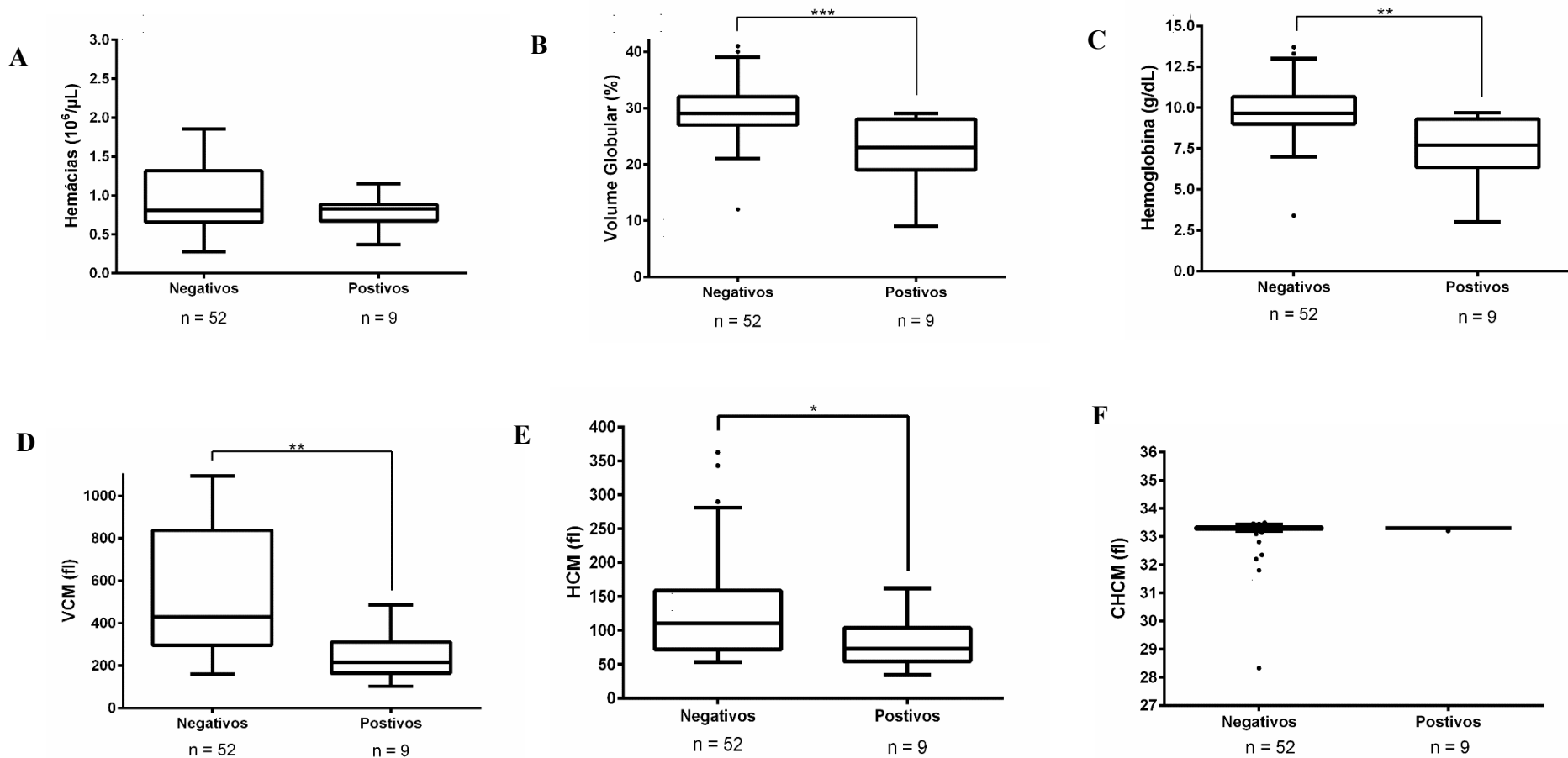
5.3.2.1 Tripomastigotas sanguíneas

Na análise do esfregaço sanguíneo foi possível observar formas tripomastigotas sanguíneas, pleomórficas, as quais se apresentavam majoritariamente em formato circular, com sobreposição das regiões anteriores e posteriores, dificultando a visualização das estruturas internas (núcleo e cinetoplasto), além da distinção das regiões posterior, anterior e flagelo (**Fig. 6**). Com a realização da morfometria das formas que se apresentaram com formato circular ou com pouco grau de sobreposição de suas estruturas, pode-se observar grandes tripomastigotas, as quais possuíam um comprimento médio total de 53,21 μm , largos (8,347 μm) e apresentando uma membrana ondulante exuberante, a qual lhe conferia uma largura média de 11,42 μm . Os mesmos apresentavam um comprimento de flagelo variável, medindo de 4,17 a 22,01 μm , podendo esse estar acompanhado por uma porção da membrana ondulante ou não. O cinetoplasto pôde ser visualizado como uma pequena estrutura de formato circular a ovoide, com coloração basofílica e solto na membrana ondulante, adjacente a margem externa do corpo. A distância da região posterior do corpo do parasita ao cinetoplasto foi de 19,95 μm , estando esse 8,53 μm de distante do núcleo. O núcleo apresentou-se de forma ovoide, na curvatura interna do corpo do parasita, apresentando uma distância de 25,45 μm da extremidade posterior e 18,95 μm da extremidade anterior (**Tabela 1**). Foi possível observar figuras de divisão em esfregaços sanguíneos (**Fig. 6A**).

5.3.2.2 Morfometria das formas epimastigotas

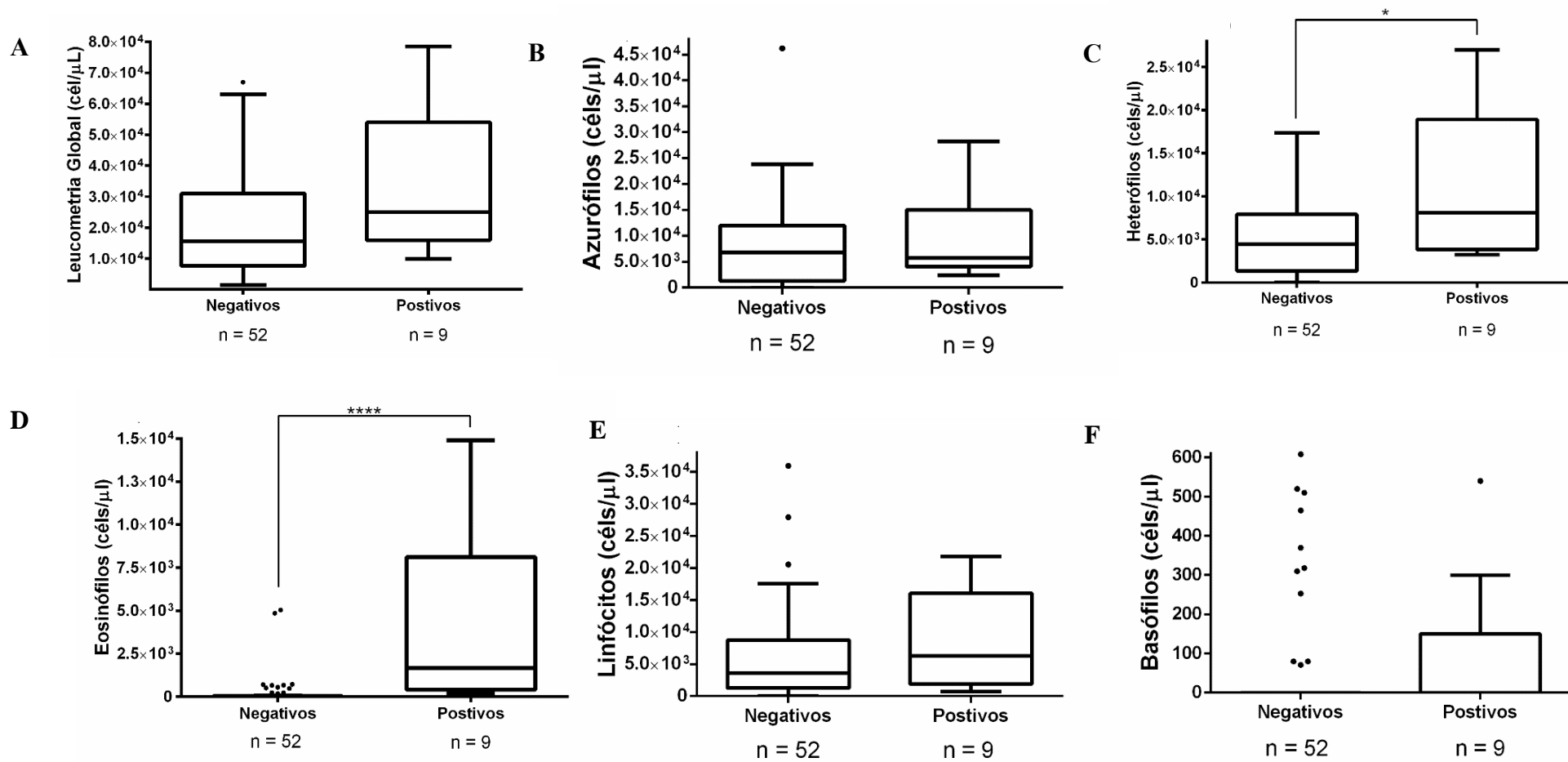
No cultivo, foi possível observar formas epimastigotas pleomórficas, medindo 47 μm de comprimento total, 19,51 μm de comprimento do corpo sem flagelo, 2,72 μm de largura sem a membrana ondulante e 3 μm com esta. Apresentavam-se em forma livre e/ou unidas em pares ou trios a partir da região posterior do corpo (**Fig. 7**). Apresentavam longos flagelos que emergiam da região anterior do corpo do protozoário, medindo cerca de 11,89 μm de comprimento. O núcleo encontrava-se levemente deslocado para a região posterior do corpo, estando a 9,2 μm de distância da extremidade anterior desse e 10,05 μm de distância da extremidade posterior. O cinetoplasto apresentava-se com um formato ovoide e localizava-se anterior ao núcleo, com uma distância de 1,83 μm deste e de 11,76 μm da extremidade posterior do corpo do parasita (**Tabela 2**).

Figura 3 - Comparação dos valores de eritograma entre animais negativos e positivos para *Trypanosoma serpentes* em análise de esfregaço sanguíneo. Parâmetros avaliados: hemácias (A), volume globular (B), hemoglobina (C), volume corpuscular médio (D), hemoglobina corpuscular média (E) e concentração de hemoglobina corpuscular média (F). Foram avaliados 61 animais, sendo 52 negativos e 9 positivos. Os resultados foram submetidos ao Teste t de Student e Mann-Whitney, e as diferenças estatisticamente significativas são representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$)



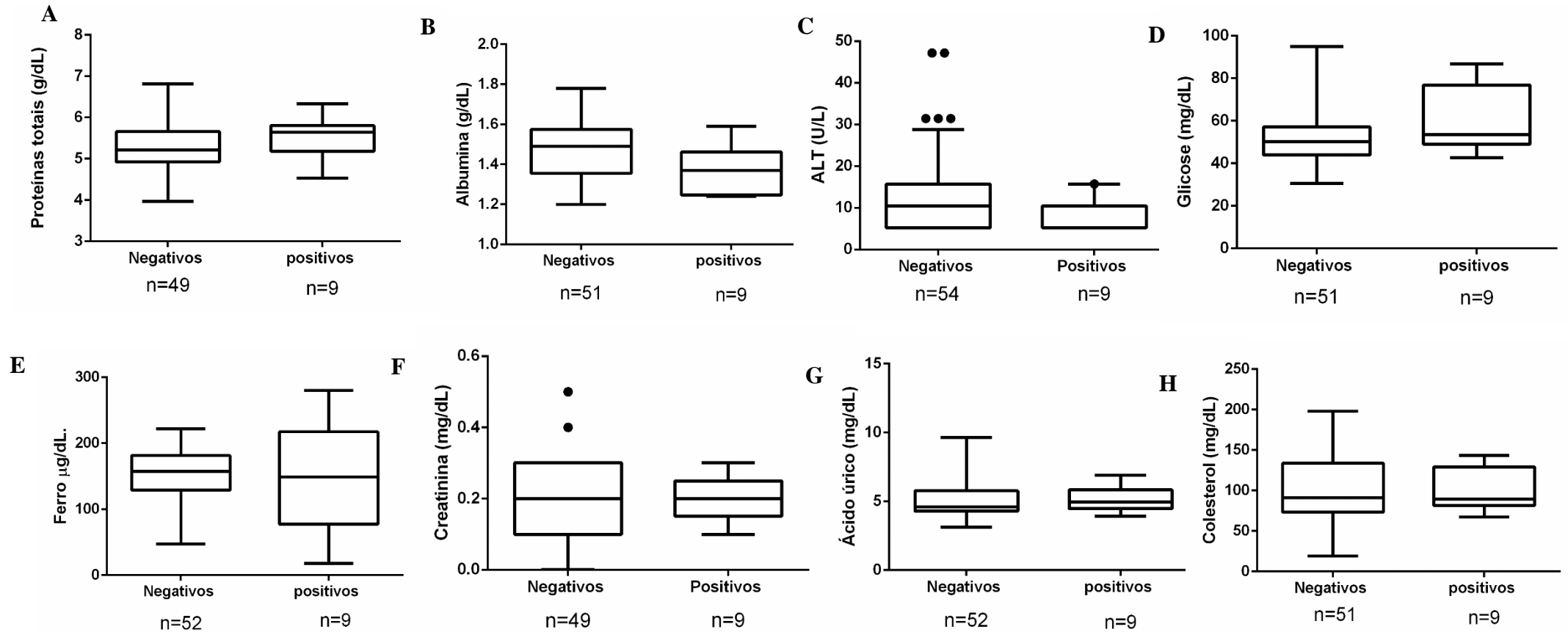
Fonte: SANTOS (2020)

Figura 4 - Comparação de valores de leucograma entre os grupos de animais negativos e positivos para infecção com *Trypanosoma serpensis* por análise de esfregaço sanguíneo. Parâmetros avaliados: leucometria global (A), azurófilos (B), heterófilos (C), eosinófilos (D), linfócitos (E) e basófilos (F). Foram avaliados um total de 61 animais, 52 negativos e 9 positivos. Os resultados foram submetidos ao Teste t de Student e Mann-Whitney, e diferenças estatisticamente significativas são representadas por * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$). Os pontos representam os outliers.



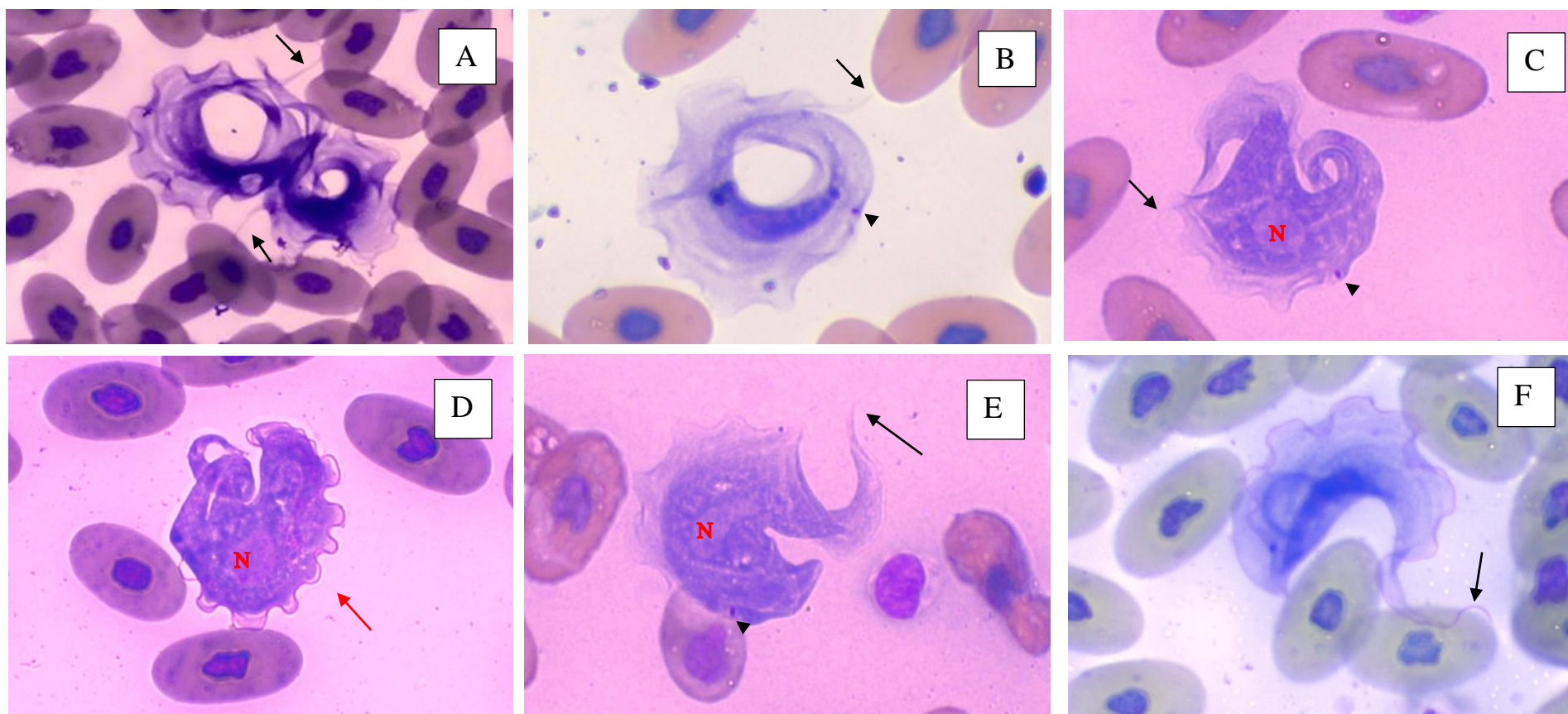
Fonte: SANTOS (2020)

Figura 5 - Comparação de valores de bioquímica clínica entre os grupos de animais negativos e positivos para infecção com *Trypanosoma serpentes* por análise de esfregaço sanguíneo. Parâmetros avaliados: Proteínas totais (A), Albumina (B) ALT (C), Glicose (D), Ferro (E), Creatinina (F), Ácido úrico (G) e Colesterol (H). Foram avaliados um total de 61 animais, 52 negativos e 9 positivos. Os resultados foram submetidos ao Teste t de Student e Mann-Whitney, e diferenças estatisticamente significativas são representadas por * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$). Os pontos representam os outliers.



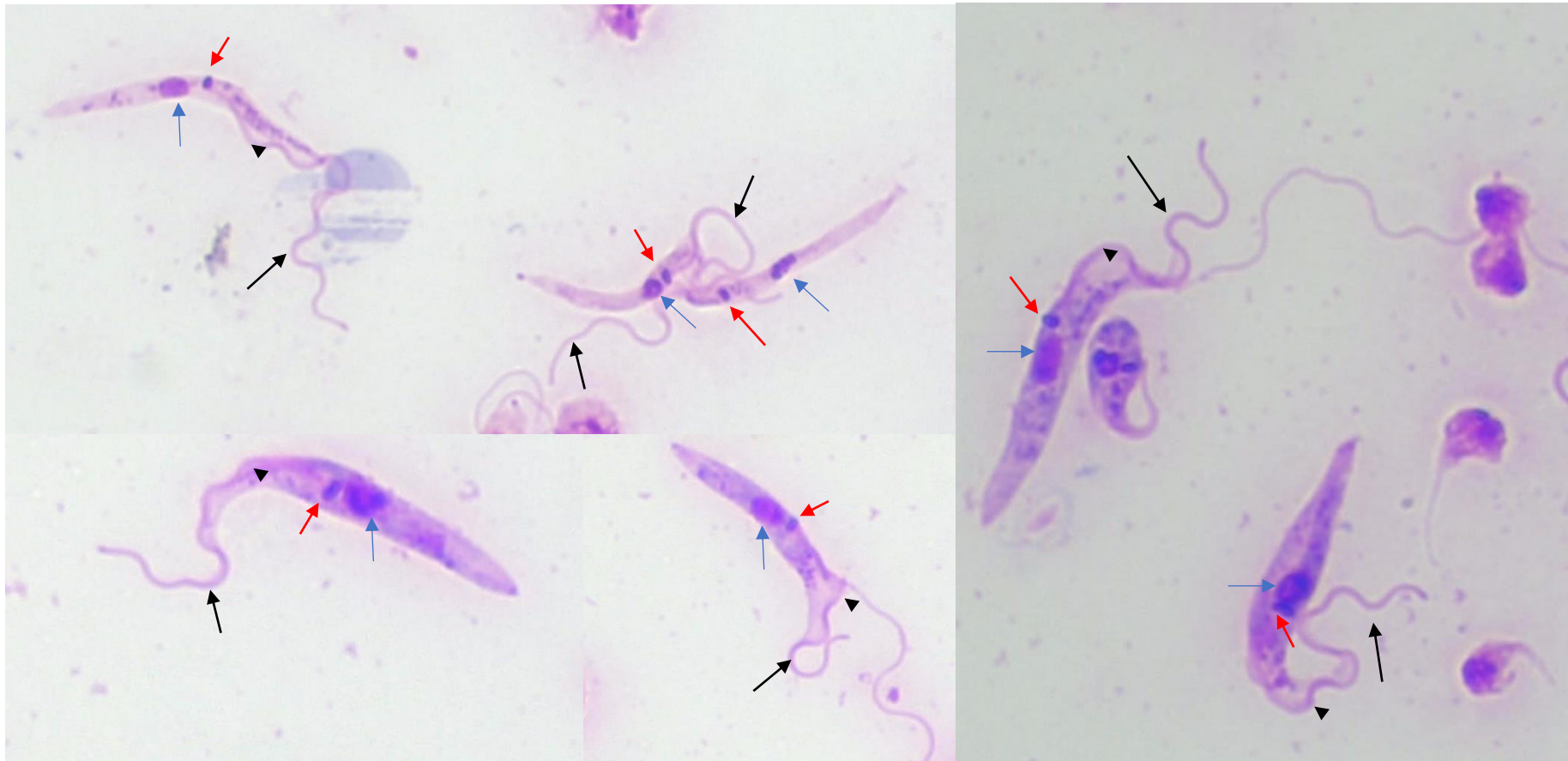
Fonte: SANTOS (2020)

Figura 6 - Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma serpentis* em sangue de jiboia (*Boa constrictor*). As figuras A, B, C, D, E e F apresentam as principais conformações do *T. serpentis* observadas em esfregaços sanguíneos. Em A e B pode-se observar tripomastigotas em sua forma circular, sendo essas as formas predominantes nos esfregaços de sangue, e em A é possível observar uma figura de mitose. Em C, D e E é possível observar as tripomastigotas na forma semicircular e não circular. É possível observar também o cinetoplasto (cabeça de seta) como um pequeno ponto basófilico solto na membrana ou aderido ao corpo do parasito na região posterior; O flagelo (seta preta) é observado nas figuras A, B, C, E e F, emergindo do corpo na região anterior. O núcleo (N) é visível nas figuras B, C, D e E. Em D, é possível observar uma tripomastigota com uma membrana ondulante escassa (seta vermelha) e aderida ao corpo. Objetiva com aumento de 1000X.



Fonte: SANTOS (2020)

Figura 7 - Formas epimastigotas de *Trypanosoma serpentis* em cultivo com meio NNN-LIT. É possível observar o núcleo na região central (seta azul) do corpo do parasito, o cinetoplasto (seta vermelha) próximo ao núcleo, na região anterior do corpo do parasito, flagelo livre que emerge da região anterior (seta preta) do parasito e a membrana (cabeça de seta) ondulante iniciando a partir da região central do corpo das epimastigotas. Coloração pela técnica de Giemsa. Objetiva com aumento de 1000x.



Fonte: SANTOS (2020)

Tabela 1 - Morfometria das formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma serpentis*, isoladas a partir de serpentes *Boa constrictor*: As medidas de 30 parasitos foram analisadas quanto ao comprimento total (TT), corpo sem flagelo (C), flagelo livre (FL), largura do corpo sem membrana ondulante (L), largura do corpo com membrana ondulante (LM), distância da região anterior até o núcleo (A-N), distância da região posterior até o núcleo (P-N), distância da região posterior até o cinetoplasto (P-K), distância do núcleo ao cinetoplasto.

	TT	CC	FL	L	LM	A-N	P-N	P-K	K-N
MÉDIA (µm)	53,21	44,85	11,42	8,347	11,86	28,69	25,45	18,95	8,53
MÍNIMO (µm)	35,79	29,25	4,17	4,43	5,48	18,78	10,59	3,5	4,55
MÁXIMO (µm)	75,88	72,79	22,01	14,69	16,69	40,92	40,25	31,33	11,92
DESVIO PADRÃO (µm)	12,7	13,33	5,194	2,843	2,94	7,094	8,305	9,699	2,153
CV (%)	23,86	29,72	45,48	34,07	24,79	24,73	32,63	51,19	25,24

Fonte: SANTOS (2020)

Tabela 2 - Morfometria das formas epimastigotas de *Trypanosoma serpentes* em meio de cultivo. Foram contados 76 epimastigotas, avaliando-se o comprimento total (TT), corpo sem flagelo (C), flagelo livre (FL), largura do corpo sem membrana ondulante (L), largura do corpo com membrana ondulante (LM), distância da região anterior até o núcleo (A-N), distância da região posterior até o núcleo (P-N), distância da região posterior até o cinetoplasto (P-K) e distância do núcleo ao cinetoplasto.

	TT	C	FL	L	LM	A-N	P-N	P-K	K-N	DK
MEDIANA (µm)	47	19,51	11,89	2,72	3	9,2	10,05	11,76	1,83	0,72
25% PERCENTIL (µm)	27,99	16,28	10,38	2,105	2	7,468	8,01	9,06	1,69	0,58
75% PERCENTIL (µm)	34,14	22,3	14,81	3,35	4	11,84	11,69	13,79	2,37	0,985
MÍNIMO (µm)	20	13,21	4,84	1,27	1	5,56	6,42	7,82	1,07	0,49
MÁXIMO (µm)	44,79	29,84	23,03	6,62	6	14,19	19,5	21	2,96	1,61
CV (%)	19,81	20,7	33,85	35,06	40,32	26,2	29,95	30,35	26,28	35,06

Fonte: SANTOS (2020)

5.3.3 PCR e filogenia

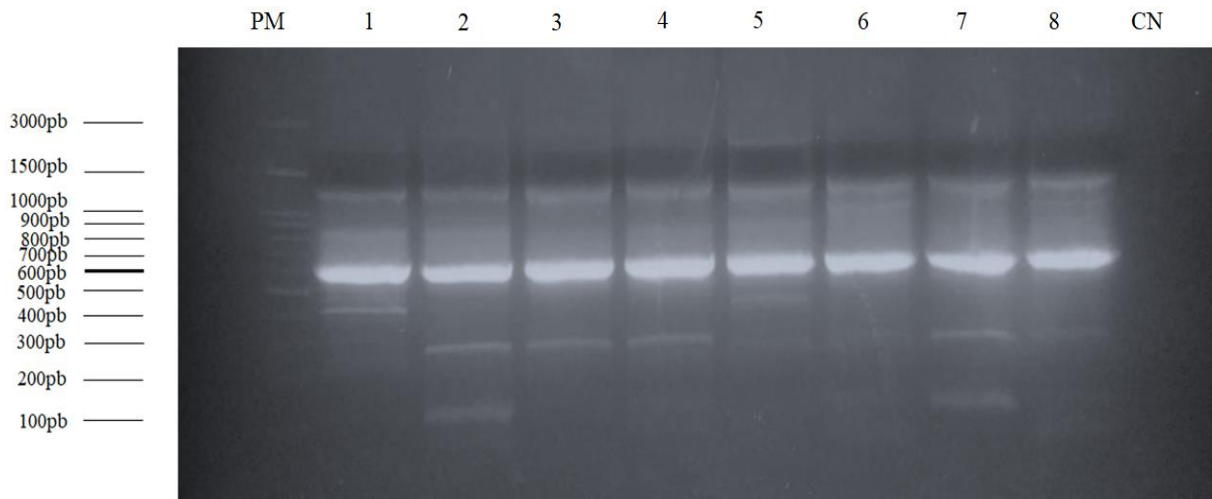
O produto da reação de PCR foi observado em gel de agarose 1,5%, sendo as bandas formadas comparadas com o padrão molecular. Para o gene gGAPDH foi observada a formação das bandas nos isolados testes e nos isolados controles na altura de 600pb (**Fig. 8 e 9**). Para o produto da reação para o gene SSU rRNA, foram observadas bandas no grupo controle e teste na região entre 1500pb e 3000pb, compatível com o peso molecular proposto para esse gene, o qual é de aproximadamente 2000pb (**Fig. 10 e 11**).

Com a realização do sequenciamento dos isolados, fez-se a análise de similaridade (BLAST), alinhando-se com outras sequencias de genes depositadas no GenBank, na plataforma do NCBI. Com a análise do gene da gGAPDH obteve-se valores de 100% de similaridade com o *Trypanosoma serpentis* para os isolados C3, C4 e C538, e 99,82% para os isolados C125 e C678. Para o gene SSU rRNA, obteve-se os valores de 99,66% de similaridade com a sequência de *Trypanosoma serpentis* para os isolados C3 e C125, e 99,67% para os isolados C4, C538 e C678.

No momento da montagem da árvore filogenética observou-se que o gene 18S SSU rRNA obteve uma menor região sequenciada, o que gerou árvores com topologia inadequada, inviabilizando o uso do mesmo em uma árvore baseada em ambos os genes. Foi confeccionada árvore apenas com a sequência do gene gGAPDH. As sequências utilizadas na construção da árvore foram recuperadas no banco de dados Uniprot em formato FASTA, a partir de sequências previamente depositadas do gene gGAPDH. As mesmas foram alinhadas com as sequências obtidas em nosso estudo e foi utilizada a ferramenta de alinhamento Mafft. A árvore foi gerada no programa IQTREE (**Fig. 11**).

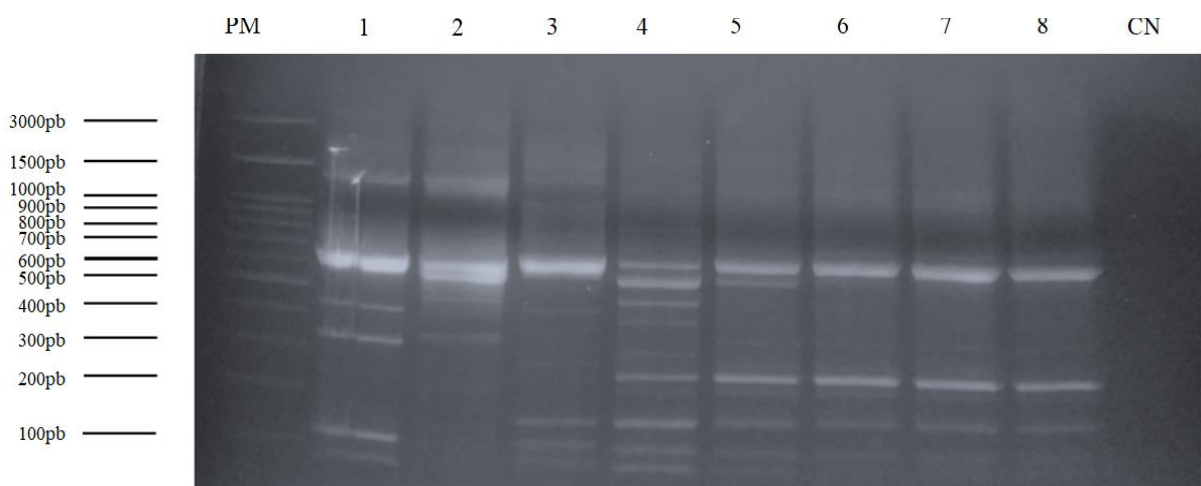
Na construção da árvore filogenética, os isolados do presente estudo agruparam-se no mesmo clado que o *Trypanosoma serpentis* (FJ236512.1) e do *Trypanosoma cascavelli* (FJ236511.1 1-551). O *Trypanosoma freitasi* (MF401952.1 1-518) agrupou-se no mesmo ramo, como um clado irmão. Os demais isolados sequenciados agruparam-se em clados próprios. O *Trypanosoma mega* agrupou-se no mesmo ramo que os demais isolados sequenciados no presente estudo, sendo observada sua divergência anterior aos demais isolados. Foi observada a formação de clados isolados para os *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *T. conorhini*.

Figura 8 - Resultado da reação da PCR para o gene gGAPDH de diferentes espécies de Trypanosoma: Em PM é possível observar as bandas do padrão molecular. As amostras numeradas correspondem às espécies referência 1- *T. rangeli* cepa H-14; 2- *T. cruzi* cepa CL; 3- *T. conorhini* cepa Deane; 4-*T. conorhini* cepa LO/Z; 5- *T. rangeli* cepa SC-58; 6- *T. cruzi* cepa Dm28C; 7-*T. cruzi* cepa Y; 8- *T. rangeli* cepa San Agustin. É possível observar a formação da banda principal (gGAPDH) na linha de 600pb. Não foi observada nenhuma amplificação no controle negativo (CN).



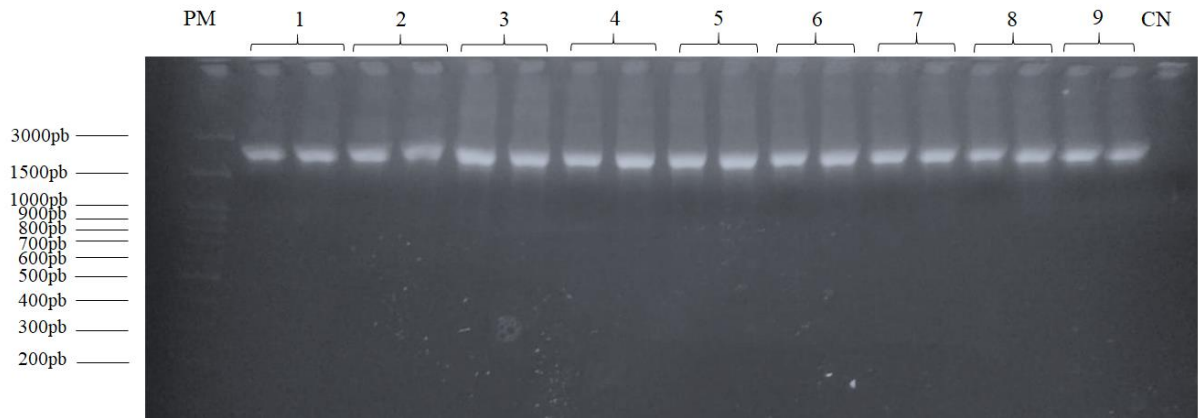
Fonte: SANTOS (2020)

Figura 9 - PCR para o gene gGAPDH de diferentes espécies de Trypanosoma. Da esquerda para a direita, pode ser observado em PM as bandas do padrão molecular. Nos poços numerados de 1 a 3, encontram-se o DNA das cepas de referência de *Trypanosoma cruzi* cepa INPA 3663, *T. mega* e *T. rangeli* cepa Peita Gonzales, respectivamente. Nos poços de 4 a 8, encontra-se os isolados de *Trypanosoma serpentis* obtidos durante o estudo, sendo o isolado 5 pertencente ao estado da Bahia e os demais ao estado de Sergipe. É possível observar que tanto a cepa de *T. mega* (2) e os isolados 4 (Sergipe) e 5 (Bahia) apresentaram a formação de duas bandas com pesos semelhantes, na faixa de peso molecular do gene gGAPDH (600pb). Não foi observado a formação de banda no poço destinado ao controle negativo (CN).



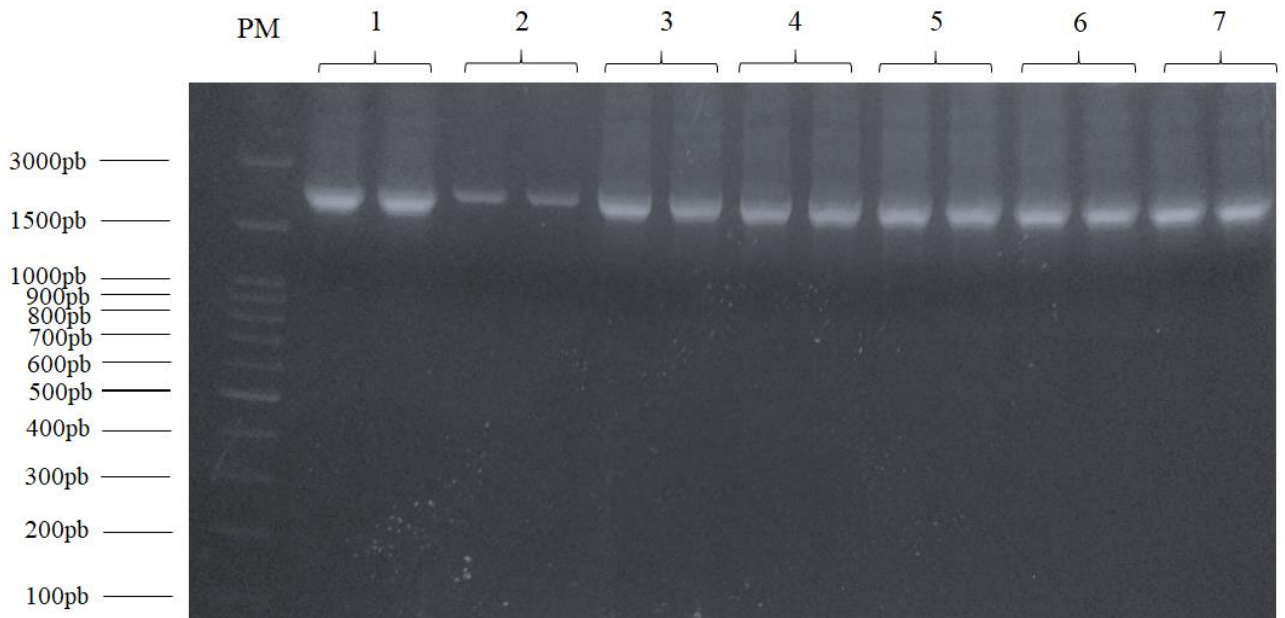
Fonte: SANTOS (2020)

Figura 10 - PCR para o gene r18S de diferentes cepas de Trypanosoma: Da esquerda para a direita, em PM é possível observar a disposição das bandas do padrão molecular, sendo que as amostras numeradas correspondem à duplicatas das espécies referência: 1- *T. rangeli* cepa H-14; 2- *T. cruzi* cepa CL; 3- *T. conorhini* cepa Deane; 4- *T. conorhini* cepa LO/Z; 5- *T. rangeli* cepa SC-58; 6- *T. cruzi* cepa Dm28C; 7- *T. cruzi* cepa Y; 8- *T. rangeli* cepa San Agustin e em 9 - *T. cruzi* cepa INPA. É possível observar a formação da banda principal (r18S) entre as linhas de 3000pb e 1500pb. Não foi observada nenhuma amplificação no controle negativo (CN).



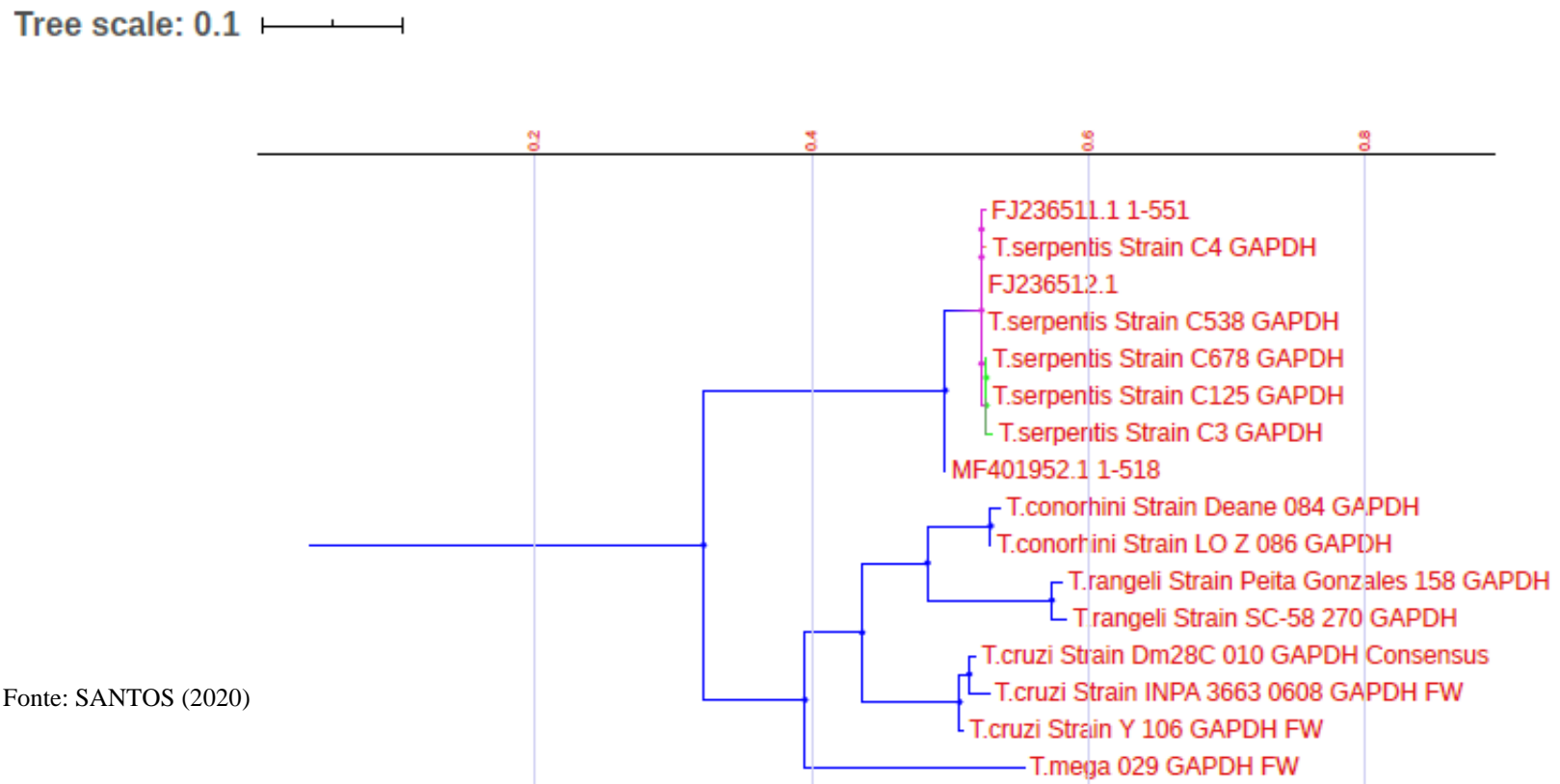
Fonte: SANTOS (2020)

Figura 11 - PCR para o gene r18S de diferentes cepas de Trypanosoma. Em PM encontra-se o padrão de peso molecular. Nos poços 1 e 2, encontra-se a duplicata do DNA das cepas de referência *T. mega* e *T. rangeli* cepa Peita Gonzales. Nos poços de 3 a 7, também em duplicata, encontra-se os isolados de *Trypanosoma serpentis* obtidos durante o estudo, sendo o isolado 4 pertencente ao estado da Bahia e os demais ao estado de Sergipe. É possível observar a formação da banda principal (r18S) entre as linhas de 3000pb e 1500pb.



Fonte: SANTOS (2020)

Figura 12 – Arvore filogenética baseada na sequência do gene gGAPDH de *Trypanosoma serpentis*. A árvore foi construída a partir dos resíduos de aminoácidos codificado pelo gene gGAPDH para diferentes *Trypanosoma*. É possível observar que tanto o isolado obtido na Bahia (*T. serpentis* C538), quanto os isolados oriundos de Sergipe (*T. serpentis* C4, C125, C678 e C3), agrupam-se em um mesmo clado, junto com o isolado de *T. serpentis* (FJ236512.1) e *T. cascavelli* (FJ236511.11-551), sendo identificados como *T. serpentis*. É possível observar a presença do *Trypanosoma freitasi* (MF401952.11-518) no mesmo ramo que os isolados do presente estudo. As diferentes sequências de *T. conorhini*, *T. cruzi*, *T. rangeli* e *T. mega*, correspondem às cepas de referência sequenciadas no presente estudo. As sequências de *T. serpentis* (FJ236512.1), *T. cascavelli* (FJ236511.11-551) e *Trypanosoma freitasi* (MF401952.11-518) foram retiradas do banco de sequência de aminoácidos Uniprot. Árvore gerada pelo método de parcimônia, a partir do programa *IQTREE*, com 1000 replicações de árvores.



5.4 DISCUSSÃO

Essa é a primeiro relato da ocorrência de *Trypanosoma serpentis* em serpentes da espécie *Boa constrictor*, sendo a segunda descrição desse *Trypanosoma*. Seu primeiro relato foi realizado por Viola et al., (2008) em serpentes da espécie *Pseudoboa nigra*, oriunda da região central do Brasil. Esse compreende também o primeiro estudo filogenético molecular de uma espécie de *Trypanosoma* parasitando jiboias e as consequências do parasitismo exercido por este. Pessoa & Fleury (1969) identificou pela primeira vez a ocorrência de um *Trypanosoma* em serpentes da espécie *Boa constrictor amarali*, no estado do Mato Grosso, nomeando-o de *Trypanosoma constrictor*; entretanto, devido às limitações encontradas na época, o mesmo limitou-se apenas a relatar a ocorrência do achado, não sendo feita a caracterização molecular do mesmo.

Em nosso estudo, por meio da análise de esfregaços sanguíneos, obtivemos uma frequência de 15% (9/61) de animais infectados, uma porcentagem considerada alta, quando comparada com estudos similares, a exemplo o realizado por Viola et al. (2008) o qual, em um estudo que analisou 459 serpentes de diversas espécies e biomas do Brasil, obteve uma taxa de infecção de 2,4%, para infecção por *T. cascavelli* e *T. serpentis*. Biasi et al., (1975) examinaram 146 serpentes da espécie *Ophis merremii* e identificou apenas um animal infectado. Já Pessôa e Fleury (1969), de cerca de 700 serpentes Boidae avaliadas, apenas três animais foram identificados, estando parasitados por *T. constrictor* e *T. salamantae*. Pessôa e De Biasi (1972) obtiveram uma taxa de infecção de 1,3% em análise de uma população de 300 serpentes da espécie *Crotalus durissus*. Uma prevalência superior a encontrada em nosso estudo foi observada por Pessôa (1968), identificando uma taxa de infecção com *T. hoguei* de 30% em *Rachidelus brazili*. Recentemente, Ursula et al. (2014) encontraram em uma população de 45 serpentes das espécies *Python regius* e *Corallus caninus* uma prevalência de 9% de infecção por *Trypanosoma* sp., e Sato et al. 2009 identificaram uma *Python reginus* infectada com *Trypanosoma cf. varani*. A nossa taxa elevada de infecção pode ser explicada pelo fato de que 8 animais (88%) do total de infectados foram encontrados dentro do mesmo ambiente, no Zoológico de Aracaju, podendo esses indivíduos estarem expostos a um possível vetor do *Trypanosoma* nesse ambiente.

Pouco se sabe a respeito da especificidade por hospedeiros dos *Trypanosoma* de serpentes. Em estudo conduzido por Arantes e Fonseca (1931), os mesmos observaram que *T. butantanense* foi capaz de infectar nove espécies diferentes de serpentes.

Entretanto, experimentos tentando infectar lagartos e tartarugas com *Trypanosoma* de serpentes não obtiveram êxitos (AYALA, S.C. ATKINSON, C. AND VAKALIS, 1983). Viola et al. (2008), observaram que um *Trypanosoma* de *C. durissus* foi capaz de infectar *B. jararaca* e *O. guibei*, indicando uma falta de restrição dessa espécie. Nosso estudo traz dados interessantes a respeito da especificidade do *T. serpentis*, uma vez que essa é uma descrição em uma espécie diferente da qual foi primeiramente descrita, e interessante também o fato de que animais de diferentes estados analisados em nosso estudo apresentaram-se infectados com a mesma espécie do parasito. A falta de trabalhos explorando a diversidade de *Trypanosoma* em outras espécies de serpentes da região e no resto do país, e sua consequente caracterização molecular, é um fator limitante ao estudo da diversidade de *Trypanosoma* de serpentes no Brasil.

Os *Trypanosoma* de serpentes são chamados de grandes *Trypanosoma*. As formas tripomastigotas sanguíneas são descritas duas formas, um grupo formado por tripomastigotas grandes e largas, medindo entre 50 a 100 μ m de comprimento e de 3 a 5 μ m de largura (BRUMPT, 1914; PESSOA, S. B.; PESSÔA, 1928; ARANTES, J. B. AND FONSECA, 1931; FLEURY, 1969; BIASI, PESSÔA, PUORTO & FERNANDES, 1975; STEPHEN C. AYALA, CARTER ATKINSON, 1983; SAM R. TELFORD JR., 1995). O outro grupo é composto por formas tripomastigotas menores, medindo cerca de 30 μ m de comprimento, entretanto são mais largas, possuindo de 8 a 10 μ m de largura (WENYON, 1908; ARANTES, J. B. AND FONSECA, 1931; FONSECA, 1935; BRYGOO, 1965; AYALA, S.C. ATKINSON, C. AND VAKALIS, 1983; CHIA, N. M. AND MILLER, 1984). As formas encontradas nesse estudo apresentavam 53,21 μ m de comprimento e um corpo largo, aproximadamente 8,3 μ m de largura; apresentavam também uma ampla membrana ondulante, a qual lhe conferia uma largura média de 11,42 μ m, com um flagelo livre medindo entre 4,17 a 22,01 μ m. No estudo conduzido por Viola et al., (2009), o mesmo restringiu-se a realização da morfometria das formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. serpentis* oriundas de meio de cultivo em monocamada de células Hi-5 de inseto, o qual descreveu duas formas tripomastigotas, uma apresentando um comprimento 22,5 μ m (variando de 20 a 27 μ m), largura de 4,7 (+/- 1,5 μ m) e flagelo livre medindo 8,4 (+/- 3 μ m), e a outra medindo 12.8 μ m (+/- 2 μ m), 1,9 μ m de largura e flagelo livre de 7,0 μ m (+/-1,7 μ m). Os valores de morfometria obtidos pelo autor para a espécie são nitidamente menores que os encontrados em nosso estudo, entretanto é importante ressaltar que o mesmo não realizou as medidas das formas presentes no sangue, sendo então o nosso estudo o primeiro a apresentar tais dados. O

nosso cultivo foi realizado em meio NNN-LIT, o qual não é ideal para manutenção em longo prazo das culturas, sendo visto em cultivo apenas formas epimastigotas, e as mesmas apresentaram valores variando de 20 a 44 μ m, não distante dos valores descritos para a espécie em literatura, o qual é de 16 a 36 μ m, podendo essa diferença ser atribuída a diferentes meios de cultivos e/ou estágio de tempo do cultivo.

Viola et al. (2009) fizeram a descrição das formas sanguíneas de *T. cascavelli*, o qual apresenta valores de comprimento de 62 μ m (variando de 50 a 75 μ m) e largura de 9,3 μ m (variando de 6 a 13 μ m) e flagelo livre de 10 a 15 μ m, semelhantes ao encontrado em nosso estudo. A morfometria por si só não se caracteriza como uma fonte confiável de classificação de espécies de *Trypanosoma*, tendo em vista a versatilidade de troca de hospedeiro, bem como o pleomorfismo das formas tripomastigotas a depender do meio e hospedeiro em que se está inserida, devendo essa ser associada a técnicas de diagnóstico moleculares, afim de se identificar a espécie parasita.

Sabe-se muito pouco a respeito dos efeitos do parasitismo por *Trypanosoma* em serpentes. Em nosso estudo, observamos que as jiboias se apresentavam magras, com coloração de escamas opaca e restos de muda. Em um estudo de infecção experimental conduzido por Viola et al., (2008), o mesmo observou os efeitos do parasitismo de *Trypanosoma cascavelli* em serpentes da espécie *Crotalus durissus terrificus*; nessa espécie, os animais com carga parasitária elevada demonstraram-se apáticos, astênicos e anoréxicos, evoluindo para o óbito. Ainda no mesmo estudo, o autor avaliou a influência deste *Trypanosoma* sobre serpentes das espécies *Bothrops moojeni* (Viperidae) e *Oxyrhopus guibei* (Colubridae). A infecção foi bem-sucedida em ambas as espécies, entretanto foi observado uma parasitemia menor, não sendo relatado pelo autor a ocorrência de sinais clínicos decorrentes do parasitismo. Desta forma, podemos observar um comportamento distinto no parasitismo em espécies diferentes de serpentes, podendo esta estar associada a resistência natural por parte de algumas espécies e/ou maior suscetibilidade por outras. Em infecções naturais ou experimentais em mamíferos domésticos e silvestres por *Trypanosoma* salivares, é relatada a ocorrência de alguns sinais clínicos inespecíficos, observados nesse estudo, como apatia, caquexia, fraqueza, dermatites e presença de abscessos na pele, e sinais como anemia, dificuldade de locomoção, anorexia, também são apontados (COLPO et al., 2005; TARELLO, 2005). Mas o presente estudo tem a vantagem da descrição de sinais clínicos em animais infectados naturalmente.

A diminuição nos parâmetros eritrocitários consiste em um achado importante da infecção por *Trypanosoma* salivar em diversas espécies de animais. Apesar de não identificarmos redução significativa no valor total de eritrócitos entre os grupos infectados e não infectados, foi possível observar a redução dos valores de hematócrito, o qual indica uma redução na massa eritrocitária, além de redução também dos valores de hemoglobina abaixo dos valores obtidos para os animais não parasitados. Isso demonstra que os animais infectados apresentam hemácias menores (micrócitos) e com um menor conteúdo de hemoglobina (hipocromia). Resultados similares foram vistos em experimento realizado por Silva et al. (2009), Ezeokonkwo et al., (2010) e Silva et al. (2013), os quais observaram uma diminuição nos valores de volume globular e hemoglobina em camundongos, gatos e cães, infectados com *T. evansi*, *T. congolense* e *T. brucei*, respectivamente. Ambos os autores também encontraram valores normais para CHCM, caracterizando o quadro dos animais como anemia normocítica e normocrômica. Da Silva et al., (2013) também não identificou alterações nesses parâmetros em estudo realizado em ratos. Entretanto, em nosso estudo identificamos um valor de VCM reduzido no grupo parasitado, além de não observar queda no número total de hemácias. A não diminuição no número de eritrócitos nesses animais pode estar relacionada com a cronicidade da infecção, uma vez que Stijlemans et al. (2008) observaram que a eritrofagocitose e consequente diminuição da contagem de hemácias em camundongos estava associada a fase aguda da infecção por *T. brucei*, e à medida que a infecção se cronifica ocorre uma redução na disponibilidade de ferro na circulação sanguínea e um decaimento da disponibilidade desse para a produção de hemoglobina.

O quadro de anemia estabelecido em infecções por *Trypanosoma* extracelular tem sido atribuídas ao contato direto com as células sanguíneas, captação de ferro plasmático e secreção de moléculas presentes em microvesículas de membrana do parasito, as quais são capazes de estimular uma resposta imunológica com perfil de citocinas Th1, com ativação de células mieloides e eritrofagocitose seletiva das hemácias com proteínas antigênicas em sua superfície (COUSTOU et al., 2012; HABILA et al., 2012; SZEMPRUCH et al., 2016). Esse fenômeno pode não estar sendo visualizado de forma expressiva nos animais infectados no presente estudo devido à baixa carga parasitária apresentada pelos animais, uma vez que Szempruch et al. (2016) identificou, em experimento com *Trypanosoma brucei rhodesiense*, que o grau de hemólise em ratos e a severidade da anemia estava diretamente relacionado com a carga parasitária na circulação sanguínea.

A diminuição dos níveis de hemoglobina em mamíferos parasitados por *Trypanosoma*, e consequente anemia, tem sido associada à ação das citocinas pró-inflamatórias, e pela ação de células do sistema reticuloendotelial na captação de ferro e eritropoiese. Durante o processo de inflamação normal, citocinas tais como Interferon gama agem diminuindo ferroportina, principal transportador de ferro do interior dos macrófagos, ocasionando um bloqueio na mobilização desse mineral e de seu uso na síntese de hemoglobina. Esse evento também está associado ao aumento na secreção de hepcidina, a qual age regulando a captação de ferro intestinal e sua mobilização pelas células de estoque por bloqueio da ferroportina (YANG et al., 2002; SILVA et al., 2013; ANTUNES & CANZIANI, 2016; VILLALBA-ALEMÁN et al., 2018). Outras citocinas, tais como IL-10 e TNF agem diminuindo os efeitos da anemia em animais infectados por *T. brucei* (MUSAYA et al., 2015). Em estudo realizado por Silva et al. (2009), o qual avaliaram a dinâmica hematológica de serpentes *Crotalus durissus* experimentalmente imunizadas com bacilo de Calmette-Guérin (BCG), identificou-se baixos valores de CHCM e HGM (anemia hipocrômica). Esses resultados foram associados a uma possível ação de citocinas pró-inflamatórias, as quais agem bloqueando o ferro reciclado por parte dos macrófagos, característico em quadros de anemias por processos inflamatórios, demonstrando certa semelhança nos mecanismos de regulação de ferro presente em mamíferos e nas serpentes. Esses achados podem estar relacionados ao fato de que, mesmo não encontrando níveis de ferro reduzidos nos animais infectados, o seu transporte ou mesmo captação poderiam estar prejudicados nesses animais.

Os esforços do organismo animal em diminuir os níveis de ferro circulante, estocando-o no citoplasma das células do sistema reticuloendotelial, é uma importante ação no controle de tripanosomatídeos, uma vez que o protozoário depende desse mineral para desempenhar diversas funções orgânicas importantes, como replicação do DNA, defesa antioxidante, respiração mitocondrial, entre outras. Os mecanismos de captação de ferro na maioria das espécies de tripanosomatídeos é desconhecido, entretanto sabe-se que *Trypanosoma* africanos do subgrupo Salivaria (*T. vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*, *T. evansi*, *T. equiperdum*) obtém o ferro do hospedeiro por meio da absorção da proteína carreadora de ferro transferrina (TAYLOR & KELLY, 2010). Dada a característica extracelular, apresentada pelas diversas espécies de *Trypanosoma* de serpentes, é possível que a forma de captação do ferro realizado por esses assemelhe-se aos das espécies de mamíferos. Krishnamurthy et al. (2007) relatam que a diminuição do estoque de ferro precede a deficiência do transporte desse íon, o que ocasiona redução da síntese de

hemoglobina, levando a alterações no processo de maturação dos eritrócitos e o surgimento de anemias microcítica hipocrômica.

Os heterófilos e eosinófilos foram os dois tipos leucocitários que apresentaram diferença estatística significativa, quando comparados os grupos de animais parasitados e negativos, mostrando uma elevação de ambos perfis celulares nos animais com *Trypanosoma*. A tendência ao crescimento do número total de leucócitos aparentemente está relacionada ao expressivo aumento no número dessas duas células. Os heterófilos são células apresentadas pelos répteis e que possuem funções análogas às desenvolvidas pelos neutrófilos dos mamíferos. Essa célula está intimamente relacionada ao processo de fagocitose, estando em número aumentado em distúrbios inflamatórios que envolvem bactérias e parasitas, sendo a resposta inata de grande importância na prevenção da progressão das doenças (CAMPBELL, 2015).

O papel dos neutrófilos em infecções por *Trypanosoma* intra e extracelulares tem sido discutido, e acredita-se que esses atuam no combate a formas de protozoários que ocorrem no inseto vetor, as quais ainda não se adaptaram ao novo ambiente do organismo dos vertebrados. Entretanto essas células exercem pouca ação sobre as formas tripomastigotas sanguíneas, dependendo de uma citotoxicidade mediada por anticorpos para poder eliminar o *Trypanosoma* (Thorne & Blackwell 1983). Baseando-se em tal preceito, a elevação dos níveis de heterófilos nos animais infectados com *Trypanosoma* pode ser justificado pela presença constante do vetor artrópode no ambiente, realizando o repasto sanguíneo e inoculando novas formas parasitárias no hospedeiro. CALJON et al. (2018) estudaram em camundongos a importância dos neutrófilos na resposta cutânea a *T. brucei*, e observaram dois picos de neutrofilia, na circulação e infiltração dos mesmos para os sítios de replicação do parasito. Entretanto, essas células foram ineficazes no combate ao parasito, pois houve uma rápida replicação do mesmo na pele e migração para a circulação sanguínea.

Tanto em répteis como em mamíferos, a ação dos eosinófilos está relacionada a infecções parasitárias e à estimulação do sistema imune. Não se tem informações a respeito da susceptibilidade de *Trypanosoma* sessão Salivaria aos grânulos secretados por eosinófilos, entretanto o *T. cruzi* em especial, quando revestido por imunoglobulinas de mamíferos, torna-se susceptível a ação das enzimas das vesículas eosinofílicas (THORNE & BLACKWELL, 1983).

A resposta imune em infecções por *Trypanosoma* salivares em animais varia de acordo com a susceptibilidade animal e a patogenicidade das cepas envolvidas, podendo

ser observado uma leucocitose inicial seguida pelo esgotamento do sistema imune, representada pela depleção dos linfócitos B (ONAH; HOPKINS; LUCKINS, 1996). Experimentos de infecções por *T. congolense*, *T. brucei* e *T. vivax* em diferentes espécies domésticas demonstraram uma gradativa redução da contagem de leucócitos em cães e em pequenos ruminantes, sendo essa atribuída à redução da contagem de linfócitos, com elevações transitórias no número de neutrófilos, não sendo suficiente para gerar um processo de leucocitose. Alterações nos valores de eosinófilos não é relatada, e tal achado reforça um caráter imunodepressor em infecções por *Trypanosoma* salivar, sendo observado em diversas espécies de mamíferos e em humanos (ANOSA, 1983; EZEOKONKWO et al., 2010). A ausência de alterações no número total de leucócitos também é relatada (OKOLO; NWEZE; EZE, 2019).

Apesar de que em nosso estudo não foram observadas alterações bioquímicas significativas entre os grupos de animais infectados e não infectados, experimentos de infecção em diversas espécies de mamíferos, bem como em animais infectados naturalmente, demonstra uma gama de alterações desses parâmetros. Um dos principais parâmetros bioquímicos alterados em infecções por *Trypanosoma* salivares, em animais, é a redução dos níveis de glicose. A hipoglicemia é apontada como sendo decorrente da captação excessiva por parte desses *Trypanosoma* para uso em metabolismo próprio, sendo essa mais acentuada nos picos de parasitemia, podendo se encontrar normal em pacientes com baixa carga parasitária (TAIWO et al., 2003; TAKEET & FAGBEMI, 2010; PADMAJA, 2012; DESCHAMPS et al., 2016). A redução dos níveis de proteínas plasmáticas em infecções experimentais por *T. evansi* e *T. congolense* é descrita (SIVAJOTHI, 2015; SADIQUE et al, 2001). Tal efeito não foi observado em alguns estudos envolvendo ovelhas e bovinos zebus infectadas com *T. brucei* e bovinos infectados por *T. vivax* (TAIWO et al., 2003; DAGNACHEW et al., 2014). A diminuição dos valores séricos de proteínas totais está associada a depleção da albumina por parte do parasito, sendo comumente observado nas infecções agudas, entretanto a normalização ou elevação das proteínas plasmáticas tem sido justificada pela elevação dos títulos de anticorpos contra os parasitos na fase crônica da infecção (SIVAJOTHI, 2015).

Os níveis de colesterol em diferentes espécies de animais podem estar alterados, sendo seu aumento em infecções experimentais por *T. brucei* relacionado à acometimentos hepáticos severos, comprometendo a capacidade desse órgão de realizar um adequado metabolismo de lipídeos (ADEJINMI et al, 2001; ABENGA e ANOSA, 2007). Diminuição dos valores de colesterol também podem ser identificados, sendo esses

atribuídos a necessidade por parte dos *Trypanosoma* extracelular na síntese e crescimento de membrana (DAGNACHEW et al., 2014). Infecções por *Trypanosoma* africanos também promovem o aumento bilirrubina, sendo em coelhos associados ao quadro de anemia hemolítica (GOW et al., 2007; TAKEET e FAGBEMI 2010). Alterações nos valores de ureia e creatinina são observadas tanto em infecções por *T. cruzi*, quanto em infecções por *T. brucei* e *T. congolense*, estando ambas elevadas no soro animal, sendo que na infecção por *T. cruzi* decorre da replicação do protozoário nos tecidos renais, com disfunções glomerulares (OMEJE & ANENE, 2012; LEMOS et al., 2013; S. SIVAJOTHI et al, 2015).

Elevação dos níveis de fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) também são achados comuns em infecções por *Trypanosoma congolense* em coelhos, sendo o aumento de ALT e FA associado tanto a danos teciduais quanto a morte dos parasitas pela ação do sistema imune (TAKEET e FAGBEMI, 2010). A elevação dessas enzimas em indivíduos infectados por *Trypanosoma* decorre de danos aos hepatócitos, aos cardiomiócitos e músculo esquelético (ORHUE et al., 2005; DAGNACHEW et al., 2014). Apesar de serem achados comuns, animais infectados podem não expressar alterações nos valores dessas enzimas, a exemplo de um experimento de infecção em gatos, com *T. evansi*.

O ferro é um íon de grande importância em reações bioquímicas nos organismos eucariotos e procariotos. Em infecções naturais e experimentais por *Trypanosoma* da classe salivaria, é comum encontrar redução dos níveis séricos desse metal, estando esse diretamente relacionado aos picos de parasitemia (GUTIERREZ et al., 2006; NEILS et al., 2007). Entretanto, em estudo experimental conduzido por Da Silva et al., (2009) com infecção de gatos com *Trypanosoma evansi*, houve diminuição dos níveis de ferro mesmo em picos baixos de parasitemia. Acredita-se que os baixos valores de ferro na infecção por *Trypanosoma* decorrem alterações fisiológicas nas vias de absorção, armazenamento e transporte desse íon no organismo, diminuindo assim a disponibilidade do mesmo para o uso por organismos patogênicos (WEISS, 2005; DA SILVA et al., 2013).

A não observação de alterações nos parâmetros bioquímicos aqui investigados não descarta uma possível patogenicidade por parte do *Trypanosoma serpentis* em *Boa constrictor*. Como demonstrado acima, diferentes espécies de *Trypanosoma* promovem diferentes alterações metabólicas nos animais, sendo essas alterações altamente dependentes da carga parasitária, da espécie animal envolvida, da virulência da cepa de *Trypanosoma*, do estágio em que se encontra a infecção, aguda ou crônica. Dessa forma,

não se pode afirmar a ausência ou presença de patogenia por parte desse *Trypanosoma* sem antes realizar estudos clínicos controlado de infecção e acompanhar por um dado período de tempo a cinética de resposta imune dos animais infectados.

O sequenciamento do gene 18S rRNA obtidas em nosso estudo não se apresentou adequado, pós refinamento e alinhamento, para a montagem de uma árvore filogenética acurada. Apesar de ser o primeiro marcador utilizado para inferência filogenética em *Trypanosoma* e seu uso ser amplamente aplicado até os dias atuais, análises filogenéticas baseadas exclusivamente no gene SSU rDNA, tende a fornecer resultados ambíguos, gerando árvores que apoiam ou rejeitam de forma robusta a monofilia ou parafilia dos Trypanosomatidae dependendo da faixa de táxons incluídas no alinhamento; desta forma, o mesmo tende a não ser confiável para gerar árvores com topologias mais profundas (LUKEŠ et al., 1997; HAMILTON et al., 2004; VIOLA et al., 2008). Tal efeito pode ser observado em estudo realizado por DARIO et al. (2017a), o qual estudando a diversidade de *Trypanosoma* em morcegos e marsupiais brasileiros, identificaram uma infecção por *T. cascavelli* em *Monodelphis americana*, agrupando-o no clado dos répteis, baseando sua análise no gene SSU rDNA; entretanto, a árvore montada a partir da análise do gene gGAPDH identificou esse mesmo exemplar como pertencente a espécie *T. dionisii*, pertencente ao clado Schizotrypanum, mesmo o qual faz parte o *T. cruzi*. Apesar do autor assumir como verdadeiro o resultado apresentado pela análise do gene SSU rDNA, o mesmo autor ainda identificou uma melhor sensibilidade do gene gGAPDH em identificar infecções mistas, uma vez que animais infectados com três espécies de *Trypanosoma*, *T. c. cruzi TcIII/V*, *T. dionisii* e *T. c. cruzi TcI* foram identificados como sendo apenas *T. dionisii*, baseando-se em análise com sequências recuperadas apenas para o gene SSU rDNA.

A análise filogenética baseada nos genes gGAPDH e 18S fornece um forte suporte para a diferenciação de clados dentro do gênero *Trypanosoma*, realizando agrupamentos profundos e permitindo a identificação de diferentes espécies, sendo a soma de ambos melhor que o uso isolado dos mesmos. Entretanto, quando usados de forma isolada, o gene gGAPDH apresenta um maior poder de inferência, sendo capaz de identificar e organizar as espécies de *Trypanosoma*, agrupando-as em clados suportados pela análise conjunta dos genes, demonstrando uma superioridade frente ao uso isolado do gene 18S (HAMILTON, GIBSON, STEVENS, 2007; HAMILTON et al., 2009;). Devido a um sequenciamento do gene 18S com regiões pobres, ou seja, menos sequenciada, apresentando um viés na análise comparada a outras sequências de *Trypanosoma*,

optamos pela construção da árvore baseada apenas no gene gGAPDH, e na decodificação de sua sequência de aminoácidos.

Em nosso estudo a montagem da árvore filogenética agrupou tanto o isolado oriundo da Bahia quanto os isolados do estado de Sergipe, como pertencentes a um mesmo espécie, formando um clado composto pelos *Trypanosoma serpentis* e *Trypanosoma cascavelli* (**Fig. 11**). O *T. serpentis* foi descrito pela primeira vez por Viola et al., (2009) em serpente da espécie *Pseudoboa nigra*. Apesar de estarem no mesmo ramo, todos os isolados apresentaram uma sutil distinção entre si e, em relação ao isolado 1052 de *T. serpentis*, sugere-se a predisposição para um futuro processo de divergência ou subespeciação. A primeira descrição de um clado único albergando lagartos e serpentes foi realizado por Viola et al., (2008), o qual agrupou os isolados de *T. serpentis* e *T. cascavelli* no mesmo ramo que os *Trypanosoma varani*, *T. gecko* e *T. scelopori* de lagartos, entretanto em clados distintos (VIOLA et al., 2009b). Em nossa árvore, o *Trypanosoma freitasi* agrupou-se no mesmo ramo que o clado dos isolados de serpentes; esse compreende uma espécie isolada a partir do marsupial *Monodelphis brevicaudata*, e recentemente teve a sequência dos genes gGAPDH e 18S analisadas filogeneticamente por ORTIZ et al. (2018), o agrupando em um clado composto por lagarto/serpentes proposto por Viola et al., (2009). O achado não é único, outro estudo filogenético agrupou um isolado de *Trypanosoma* de morcego no clado lagarto/serpente, entretanto tal estudo baseou-se apenas na análise do gene 18S (DARIO et al., 2017b). Votýpka et al., (2015) sugere que o uso concatenado de vários genes podem esclarecer a real interação entre essas espécies de *Trypanosoma* de mamíferos e de répteis, uma vez que um número maior de genes contem maiores informações filogenéticas, de forma a produzir árvores com topologias mais precisas.

A relação entre os *Trypanosoma* de serpentes e de lagartos podem ser explicada dada a proximidade evolutiva entre ambos, os quais agrupam-se como sendo da mesma origem, Squamata, e mais distante dos crocodilianos e Testudines, sendo esses últimos acometidos por *Trypanosoma* que se agrupam no clado aquático (DOUGLAS; JANKE; ARNASON, 2006). Além disso, há possibilidade de que os vetores tanto para os *Trypanosoma* de serpentes quanto para os de lagartos sejam os mesmos, flebotomíneos, os quais devido a seu hábito promíscuo possam vir a parasitar ambos os grupos de animais, a exemplo de achado anterior (SATO et al., 2009), onde um *Trypanosoma* intimamente relacionado com *T. varani* foi isolado do sangue de *Python reginus*.

Apesar de se ter o conhecimento que flebótomos podem ser fontes de infecção para anuros, os *Trypanosoma* desse grupo de animais tem sido encontrados distantes dos *Trypanosoma* de serpentes e lagartos, sendo esse hematozoários de anuros agrupados no clado pertencente aos *Trypanosoma* aquáticos (FERREIRA et al., 2015). Outros mosquitos também são incriminados com transmissores de *Trypanosoma* em aves (VOTÝPKA et al., 2012). A transmissão por essa classe de inseto pode explicar também a grande taxa de infecção apresentada nos animais de Sergipe e observado em nosso estudo, uma vez que a constante presença do vetor possibilita a permanência e transmissão dos *Trypanosoma* na população de jiboias do zoológico.

O presente estudo compreende a primeira identificação de *Trypanosoma serpentis* em serpentes da espécie *Boa constrictor* por meio do diagnóstico molecular, bem como a segunda descrição em literatura da ocorrência do *Trypanosoma serpentis* e seu primeiro relato em um hospedeiro da espécie diferente da qual o mesmo foi primeiramente isolado e em bioma e região diferentes. O presente trabalho também faz a primeira caracterização morfológica da forma tripomastigota sanguínea desse parasito. A escassez de estudos envolvendo filogenia de *Trypanosoma* em serpentes dificulta uma melhor visão sobre o panorama de infecção, uma vez que apenas duas sequências de *Trypanosoma* em serpentes brasileiras foram depositadas, sendo as demais espécies descritas por meio da descrição morfológica, de hospedeiro e regional. Nosso estudo estimula a realização de novos estudos sobre diversidade de *Trypanosoma* em serpentes, uma vez que todos os exemplares isolados no estudo de estados diferentes da região Nordeste pertenciam a uma mesma espécie, além de ser espécie que inicialmente foi descrita para uma região e bioma distinto, e um hospedeiro diferente, levantando a questão de qual é a real diversidade de *Trypanosoma* de serpentes no país.

6. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento do presente estudo foi possível realizar o primeiro diagnóstico baseado em biologia molecular de *Trypanosoma* em jiboias (*Boa constrictor*), bem como a segunda descrição de um *Trypanosoma* parasitando essa espécie de serpente e a primeira para a Região Nordeste. Por meio da análise dos valores de eritrograma e leucograma, foi possível observar uma redução significativa dos valores de volume globular, VCM, Hb e HCM nos animais infectados pelo protozoário, apontando uma possível influência do mesmo sobre o estoque de hemoglobina celular. Os animais parasitados por *Trypanosoma* exibiram um aumento nos perfis de heterófilos e eosinófilos, sendo esta relação de caráter obscuro. Não foram observadas alterações significativas nos valores de bioquímica clínica entre animais infectados e não infectados. O sequenciamento dos genes SSU rRNA e gGAPDH, identificaram os isolados encontrados no presente estudo como pertencente a espécie *Trypanosoma serpentis*, a realização da inferência filogenética para os resíduos de aminoácidos da proteína gGAPDH agruparam todos os isolados em um único clado, lagarto/serpente, ao lado do *T. cascavelli*, também isolado de serpentes.

7. REFERÊNCIAS

- ATTIAS, M. Developmental and ultrastructural characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma herthameyeri* n. sp of Brazilian leptodactilydae frogs. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, p.1–13, 2016.
- ANOSA, V. O. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in Ruminants, Horse and Rodents. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v. 30, p. 717–741, 1983.
- ANTUNES, S.A.; CANZIANI, M.E. Hepcidina: um importante regulador do metabolismo de ferro na doença renal crônica. **Brazilian Journal of Nephrology.**, v.38, n.3, p.351-355, 2016.
- AYALA, S.C.; MCKAY, J.G. *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. **The Journal of Protozoology**, v.18, n.3, p.430-433, 1971.
- BARBOSA, A.R. et al. Contribuição ao estudo parasitológico de jibóias, *Boa constrictor constrictor* Linnaeus, 1758, em cativeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.2, n.2, 2006.
- BARNETT, L.K. et al. The impact of parasites during range expansion of an invasive gecko. **Parasitology**, v.145, n.11, 2018.
- BAUER, A; BAUER, G. Squamata –sauria (Iguana e Lagartos) In: CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014, 2^oed, 170-185p.
- BÜSCHER, P. et al., Human African trypanosomiasis. **The Lancet Infectious Diseases.**, v.390, p.2397-2409, 2017.
- CALIJON, G. et al. Neutrophils enhance early *Trypanosoma brucei* infection onset. **Scientific reports**, v.8, n.1, 2018.
- CAMPBELL, T.W. Hematologia em répteis. In: THRALL, M.A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, 2. ed.
- CARBAJAL-MARQUEZ, R.A. et al. Endoparasites of *Crotalus tzabcan* (Serpentes: Viperidae), with a checklist in rattlesnakes. **Journal of Parasitic Diseases**, 2018.
- CARVALHO, A.L.M. Third-generation transdermal delivery systems containing zidovudine: effect of the combination of different chemical enhancers and a microemulsion system. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, 2018.
- CATHERINE, B.R. et al. Prevalence of *Amblyomma gervaisi* ticks on captive snakes in Tamil Nadu. **Journal of Parasitic Diseases**, v.41, n.4, p952-958, 2017.
- CHARVAT, R.A. et al. Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. **Toxicon**, 2018.

- CHIA, N.M.; MILLER, H.J. Morphological and developmental studies of the snake trypanosome *Trypanosoma hydrae* Ayala, Atkinson, Vakalis, 1983 in Experimentally infected hosts and in culture. **The Journal of Protozoology**, v.31, n.2, p.352-356, 1984.
- COOPER, C. et al. Host-parasite relationships and life histories of Trypanosomes in Australia. **Advances in Parasitology**, v.97, p.47-109, 2017.
- COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: lista de espécies 2015. **Herpetologia Brasileira**, v.4, n.3, 2015.
- COUSTOU, V. et al. Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis. **Cellular Microbiology**, v.14, n.3, p.431-445, 2012.
- CHRISENSEN, H.A.; HERRER, A. *Lutzomyia Vespertilionis* (Diptera: Psychodidae): potential vector of chiropteran Trypanosomes in Panama. **Journal of Medical Entomology**, v.12, n.4, p.477-478, 1975.
- CURTIS-ROBLES, R. et al. Parasitic interactions among *Trypanosoma cruzi*, triatomine vectors, domestic animals, and wildlife in Big Bend National Park along the Texas-Mexico border. **Acta Tropica**, v.188, p.225-233, 2018.
- DARIO, M. A. et al. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1-22, 2017a.
- DARIO, M. A. et al. Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary *Trypanosomatid* diversity in Brazilian bats. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, 20 jul. 2017b.
- DONALDSON, M. et al. Epizootic of fatal amebiasis among exhibited snakes: epidemiologic, pathologic, and chemotherapeutic considerations. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.6, p.807-817, 1975.
- DOUGLAS, D. A.; JANKE, A.; ARNASON, U. A mitogenomic study on the phylogenetic position of snakes. **Zoologica Scripta**, v. 35, n. 6, p. 545-558, 2006.
- DVORÁKOVÁ, N. et al. Phylogeny and morphological variability of trypanosomes from African pelomedusid turtles with redescription of *Trypanosoma mocambicum* Pienaar, 1962. **Protist**, v.166, p.599-608, 2015.
- EZEOKONKWO, R. C. et al. Comparative haematological study of single and mixed infections of mongrel dogs with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* brucei. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 48-54, 2010.
- FERMINO, B.R. et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of crocodylus at the miocene. **Parasites & Vectors**, v.6, p.313, 2013.
- FERMINO, B. R. et al. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 3, p. 368-378, 1 dez. 2015.

FERREIRA, R. C. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the amazonia, atlantic forest and pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, p.1623–1638, 2007.

FERREIRA, J. I. G. DA S. et al. Anuran trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 63–70, 2015.

FILGUEIRAS, A. et al. Natural *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) infection among mammals from Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, 2018.

FIORINI, L.C. et al. Morphological and molecular identification of ticks infesting *Boa constrictor* (Squamata, Boidae) in Manaus (Central Brazilian Amazon). **Braz. Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, n. 4, p. 539-542, 2014.

GANYO, E.Y. et al. Hematologia de N'Dama e rebanhos de gado Shorthorn da África Ocidental sob desafio natural de *Trypanosoma vivax* em Gana. **F1000Res.**, v.7, p.314, 2018.

GRAMICCIA, M.; GRANDONI, L.; MAROLI, M. Caractérisation enzymatique de *Trypanosoma platydictyli catoullard*, 1909 isolé de *Sergentomyia minuta minuta* rondani, 1843 en italie. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v.63, n°2, p.154-156, 1989.

HAMILTON, P. B. et al. Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393–1404, 2004.

HAMILTON, P. B. et al. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 81–86, jan. 2009.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 15–25, 2007.

HANNAERT, V. et al. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, n. 1–2, p. 115–126, 1992.

HANNAERT, V.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. M. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase from different kinetoplastida. **Journal of Molecular Evolution**, v. 47, n. 6, p. 728–738, 1998.

HARVEY, J. W. et al. Hematology of healthy Florida manatees (*Trichechus manatus*). **Veterinary Clinical Pathology**, Columbia, v. 38, n. 2. p. 183–193. 2009.

HENDERSON, R.W. Ecological correlates and patterns in the distribution of neotropical boines (serpentes:Boidae): a preliminary assessment. **Herpetological Natural History**, v.3, n.1, p.15-27, 1995.

HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. Developmental stages of *Trypanosomatid* flagellates: a new terminology. **Nature**, v.212, p.1385-1386, 1966.

JANSEN, A.M. et al. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.11, p.502, 2018.

JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L. **Doença de chagas: manual para experimentação animal** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 368, 2000. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85- 85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

KAUFFMAN, K.L. et al. Vertical Transmission of Hepatozoon in the Garter Snake *Thamnophis elegans*. **Journal of Wildlife Diseases**, v.53, n.1, 2017.

KERR, M. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária Bioquímica Clínica e Hematologia**. São Paulo: Roca, 2003.

KINDLOVITS, L.M. et al. Aspectos morfológicos e ultraestruturais de células sanguíneas de *Crotalus durissus terrificus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.2, p.183-194, 2017a.

KINDLOVITS, L.M. et al. Aspectos citoquímicos e morfológicos de elementos sanguíneos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidas em cativeiro no serpentário do Instituto Vital Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.3, p.667-675, 2017b.

LILLYWHITE, H. B. How snakes work: structure, function, and behavior of the world's snakes. **Oxford University Press**, p.241, 2014.

LIMA, L. et al. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. **Protist**, v. 163, p. 856–872, 2012.

LIMA, L.C.B. **Filogenia e delimitação de espécies no complexo *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae) utilizando marcadores moleculares**. Tese de Doutorado. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva. Universidade de São Paulo, SP, 2016.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. - 3. ed. – Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007.

LUKEŠ, J. et al. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, n. 5, p. 521–527, 1997.

MAFIE, E. et al. Integrative taxonomic approach of trypanosomes in the blood of rodents and soricids in Asian countries, with the description of three new species. **Parasitology Research**, 2018.

MARIANA, A. et al. Acariasis on pet Burmese python, *Python molurus bivittatus* in Malaysia. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, n.3, p.227-228, 2011.

MATTA, N.E. et al. Plasmodium parasites in reptiles from the Colombia Orinoco-Amazon basin: a re-description of plasmodium kentropyxi Lainson R, Landau I, Paperna

I, 2001 and plasmodium carmelinoi Lainson R, Franco CM, da Matta R, 2010. **Parasitology Research**, 2018.

MCALLISTER, C.T. et al. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae: *Eimeria*) from the southern black racer, *Coluber constrictor priapus* (Reptilia: Ophidia: Colubridae) from Arkansas, USA. *Acta Parasitologica*, v.63, n.3, p.558-562, 2018.

MILLE, M.A. et al. Parasite spillover: indirect effects of invasive Burmese pythons. **Ecology and Evolution**, v.1, n.11, 2017.

MOÇO, T.C. et al. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.8, p.1169-1176, 2002.

MUSAYA, J. et al. Role of cytokines in *Trypanosoma brucei*-induced anaemia: a review of the literature. **Malawi Medical Journal**, v.27, n.2, p.45-50, 2015.

NAMBALA, P. et al. Comparative evaluation of dry and liquid RIME LAMP in detecting trypanosomes in dead tsetse flies. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.85, n.1, 2018.

OCAÑA-MAYORGA, S. et al., Influence of ecological factors on the presence of a triatomine species associated with the arboreal habitat of a host of *Trypanosoma cruzi*. **Parasites & Vectors**, v.11, n.567, 2018.

OKOLO, C. C.; NWEZE, N. E.; EZE, I. J. Hematobiochemical and Immunological Responses of Rats Treated with Multi-strain Probiotics and Infected with *Trypanosoma brucei*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2019.

ONAH, D. N.; HOPKINS, J.; LUCKINS, A. G. Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Parasitology Research**, v. 82, n. 8, p. 659–663, 1996.

OPPERDOES, F. R. .; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. **FEBS Letters**, v. 80, n. 2, p. 360–364, 1977.

ORTIZ, P. A. et al. Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed Rattus-borne *Trypanosoma* (Herpetosoma) lewisi and its allied species in blood and fleas of rodents. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 380–390, 1 set. 2018.

OZZETI, P.A. **Hematopoeese em serpentes *Oxyrhopus guibei* (Hoge & Ramona, 1978) (Ophidia: Dispsadidae): Caracterização morfológica, citoquímica e ultraestrutural. Dissertação (mestrado).** Instituto de Biociências da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2013.

PACHECO, T.A. et al. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma* (Megatrypanum) theileri in cattle in Brazil's western Amazon region. **Braz. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2018.

PESSOA, S. B.; FLEURY, G. C. Duas novas espécies de Tripanosomas parasitas de serpentes do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 29, p. 81–86, 1969.

PESSÔA, S. B. *Trypanosoma hogei* n. sp. parasita da falsa mucurana (*Rachidelus brazili* Boul.). **O Hospital, Rio de Janeiro**, v. 73, p. 1257–1260, 1968.

PESSÔA, S. B.; DE BIASI, P. *Trypanosoma cascavelli* sp. n. parasita da cascavel: *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 67–70, 1972.

PHUMEE, A. et al. Detection of an unknown *Trypanosoma* DNA in a *Phlebotomus stantoni* (Diptera: Psychodidae) Collected From Southern Thailand and Records of New Sand Flies With Reinstatement of *Sergentomyia hivernus* Raynal & Gaschen, 1935 (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 2, p. 429–434, 2016.

PIZZATTO, L. et al. Food habits of Brazilian boid snakes: overview and new data, with special reference to *Corallus hortulanus*. **Amphibia-Reptilia**, v.30, p.533-544, 2009.

POURJAFAR, M. et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* in Iranian dromedary camels. **Parasitology Research**, v.112, p.899–903, 2013.

PYRON, R.A. A Taxonomic Revision of Boas (Serpentes: Boidae). **Zootaxa**, n. 2, p.249–260, 2014.

RADWANSKA, M. et al. Salivarian Trypanosomosis: a review of parasites involved, their global distribution and their interaction with the innate and adaptive mammalian host immune system. **Frontiers in Immunology**, v.9, 2018.

RAMO, S. et al. Dermatite infecciosa em uma colônia de python (*Python regius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.29, n.4, p.461-4, 1998.

RINALDI, L. et al. Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* isolates from pet lizards and snakes in Italy. **Parasite**, v.19, p.437-440, 2012.

SAMINDA, P. et al. Parasites of selected reptiles of the national zoological garden, Sri Lanka. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.40, n.2, p.272–275, 2009.

SANDERSON, C.J.; de SOUZA, W. A morphological study of the interaction between *Trypanosoma cruzi* and rat eosinophils, neutrophils and macrophages in vitro. **Journal of Cell Science**, v.37, p.275-86, 1979.

SANTOS, M.M.V. et al. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). **Parasitology Research**, v.97, p.94–97, 2005.

SANTOS, F.M. et al. Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. **Plos One**, v.13, n.8, 2018.

SATO, H. et al. *Trypanosoma* cf. *Varani* in an Imported Ball Python (*Python reginus*) from Ghana. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 1029–1033, ago. 2009.

SILVA, C.B. et al. Iron metabolism and its relationship to anemia and immune system in *Trypanosoma evansi* infected rats. **Experimental Parasitology**, v.133, p.357–364, 2013.

SILVA, A.S. et al. *Trypanosoma evansi*: Hematologic changes in experimentally infected cats. **Experimental Parasitology**, v.123, p.31–34, 2009.

SILVA, F. **Perfil hematológico, bioquímico Sérico, nutricional e biométrico de filhote de peixe-boi marinho (*Trichechus manatus manatus* Linnaeus, 1758) mantidos em cativeiro no centro de mamíferos aquáticos – CMA/ICMBio, Ilha de Itamaracá.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2008.

SILVEIRA, G. F. & MARTINS-NETO, R. G. **A Interferência Humana Na Mudança Dos Padrões Ecológicos E Comportamentais Das Serpentes: Um Problema De Saúde Pública.** In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de setembro de 2007, Caxambu – MG.

SIQUEIRA, A.M. Subfilo Mastigophora In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Atheneu, 2005, 11^oed.

SOU, S.K. et al. Camallanides prashadi Baylis and Daubney, 1922 (Nematoda, Camallanidae) in Xenochropis piscator (Schneider, 1799) (Reptilia, Squamata) and discussion on the synonymy of Camallanides piscatori Khera, 1954 from West Bengal, India. **Journal of Parasitic Diseases**, 2018.

STIJLEMANS, B. et al. Role of iron homeostasis in trypanosomiasis-associated anemia. **Imunobiologia**, v.213, p.823-35, 2008.

SZEMPRUCH, A.J. et al. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. **Cell**. v.14, n.164, p.246–257, 2016.

TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. Iron metabolism in *Trypanosomatids*, and its crucial role in infection. **Parasitology**, v.137, p.899–917, 2010.

THALL, Mary et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária.** São Paulo: Roca, 2007.

THOISY, B. et al. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in french guiana. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 5, p.1035-1040, 2000.

THORNE, K.J.; Blackwell, J.M. Morte mediada por células de protozoários. **Advances in Parasitology**. v.22, p.43-151, 1983.

TOMÉ, B. et al. Hepatozoon infection prevalence in four snake genera: influence of diet, prey parasitemia levels, or parasite type? **Journal of Parasitology**, v.98, n.5, p.913-917, 2012.

UETZ, P. The Reptile Database: Species Numbers (as of July 2018). 2018. Acesso em: 20/10/2019. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>>.

URSULA, H. et al. Blood parasites in reptiles imported to Germany. **Parasitology Research**, v.113, p.4587–4599, 2014.

VILLALBA-ALEMÁN, E. et al. Haematological alterations in non-human hosts infected with *Trypanosoma cruzi*: a systematic review. **Parasitology**, v.2, p.1-19, 2018.

VIOLA, L.B. et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. **Parasitology**, v.135, p.595–605, 2008.

VIOLA, L.B. et al. Phylogenetic Analyses Based on Small Subunit rRNA and Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Genes and Ultrastructural Characterization of Two Snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n.6, p. 594–602, 2009a.

VIOLA, L. B. et al. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, v. 136, p. 55–65, 2009b.

VOTÝPKA, J. et al. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. PART 3, p. 745–754, mar. 2012.

VOTÝPKA, J. et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015.

WEISER, G. Tecnologia Laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

YANG, F. et al. Regulation of Reticuloendothelial Iron Transporter MTP1 (Slc11a3) by Inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.42, p.39786–39791, 2002.

YIMMING, B. et al. Molecular identification of *Cryptosporidium* species from pet snakes in Thailand. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n.4, p.423-429, 2016.

YOKOYAMAA, N. et al. Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v.207, p.335–341, 2015.

YOUNG, H.S. et al. Introduced Species, Disease Ecology, and Biodiversity– Disease Relationships. **Trends in Ecology & Evolution**, v.32, n.1, p.41-54, 2017.

ZELEDON, R.; ROSABAL, R. *Trypanosoma leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.63, n.2, 1969.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1: AUTORIZAÇÃO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63053-3	Data da Emissão: 08/11/2019 18:29:17	Data da Revalidação*: 01/09/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: GUSTAVO RODAMILANS DE MACEDO	CPF: 011.928.475-80
Título do Projeto: DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOS E DE BIOQUÍMICA SÉRICA DE SERPENTES E ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR INFECÇÃO COM Hepatozoon sp.	
Nome da Instituição: Universidade Federal da Bahia	CNPJ: 15.180.714/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta das amostras de animais de domiciliados legalizados ou de plantel de pesquisa	10/2018	06/2022

Observações e ressalvas

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

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Zoológico da Cidade	Aracaju-SE	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Feira de Santana	Feira de Santana-BA	Caatinga	Não	Fora de UC Federal
3	Salvador	Salvador-BA	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

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

Código de autenticação: 0630530320191108

Página 1/3

8.2 ANEXO 2: AUTORIZAÇÃO CEUA

Universidade Federal da Bahia
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comitê de Ética no Uso de Animais

Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA

Fone: (071) 3283-6704/6708/ - Fax: 3283-6718

E-mail: escmev@ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Determinação de valores de referência hematológicos e de bioquímica sérica de Jiboia (Boa constrictor) e alterações induzidas por infecção com hepatozoon sp.**”, registrada com o nº **94/2018**, sob a responsabilidade do (a) **Prof. Ricardo Wagner Dias Portela**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 01.11.2018.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2019 à 01/01/2020
Nº da solicitação ou autorização SISBIO	63053
Atividade(s)	Captura: Contenção física manual, com utilização prévia de gancho específico para manejo de serpentes. Coleta de espécimes Coleta de material biológico: Sangue - Método - Venopunção do plexo venoso paravertebral. Saliva - Método - Swab da cavidade oral. Marcação Outras
Espécies/Grupos taxonômicos	<i>Boídeos em geral, com foco em Boa constrictor (Jiboia), podendo ser coletados amostras do gênero Eunectes (Sucuri), Epicrates (Jiboia Arco-Iris, Jiboia Vermelha) e do gênero Corallus (Jiboia Verde).</i>
Nº de animais	50
Sexo	Ambos

Origem	1 - Plantel do Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpelogia (LAPH) da UEFS 2 – Animais do Núcleo Regional de Ofidiologia e Animais Peçonhentos da Bahia – NOAP/UFBA 3 – Animais do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas – Salvador/BA 4 – Animais em reabilitação no CETAS/ABAMA de Salvador/BA 5 – Animais resgatados pela Polícia Ambiental de Salvador e RM e encaminhados ao AASE 6 – Animais criados legalmente como Pets.
Local (is) de realização das atividades	As atividades serão realizadas nos respectivos locais de origem dos animais.

Salvador, 01/11/2018.



Prof. Claudio de Oliveira Romão
Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

8.3 ANEXO 3: Registro SisGen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A789EC8

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A789EC8**
 Usuário: **UFBA**
 CPF/CNPJ: **15.180.714/0001-04**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Boa constrictor

Título da Atividade: **Boa constrictor: patógenos associados pe padrões de hematologia e bioquímica clínica**

Equipe

Ricardo Wagner Dias Portela UFBA
Gustavo Rodamilans de Macedo UFBA

Parceiras Nacionais

14.045.546/0001-73 / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Parceiras no Exterior

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos G
University of Helsinki

Data do Cadastro: **07/08/2018 20:34:02**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:34 de 22/01/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**