



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**Infecção por *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor*  
Linnaeus, 1758: Bioquímica clínica, hematologia,  
diagnóstico molecular e estudos filogenéticos**

**GUSTAVO RODAMILANS DE MACÊDO**

Salvador - BA  
2021

**GUSTAVO RODAMILANS DE MACÊDO**

**Infecção por *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor*  
Linnaeus, 1758: Bioquímica clínica, hematologia,  
diagnóstico molecular e estudos filogenéticos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Salvador - BA  
2021

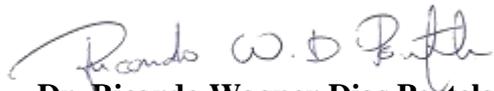
**Infecção por Hepatozoon spp. em Boa constrictor Linnaeus, 1758: Bioquímica clínica, hematologia, diagnóstico molecular e estudos filogenéticos**

**GUSTAVO RODAMILANS DE MACÊDO**

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos**

**Salvador, 18 de junho de 2021**

**Comissão examinadora:**



**Dr. Ricardo Wagner Dias Portela**  
(UFBA)  
(Presidente)

**Dr. Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo**  
(UFV)

**Dra. Valéria Castilho Onofrio**  
(Instituto Butantan)

**Dr. Lúcio André Viana Dias**  
(UNIFAP)

**Dr. Aristeu Vieira da Silva**  
(UEFS)



**Luís Fernando Pita Gondim**  
Coordenador PPGCAT  
EMEVZ / UFBA

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**GUSTAVO RODAMILANS DE MACÊDO** – Doutorando em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia, com projeto de doutorado sobre diagnóstico de hemoparasitos e patologia clínica em animais silvestres, sob a orientação do Prof. Ricardo Wagner Dias Portela. Mestre em Ciência Animal nos Trópicos pela Universidade Federal da Bahia, com dissertação sobre contaminantes químicos e patologias associadas em tartarugas marinhas (2011). Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia (2007). Realizou intercâmbio durante a graduação (2004-2005) na Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. No passado mais recente, fez parte da equipe técnica do Projeto Tamar (onde atualmente é colaborador), atuando com pesquisa, manejo e clínica de animais silvestres, e educação ambiental. Realiza trabalhos de consultorias, resgates e monitoramento de fauna silvestre, atuando com clínica veterinária, manejo sanitário, manejo nutricional e educação ambiental.

Dedico “*in memoriam*” esta tese à minha querida mãe Ângela Maria Rodamilans Macêdo, que sempre foi minha maior incentivadora.

Saudades!!

## AGRADECIMENTOS

Em tempos de pandemia, agradecemos por termos saúde e por termos forças para nos indignar e não nos acomodar contra o negacionismo científico. Foram muitos questionamentos que auxiliaram o entendimento do real aprendizado. Mais que isso, é ver a importância de cada pessoa nos processos e passos dados, sejam eles para frente ou para trás.

Ao professor Ricardo Portela, serei eternamente grato por todo apoio e incentivo para a produção desta tese. Estar em um grupo de pesquisa tão harmônico e produtivo faz com que as dificuldades sejam superadas de forma mais leve. O crescimento acadêmico e pessoal de todos do grupo é notório, e comigo não tem sido diferente! Professor, para ti, minha eterna gratidão!

Agradeço à professora Dra. Rejane Lira, por ter nos recebido tão bem no NOAP e estar sempre disponível para colaborar.

Agradeço à professora Dra. Ilka Biondi por ter nos recebido e acolhido em seu laboratório na UEFS, nos dando as condições necessárias para o bom desenvolvimento deste trabalho. Sem dúvidas muitos trabalhos juntos ainda virão.

Agradeço ao Professor Roberto Meyer pela oportunidade de trabalhar no LABIMUNO e por todo o apoio nesse período.

Agradeço em especial aos colegas Maísa, Marcos, Anderson, Clara e Júlia pela ajuda fundamental em todo o processo do projeto.

Um agradecimento especial ao amigo Prof. Jorge, que em um momento crucial, estendeu o braço para que eu me apoiasse. ETERNAMENTE GRATO!

Aos outros colegas do nosso grupo de pesquisa, vibro com as conquistas de cada um e torço muito por todos.

Agradeço aos professores Dra. Maria Consuelo Caribé Ayres e Dr. Luis Fernando Pita Gondim, por toda disponibilidade do uso dos laboratórios no Hospmev.

Agradeço muito as minhas amigas e técnicas do HOSPMEV Ludmilla Moroz e Waléria Borges, que sempre muito solícitas, me ajudaram nos laboratórios deste hospital.

Agradeço ao meu amigo Paulo Bahiano, pelas conversas e ajudas a qualquer hora.

Agradeço a minha nova família que se formou neste ínterim do doutoramento, me mostrando novas responsabilidades, novas experiências e novos amores até então nunca deliciados.

Agradeço a meu pai Cleber e irmãos Rafael e Leo por todo apoio nesta caminhada.

“Andá com fé eu vou  
Que a fé não costuma faiá...”  
(Gilberto Gil)

## RESUMO

RODAMILANS, Gustavo M. **Infecção por *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor* Linnaeus, 1758: Bioquímica clínica, hematologia, diagnóstico molecular e estudos filogenéticos.** 2021. **134p.** Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

O gênero *Hepatozoon* compreende hemoparasitos protozoários que infectam anfíbios, répteis, aves e mamíferos, sendo o principal parasito intraeritrocitário que infecta serpentes, com descrição de mais de 130 espécies. A forma gamonte deste parasito pode provocar alterações na morfologia de hemácias, bem como levar a quadros de anemia, perda de peso, diminuição nas taxas reprodutivas e de crescimento. A partir deste cenário, objetivou-se com esta pesquisa avaliar, através de métodos de diagnóstico parasitológicos diretos e moleculares, bem como de hematologia e bioquímica clínica, a infecção por *Hepatozoon* sp. em serpentes *Boa constrictor* de vida livre oriundas de fragmentos periurbanos de Mata Atlântica no Nordeste brasileiro. Foram realizados testes de diagnóstico molecular (PCR) utilizando dois diferentes marcadores em 52 *Boa constrictor* de vida livre, sendo que esfregaços sanguíneos desses animais também foram analisados microscopicamente. Foram sequenciados 40 amplicons oriundos de dois PCRs do gene SSU RNA ribossomal, com objetivo de avaliar a espécie de *Hepatozoon* envolvida. Foi observada frequência de infecção duas vezes maior pelos ensaios moleculares do que na análise parasitológica direta. O estudo filogenético sugeriu que duas amostras seriam *Hepatozoon musa*; duas amostras se posicionaram em um mesmo subclado que *Hepatozoon ameiva*, assim como foi observada a formação de um subclado exclusivo incluindo cinco amostras, o que sugere uma possível nova espécie de *Hepatozoon*. Na microscopia, foram observadas alterações morfológicas nas hemácias, bem como parasitemia média de 0,67%. A partir destes resultados, os animais foram divididos em dois grupos, infectados e não infectados, e análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para os parâmetros de hemograma analisados. No entanto foi observada associação negativa entre a concentração sérica de creatina quinase e o nível de parasitemia. Foram sugeridos valores de referência hematológicas e de bioquímica sérica para *Boa constrictor* de vida livre localizadas no Nordeste brasileiro.

**Palavras-chave:** Boidae; Hematologia; Hemoparasitos; Patologia Clínica

## ABSTRACT

RODAMILANS, Gustavo M. **Infection with *Hepatozoon* spp. in *Boa constrictor* Linnaeus, 1758: Clinical biochemistry, hematology, molecular diagnosis and phylogenetic studies.** 2021. **134p.** Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

The genus *Hepatozoon* comprises protozoan hemoparasites that infect amphibians, reptiles, birds and mammals, being the main intraerythrocytic parasite that infects snakes, with descriptions of more than 130 species. The gamont form of this parasite can cause changes in the morphology of red blood cells, as well as lead to anemia, weight loss, and reduction in reproductive and growth rates. From this scenario, the objective of this research was to evaluate, through direct parasitological and molecular diagnostic methods, as well as hematology and clinical biochemistry assays, the infection by *Hepatozoon* spp. in free-living *Boa constrictor* snakes from peri urban Atlantic Forest fragments in Northeastern Brazil. Molecular diagnostic tests (PCR) were performed using two different markers in 52 free-living *Boa constrictor*, and blood smears from these animals were analyzed microscopically. Forty amplicons from two ribosomal SSU RNA gene PCRs were sequenced in order to evaluate the *Hepatozoon* species involved. The frequency of infection was twice as high in molecular assays as in the direct parasitological analysis. The phylogenetic study suggested that two samples would be *Hepatozoon musa*; two samples were positioned in the same subclade as *Hepatozoon ameiva*, as well as the formation of an exclusive subclade including 05 samples was observed, suggesting a possible new species of *Hepatozoon*. On microscopy, morphological changes were observed in the red blood cells, as well as a mean parasitemia of 0.67%. From these results, the animals were divided into two groups, infected and uninfected, and hematological and biochemical analyzes were performed. There was no statistically significant difference between the groups for the analyzed hemogram parameters. However, a negative association was observed between the serum creatinine kinase concentration and the level of parasitemia. Hematological and serum biochemical reference values were suggested for free-living *Boa constrictor* from Northeastern Brazil.

**Keywords:** Boidae; Hematology; Hemoparasites; Clinical Pathology.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA GERAL</b>	
<b>Infecção por <i>Hepatozoon spp.</i> em <i>Boa constrictor</i> Linnaeus, 1758: Bioquímica clínica, hematologia, diagnóstico molecular e estudos filogenéticos</b>	
Figura 01- Ilustração da interatividade e interdependência das atividades relacionadas a saúde humana, saúde animal e saúde ambiental.....	17
Figura 02- Exemplar de <i>Boa constrictor</i> encontrado em área urbana da cidade de Salvador/Bahia .....	20
Figura 03- Serpente <i>Boa constrictor</i> de vida livre predando lagarto <i>Iguana iguana</i> em Praia do Forte, município de Mata de São João, Bahia. (A) A serpente realizando constrição no iguana; (B) A serpente começando a fazer a ingestão do iguana.....	21
Figura 04- Amostras de sangue de <i>Bothrops jararaca</i> coletadas pela veia coccígea caudal. (A) sangue sem contaminação de linfa; (B) sangue contaminado por linfa.....	23
Figura 05- Coleta de sangue em <i>Boa constrictor</i> de vida livre, pela via do plexo venoso vertebral.....	23
Figura 06- Eritrócitos de <i>Boa constrictor</i> em esfregaço sanguíneo corado por Panótico rápido.....	25
Figura 07- Leucócitos de serpentes <i>Boa constrictor</i> em esfregaço sanguíneo corado com Panótico rápido.....	27
Figura 08- Gamontes de <i>Hepatozoon spp.</i> em <i>Boa constrictor</i> .....	33
Figura 09- Esfregaços sanguíneos de <i>Boa constrictor</i> infectadas por gamontes de <i>Hepatozoon spp.</i> .....	33

## CAPÍTULO I

### **Diagnóstico da infecção por *Hepatozoon* spp. em serpentes *Boa constrictor* oriundas de fragmentos periurbanos de mata atlântica no nordeste brasileiro (Artigo a ser submetido a *International Journal For Parasitology: Parasites And Wildlife*).**

Figura 01-	Esquemática dos parâmetros morfológicos de eritrócitos e de gamontes de <i>Hepatozoon</i> spp., como determinados nesse estudo .....	60
Figura 02-	Influência do parasito na morfologia dos eritrócitos parasitados em serpentes <i>Boa constrictor</i> de vida livre.....	65
Figura 03-	Árvore filogenética para as sequências consenso geradas pelo sequenciamento do iniciador HEP de amostras de <i>Boa constrictor</i> de vida livre.....	71
Figura 04-	Árvore filogenética para as sequências consenso geradas pelo sequenciamento do iniciador HEMO de amostras de <i>Boa constrictor</i> de vida livre.....	71
Figura 05-	Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com sequências dos iniciadores HEP e HEMO e sequências do banco de dados do NCBI.	72

## CAPÍTULO II

### **Infection by *Hepatozoon* spp. in free-living *Boa constrictor*: Clinical biochemistry and hematological parameters (Artigo a ser submetido ao periódico *Frontiers in Veterinary Science*).**

Figura 01-	Erythrogram values in negative and positive animals for the infection by <i>Hepatozoon</i> spp. ....	108
Figura 02-	Heterophil blood counts in free-living <i>Boa constrictor</i> in different life stages.....	111
Figura 03-	Correlation between condition factor and erythrocyte blood counts in 52 free-living <i>Boa constrictor</i> from the Brazilian northeast .....	112
Figura 04-	Correlation between parasitemia and serum creatinine kinase concentration levels in free-living 47 free-living <i>Boa constrictor</i> .....	114
Figura 05-	Correlation between 52 free-living <i>Boa constrictor</i> condition factors and their serum iron concentration levels.....	114

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Diagnóstico da infecção por <i>Hepatozoon</i> spp. em serpentes <i>Boa constrictor</i> oriundas de fragmentos periurbanos de mata atlântica no nordeste brasileiro</b>	
Tabela 01- Número de amostras de <i>Boa constrictor</i> de vida livre que amplificaram aos iniciadores HEP e HEMO.....	64
Tabela 02- Morfometria eritrocitária em serpentes <i>Boa constrictor</i> de vida livre.....	66
Tabela 03- Morfometria de <i>Hepatozoon</i> spp. em serpentes <i>Boa constrictor</i> de vida livre.....	67
Tabela 04- Influência de <i>Hepatozoon</i> spp. na morfologia dos eritrócitos parasitados em serpentes <i>Boa constrictor</i> de vida livre.....	68
 <b>Capítulo 2</b>	
<b>Avaliação hematológica e bioquímica de serpentes <i>Boa constrictor</i> de vida livre infectadas por <i>Hepatozoon</i> spp.</b>	
Tabela 01- Biometric and condition factor analysis of free-living <i>Boa constrictor</i> . ....	105
Tabela 02- Absolute and relative frequencies of the free-living <i>Boa constrictor</i> included in this study, according to sex and life stage	105
Tabela 03- Hematological values in free-living <i>Boa constrictor</i> from the Brazilian northeast region.....	110
Tabela 04- Concentrations of serum components in <i>Hepatozoon</i> spp. infected and not infected <i>Boa constrictor</i> .....	113

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AST</b>	Aspartato Aminotransferase
<b>CHGM</b>	Concentração de Hemoglobina Globular Média
<b>CK</b>	Creatinoquinase
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>IBAMA</b>	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
<b>INEMA</b>	Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos
<b>LABIMUNO</b>	Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>P</b>	Parcimônia
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação de Cadeia de Polimerase
<b>PPT</b>	Proteínas Plasmáticas Totais
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>SASE</b>	Setor de Animais Silvestres e Exóticos
<b>SISBio</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>sp</b>	Espécie
<b>spp</b>	Espécies
<b>TBE</b>	Tris-Borato EDTA
<b>VG</b>	Volume Globular
<b>VGM</b>	Volume Globular Médio

## SUMÁRIO

**Infecção por *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor* Linnaeus, 1758: Bioquímica clínica, hematologia, diagnóstico molecular e estudos filogenéticos.**

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 SAÚDE ÚNICA .....	17
2.2 SERPENTES <i>Boa constrictor</i> (Linnaeus, 1758).....	19
2.3 HEMATOLOGIA EM SERPENTES .....	21
2.4 BIOQUÍMICA CLÍNICA EM SERPENTES .....	28
2.3 HAEMOGREGARINIDAE.....	30
2.4 <i>HEPATOZOON</i> SPP. EM SERPENTES .....	31
2.5 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>HEPATOZOON</i> .....	34
<b>3 REFERENCIAS GERAL .....</b>	38
<b>4 OBJETIVOS</b>	
4.1 OBJETIVO GERAL.....	52
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>5 HIPÓTESES.....</b>	53
<b>6 CAPÍTULO 1   DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>Hepatozoon</i> spp. EM SERPENTES <i>Boa constrictor</i> ORIUNDAS DE FRAGMENTOS PERIURBANOS DE MATA ATLÂNTICA NO NORDESTE BRASILEIRO (Artigo a ser submetido ao periódico International Journal For Parasitology: Parasites And Wildlife)</b>	
6.1 RESUMO.....	55
6.2 ABSTRACT.....	56
6.3 INTRODUÇÃO.....	57
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
<b>6.4.1 Animais estudados e Aspectos éticos .....</b>	58
<b>6.4.2 Análises Microscópicas.....</b>	59
<b>6.4.3 Diagnóstico Molecular .....</b>	61
<b>6.4.3.1 Sequenciamento e Análise Filogenética .....</b>	62
<b>6.4.4 Análises Estatísticas .....</b>	63
6.5 RESULTADOS.....	64
<b>6.5.1 Diagnóstico parasitológico direto e molecular .....</b>	64
<b>6.5.2 Morfometria .....</b>	64
<b>6.5.3 Sequenciamento .....</b>	69
<b>6.5.4 Análises filogenéticas .....</b>	69
6.6 DISCUSSÃO.....	73

6.7 CONCLUSÃO .....	78
6.8 AGRADECIMENTOS .....	78
6.9 REFERÊNCIAS .....	80
7.0 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	87
<b>7 CAPÍTULO 2</b> INFECTION BY <i>HEPATOZOON</i> spp. IN FREE-LIVING <i>Boa constrictor</i> : CLINICAL BIOCHEMISTRY AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS (Artigo a ser submetido ao periódico <i>Frontiers in Veterinary Science</i> )	
7.1 ABSTRACT.....	98
7.3 INTRODUCTION.....	99
7.4 MATERIALS AND METHODS .....	100
7.4.1 ANIMALS AND ETHICAL ASPECTS .....	100
7.4.2 DIAGNOSIS OF THE INFECTION BY <i>HEPATOZOON</i> SPP.....	101
7.4.3 HEMOGRAMS .....	103
7.4.4 CLINICAL BIOCHEMISTRY ASSAYS .....	104
7.4.5 STATISTICAL ANALYSIS .....	104
7.5 RESULTS.....	105
7.5.1 CLINICAL EXAM .....	105
7.5.2 DIAGNOSIS OF THE INFECTION BY <i>HEPATOZOON</i> SPP.. .....	106
7.5.3 HEMATOLOGY .....	106
7.5.4 CLINICAL BIOCHEMISTRY .....	107
7.6 DISCUSSION .....	115
7.7 CONCLUSIONS .....	119
7.8 ACKNOWLEDGEMENTS .....	120
7.9 REFERENCES.....	120
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>127</b>
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>128</b>
9.1 ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA TROPICA	128
9.2 AUTORIZAÇÃO SISBIO	132
9.3 AUTORIZAÇÃO CEUA	133
9.4 REGISTRO SISGEN	134

## 1 Introdução Geral

Serpentes são animais encontrados globalmente, com massiva redução do número de espécimes em populações de vida livre, devido principalmente à fragmentação de habitats e o crescimento urbano desordenado (HIERINK et al., 2020). A retirada destes animais da natureza ocorre devido a vários fatores, tais como utilização como fonte de alimento e em medicina tradicional (ALVES et al., 2009; KLEMENS e THORBJARNARSON, 1995; SOMAWEERA e SOMAWEERA, 2010), uso comercial da pele (KASTERINE et al., 2012; LUISELLI et al., 2012) e como animais de companhia (ALVES et al., 2019; AULIYA et al., 2016; JENSEN et al., 2019).

Serpentes *Boa constrictor* são animais de ampla distribuição na América do Sul, sendo muito solicitadas pelo tráfico de animais silvestres devido às suas características comportamentais que facilitam a sua manutenção como animais de companhia, e é a espécie de serpente nativa com maior número de indivíduos mantidos como animal de estimação no Brasil (ALVES et al., 2019). São animais que vem sofrendo com a perda do seu habitat, mas que tendem a se adaptar a áreas urbanas e peri-urbanas, desde que encontrem presas nestes lugares (SILVEIRA e MARTINS-NETO, 2007).

Há uma crescente demanda de conhecimentos clínicos para as diferentes espécies de animais selvagens, tanto para a clínica de animais criados como *pets*, mas principalmente para projetos de conservação em centros de reabilitação e pesquisa responsáveis pelos cuidados com animais de vida livre resgatados do tráfico de animais ou que sofreram algum outro tipo de ação antropogênica. É importante ressaltar que o comércio de serpentes tende a levar à introdução de espécies exóticas invasoras, patógenos e vetores de doenças, o que pode ameaçar a vida selvagem, animais domésticos e até mesmo a saúde pública (KARESH et al., 2005; LOCKWOOD et al., 2019; SMITH et al., 2017).

Hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* são relatados infectando eritrócitos em aves, anfíbios e répteis, e em leucócitos em mamíferos (SMITH, 1996). Serpentes infectadas, na maioria das vezes não apresentam sinais clínicos, embora alguns relatos tenham observado perda do *fitness*, anemia, diminuição do crescimento, e mortalidade em filhotes (BROWN et al., 2006; MADSEN et al., 2005). Em mamíferos domésticos, tais como cães e gatos, são relatadas complicações clínicas causando mortalidade

devido à infecção por *Hepatozoon* spp. advindos de animais silvestres (BANETH et al., 2003; KEGLER et al., 2018).

Os métodos de diagnósticos para *Hepatozoon* normalmente se baseiam na observação do gamonte em esfregaços sanguíneos ou por técnicas de biologia molecular (MAIA et al., 2014). Estes últimos, normalmente são mais sensíveis e eficazes por conseguirem detectar o parasito mesmo em infecções crônicas com baixas parasitemias (CALIL et al., 2019; MAIA et al., 2014)

Desta forma, e com a finalidade de identificar ao menor táxon possível, bem como pesquisar a frequência de *Hepatozoon* spp. e suas possíveis implicações na saúde de serpentes *Boa constrictor* de vida livre, neste trabalho foram realizados ensaios de hematologia e bioquímica clínica, diagnóstico parasitológico direto, molecular e estudos filogenéticos. Com estes resultados foi possível sugerir quais espécies de *Hepatozoon* spp. infectam *Boa constrictor*, bem como caracterizar os gamontes infectantes nos eritrócitos e suas ações na morfologia destas células. Concomitantemente, análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas, proporcionando alterações nestes parâmetros em animais infectados.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Saúde única

O termo “Saúde Única” foi desenvolvido para complementar a definição de “Medicina Única”, a qual compreendia somente a medicina humana e a medicina veterinária, sobretudo no que tange às zoonoses (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2018). No entanto, nos últimos anos, as principais doenças que ameaçam a saúde pública são doenças infecciosas causadas por patógenos emergentes ou re-emergentes que sofreram influência direta da saúde do ecossistema, se expandindo geograficamente, mudando de espécies hospedeiras, sofrendo alterações na patogênese, e com isso aumentando o impacto ou a gravidade da doença (DASZAK et al., 2004).

Levando em consideração o importante fator “ecossistema”, no ano de 2004 surgiu a definição de “Saúde Única” (*One Health*), ao ser observada a interdependência entre a saúde humana, saúde animal e a saúde do ecossistema, incluindo no componente medicina veterinária a fauna selvagem tanto por sua importância zoonótica, como pela importância da conservação das espécies (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2018). Desta forma, a Saúde Única baseia-se na importância do equilíbrio entre os componentes desta tríade (**Figura 01**) para manter a saúde global, porém com uma abordagem interdisciplinar e multissetorial da saúde.

**Figura 01: Ilustração da interatividade e interdependência das atividades relacionadas a saúde humana, saúde animal e saúde ambiental.**

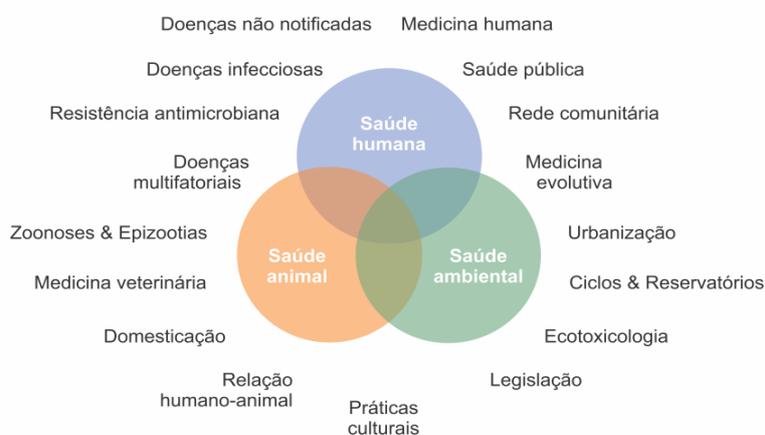


Figura adaptada de Destoumieux-Garzón et al., 2018.

O aumento da população humana, os crescimentos urbanos e industriais, com consequente aumento de poluentes, interferem diretamente na saúde do ecossistema, provocando mudanças climáticas, diminuição de áreas nativas e da biodiversidade, e em alguns casos extinção de espécies (DASZAK et al., 2001). Concomitantemente, nos últimos anos, as principais doenças que ameaçam a saúde pública são doenças infecciosas emergentes que normalmente se expandem geograficamente, mudando de uma espécie hospedeira para outra, aumentando o impacto ou gravidade da doença, sofrendo alterações na patogênese, ou causadas por patógenos não conhecidos anteriormente (DASZAK et al., 2004; FORSTER et al., 2020; LANFRANCHI et al., 2003). Segundo Taylor et al. (2001), cerca de 75% das doenças emergentes são zoonoses, ou seja, foram transmitidas do hospedeiro natural animal para os humanos.

A movimentação, a fragmentação e a perda do habitat, associadas à exploração excessiva de algumas espécies, podem provocar não somente o desenvolvimento de doenças infecciosas intraespecíficas, bem como favorecer o “*spill-over*” de agentes infecciosos para outras espécies (LANFRANCHI et al., 2003). Daszak et al. (2004) relatam que a aproximação entre humanos, animais domésticos e de companhia junto a animais selvagens predispõe o contato com novos patógenos, proporcionando o surgimento de doenças emergentes, e que estas doenças já causam prejuízos econômicos significativos, além da morte de muitos animais silvestres. Desta forma ressalta-se a importância de um plano de translocação para soltura de animais selvagens resgatados, onde conhecer os patógenos comuns ao local de soltura torna-se fundamental para evitar uma possível exposição e infecção do espécime a ser solto, bem como para não permitir que o animal em questão carregue patógenos estranhos à área de soltura (CUNNINGHAM, 1996).

No Brasil, outras formas de dispersão de patógenos ocorrem pelo tráfico de animais silvestres, pela compra ilegal de animais exóticos e pela venda de animais silvestres criados em criatórios legalizados. Com o aumento do interesse pela criação de animais selvagens como *pets*, alavancou-se o número de criatórios de animais selvagens em cativeiro, sejam de aves, mamíferos ou répteis, totalizando 196 criadouros legalizados que se dedicam a comercialização desses animais (IBAMA, 2019).

Com a contínua fragmentação de florestas, as serpentes figuram entre os répteis primariamente impactados devido às suas peculiaridades ecológicas e comportamentais, mas costumam se adaptar a áreas urbanas e periurbanas desde que encontrem presas nestes lugares (MACHADO, 2016). Bohm e colaboradores (2013) sugerem que 1/5 das

espécies de répteis estejam ameaçadas de extinção em escala global, sendo o crescimento acelerado da população humana e o adensamento urbano fatores ameaçadores à diversidade reptiliana devido à destruição e modificação do ambiente natural (DAWSON e HOSTETLER, 2008; MCKINNEY, 2002; MCKINNEY, 2006).

Serpentes da espécie *Boa constrictor* despertam uma grande atração humana, sendo comumente criadas como *pets* (ALVES, 2019). Considerando o interesse por estes animais, esta espécie é uma das mais traficadas no Brasil e conseqüentemente são das mais resgatadas e encaminhadas a centros de triagens, de pesquisa e de apoio a órgãos ambientais. Cuidados devem ser tomados ao manejar estes animais, pois é sabido que carregam diversos patógenos, sendo alguns de potencial zoonótico (MARTINS et al., 2017; RODAMILANS et al., 2020). Desta forma, o médico veterinário assume um papel de suma importância, junto a outros tão quanto importantes atores, no conceito de Saúde Única, sendo responsáveis por prevenir, diagnosticar, tratar e entender os ciclos epidemiológicos destas doenças emergentes, seus ciclos biológicos nos animais selvagens e domésticos, atuar na conservação das espécies e na mitigação dos efeitos antropogênicos nos ecossistemas.

## **2.2 Serpentes *Boa constrictor* (Linnaeus 1758)**

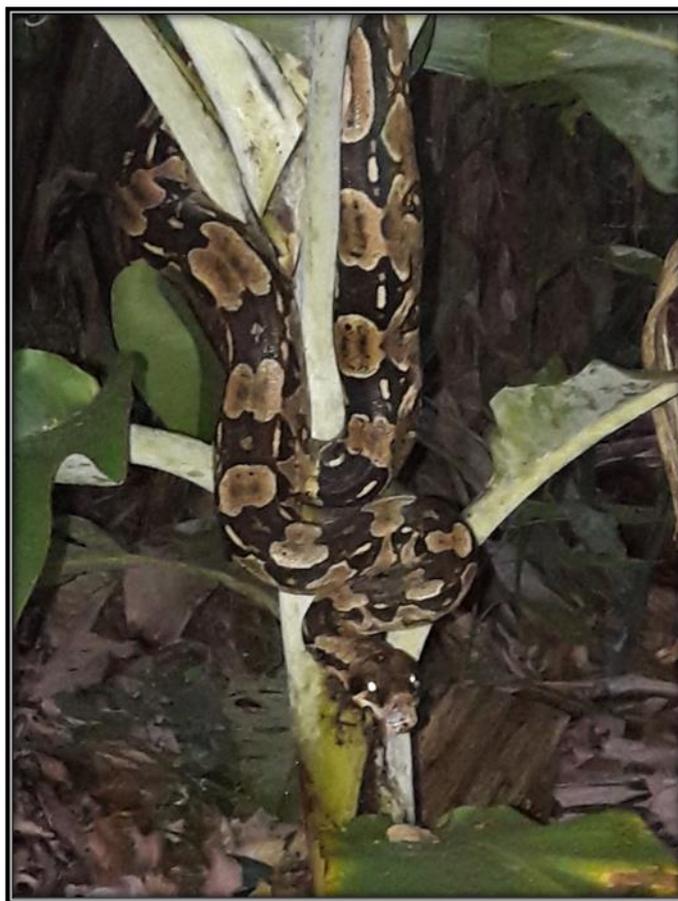
As serpentes fazem parte da Ordem Squamata, com cerca de 3.879 espécies conhecidas atualmente no mundo (UETZ, 2020). Descendem de um grupo de lagartos, que foram perdendo os membros locomotores durante o longo percurso da evolução biológica, sendo que algumas possuem vestígios externos dos membros posteriores sob a forma de esporões, e/ou vestígios internos da cintura pélvica (SOERENSEN, 1996). Segundo Nogueira e colaboradores (2019), o Brasil abriga 412 espécies identificadas, e dentre estas 143 são encontradas no estado da Bahia (COSTA e BÉRNILIS, 2018). São animais ectotérmicos, ou seja, a temperatura do ambiente influencia os aspectos fisiológicos destes animais, sendo que a preferência térmica dos animais pode variar de acordo com diversos fatores, tais como condição reprodutiva, processo de ecdise, idade, digestão e sexo, entre outros (BAUER e BAUER, 2014).

As serpentes da espécie *Boa constrictor* LINNAEUS, 1758 (**Figuras 02 e 03**) possuem ampla distribuição nas Américas, particularmente na América do Sul, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela. No Brasil, registra-se na maioria das ecorregiões, exceto Floresta da Araucária e Campos do Pampas, sendo abundantes em

fragmentos de vegetação em centros urbanos e periurbanos (Navega-Gonçalves & Porto, 2016; Nogueira et al., 2019), alimentando-se principalmente de pequenos mamíferos, lagartos, anfíbios e aves (Cabral et al., 2019; Pizzatto et al., 200). Segundo Pinto-Coelho et al. (2020), *Boa constrictor* está distribuída em oito das nove ecorregiões do estado da Bahia, Brasil, inclusive com registros em cidades com grande ocupação humana, como é o caso da cidade de Salvador, capital do estado.

Apesar de acidentes com mordedura por estas serpentes não representar importância médica, são negligenciadas como reservatórios de patógenos de potencial zoonótico, tais como fungos, vírus e bactérias (Mitchel, 2011).

**Figura 02: Exemplar de *Boa constrictor* encontrado em área periurbana da cidade de Salvador/Bahia.**



**Fonte: Rodamilans, 2021**

É uma das espécies mais resgatadas em áreas periurbanas, sendo então encaminhadas para centros de triagens e de pesquisa. Em cativeiro, as jiboias se adaptam bem a uma alimentação composta por roedores oriundos de biotérios, sendo esta também a forma de alimentação quando são criadas como animais de estimação (SCARTOZZONI e MOLINA, 2004).

**Figura 03: Serpente *Boa constrictor* de vida livre predando lagarto *Iguana iguana* em Praia do Forte, município de Mata de São João, Bahia. (A) A serpente realizando constrição no iguana; (B) A serpente começando a fazer a ingestão do iguana.**



Fonte: Rodamilans, 2021.

### 2.3 Hematologia de Serpentes

Na clínica de animais silvestres, os exames laboratoriais são indicados como ferramenta para diagnóstico e prevenção de doenças, para caracterização do estresse tanto em ambientes naturais quanto em cativeiro, e até mesmo para caracterização de biomarcadores de impactos ambientais (ALMOSNY, 2014). Embora estudos com animais silvestres sejam escassos, a demanda por valores de referências hematológicos e bioquímicos bem definidos vem estimulando pesquisas em diferentes espécies, tanto criadas em cativeiro quanto de vida livre (CAMPBELL, 2015). Segundo Campbell (2015), valores de referências bem definidos são aqueles que sejam representativos para uma população de espécie animal. No entanto, a escassez de estudos faz com que muitas

vezes os valores de referências utilizados sejam oriundos de animais de outras regiões e mesmo de outros países, não permitindo que sejam consideradas as particularidades de cada região e população (GOMES et al., 2011).

Durante a realização da colheita e conservação das amostras para a confecção do hemograma, devemos levar em consideração as particularidades anatômicas e fisiológicas de cada espécie (SARMIENTO et al., 2018). Répteis em geral possuem cerca de 5% a 8% do seu peso corpóreo composto por sangue circulante total, sendo seguro realizar a colheita de até 10% deste volume em animais saudáveis (SYKES e KLAPHAKE, 2015). Além das variáveis fisiológicas em animais homeotérmicos, como espécie, idade, sexo e nutrição, acrescenta-se a particularidade de os répteis serem animais ectotérmicos, ou seja, aspectos de sua fisiologia são influenciados por fatores climáticos no ambiente (CAMPBELL, 2015; NARDINI et al., 2013).

Os anticoagulantes de escolha são a heparina ou o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Embora a heparina seja largamente citada como o principal anticoagulante em répteis, estudos sugerem que o sangue coletado com EDTA produz esfregaços sanguíneos de melhor qualidade em algumas espécies (HANLEY et al., 2004; HARR et al., 2005; MURO et al., 2013). Alguns autores sugerem que o ideal, quando possível, seja preparar os esfregaços sanguíneos logo após a colheita (ALMOSNY, 2014; SYKES e KLAPHAKE, 2015).

Em serpentes em geral, as vias de coleta de sangue mais utilizadas são a intracardíaca e a veia coccígea caudal. No entanto, Sykes and Klaphake (2015) alertam que estas vias exigem cuidados para não induzir lesões e hemorragias cardíacas com consequente perfusão de sangue no saco pericárdico ou contaminação por linfa (**Figura 04**). Em serpentes maiores, como em *Boa constrictor*, a via de coleta pelo plexo venoso vertebral (**Figura 05**) mostrou-se uma via segura e eficaz (ZIPPEL et al., 2001).

**Figura 04:** Amostras de sangue de *Bothrops jararaca* coletadas pela veia coccígea caudal. (A) sangue sem contaminação de linfa; (B) sangue contaminado por linfa.



**Fonte:** Foto cedida por Paulo R. Bahiano, em Rodamilans, 2021.

**Figura 05:** Coleta de sangue em *Boa constrictor* pela via do plexo venoso vertebral.



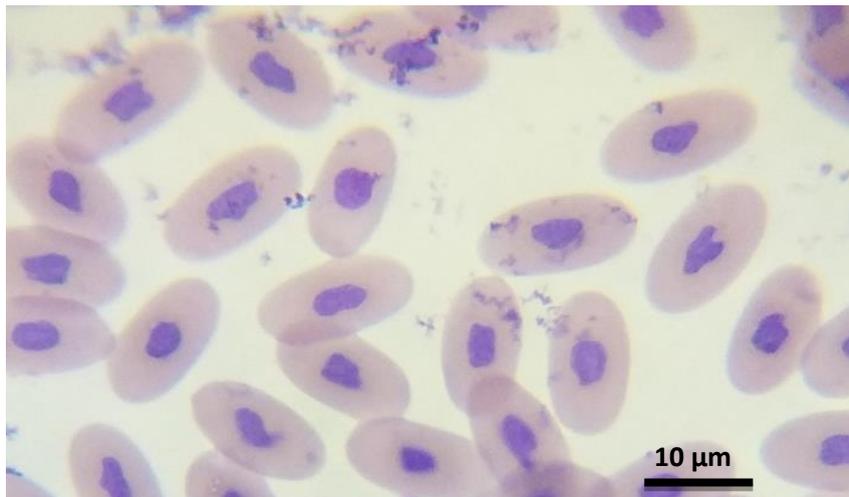
**Fonte:** Rodamilans, 2021.

O hemograma é composto pelo eritrograma e leucograma, sendo o principal exame de triagem por permitir detectar condições tais como anemia, doenças inflamatórias, parasitemias, distúrbios hematopoiéticos e alterações hemostáticas (CAMPBELL, 2015). O eritrograma e o leucograma são realizados em câmara de Neubauer com o aumento de 400x no microscópio de luz. Utiliza-se o retículo de hemácias para contagem das diferentes células, onde para as contagens de eritrócito, leucócito e trombócitos devem-se contar todos os 25 quadrados no retículo de eritrócito e multiplicar-se pelo fator 1000 (ALMOSNY, 2014). Em répteis, devido a seus eritrócitos nucleados, não é indicado o uso de contadores automáticos devido à impossibilidade do aparelho em diferenciar os eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Desta forma, Almosny (2014) recomenda alguns diluentes na proporção de 1:100, sendo os principais o Natt-Herrick e diluente de Gowers.

O eritrograma consiste na mensuração dos eritrócitos, analisados segundo os valores de volume globular (VG), concentração de hemoglobina (Hb), contagem total de eritrócitos, volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e análise morfológica das hemácias na lâmina de esfregaço (ALMOSNY, 2014). O volume globular, a concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos auxiliam tanto no diagnóstico da anemia quanto na avaliação da intensidade desta (THRALL, 2012; TVEDTEN, 2010). A hemoglobina dos répteis possui estrutura semelhante à dos mamíferos, porém com menor afinidade pelo oxigênio (MURRAY, 2006).

Os eritrócitos das serpentes possuem um formato oval, com a presença de um núcleo central, de cor variando do azul marinho ao roxo enegrecido, de mesmo formato quando corados por panótico rápido (**Figura 06**). Possuem um citoplasma abundante e de coloração basofílica. Assim como nos demais vertebrados, são as células mais abundantes do sangue. Podem ser normalmente encontradas em esfregaço sanguíneos hemácias binucleadas ou em processo de divisão (KINDLOVITS *et al.*, 2017a).

**Figura 06: Eritrócitos de *Boa constrictor* em esfregaço sanguíneo corado por Panótico rápido. Barras de escala: 10µm.**



**Fonte: Rodamilans, 2021.**

O valor de hematócrito é determinado pelo método padrão do microhematócrito com uso de centrífuga e seu resultado é dado em porcentagem. A cor do plasma está relacionada ao tipo de dieta do animal, sendo que em serpentes pode ser observada uma coloração verde-amarelada (CAMPBELL, 1998). O valor do hematócrito normal na maioria dos répteis varia entre 15 e 55% (FRYE, 1991), sendo que valores abaixo de 15% sugerem anemia, e para valores menores que 10% deve-se considerar a realização de transfusão sanguínea (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011).

A contagem total de leucócitos deve ser interpretada em associação com o seu diferencial (WEISER, 2012). Os répteis possuem seis tipos de leucócitos visíveis ao esfregaço sanguíneo, os quais são classificados como heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e azurófilos (KELLER et al., 2012; KELLY et al., 2015). Os azurófilos e monócitos podem ser contados separadamente ou juntos, porém em geral são considerados variações de monócitos, possuindo a mesma função (CHAFFIN et al., 2008; SYKES e KLAPHAKE, 2015).

Os heterófilos de serpentes têm sido descritos como células grandes arredondadas, apresentando núcleo excêntrico e de formato oval a arredondado, sendo o citoplasma abundante em grânulos pleomórficos e de coloração rosa (ALMOSNY, 2014; OZZETTI, 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) (**Figura 07A**).

Os eosinófilos são raros em serpentes, não sendo incomum estarem ausentes na contagem diferencial de leucócitos. Quando encontrados, apresentam grânulos eosinofílicos grandes, geralmente redondos (ALMOSNY, 2014) (**Figura 07B**).

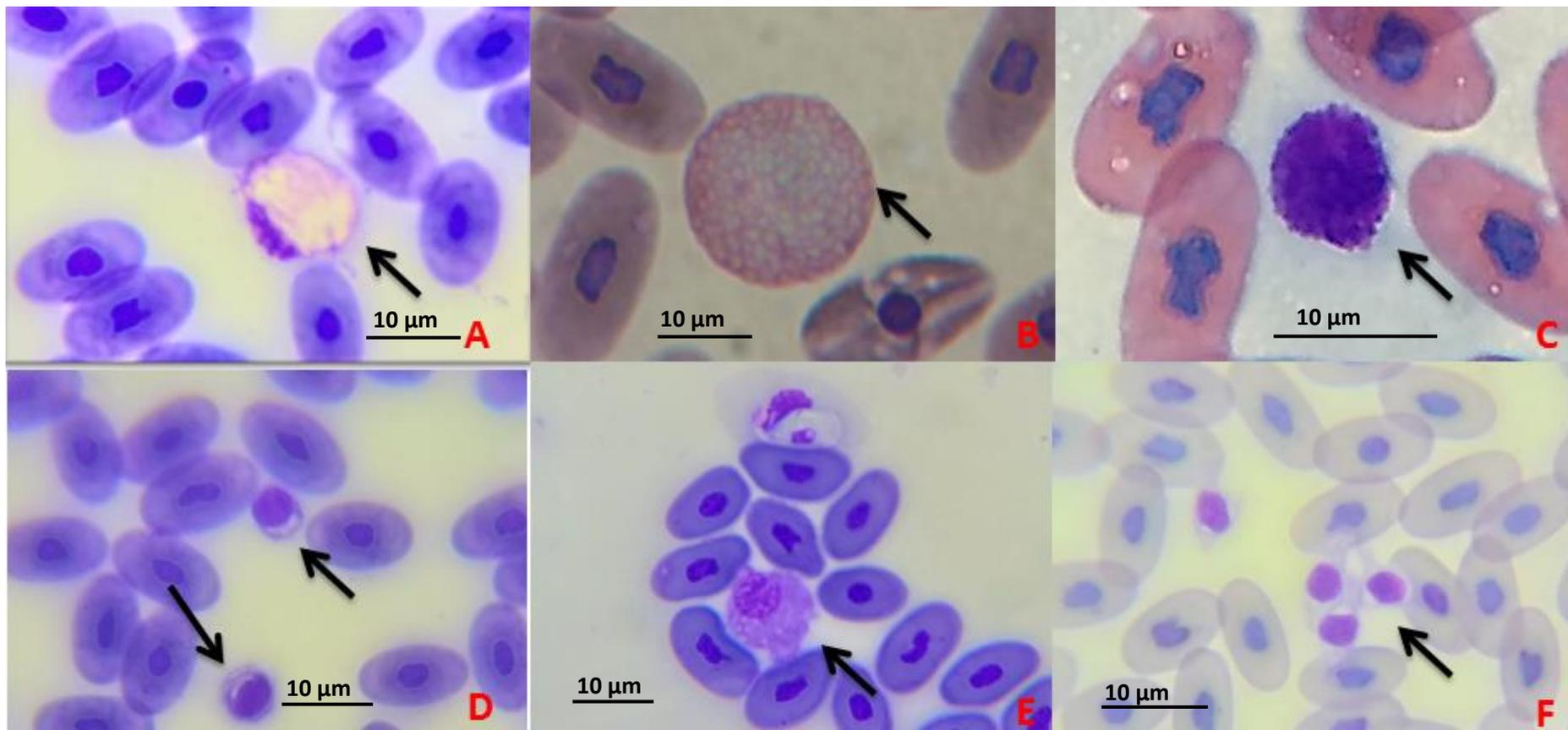
Os basófilos são descritos como células de núcleo periférico, apresentando grande quantidade de grânulos difusos em seu citoplasma, os quais se apresentam arredondados (**Figura 07C**). A presença dos grânulos por muitas vezes dificulta a visualização do núcleo (CAMPBELL, 2015).

Os linfócitos são a categoria de leucócitos mais abundante no sangue das serpentes (**Figura 07D**), sendo que em períodos de ecdise seus valores são encontrados aumentados. Em serpentes, os linfócitos podem se apresentar em diversos tamanhos, com formato predominantemente arredondado, assemelhando-se fortemente aos linfócitos de mamíferos. Seu citoplasma é escasso e cora-se em tons de cinza a basofílicos (ALMOSNY, 2014; KINDLOVITS et al., 2017b).

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 (**Figura 07E**). 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).

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 ameboide a célula (**Figura 07F**). Essas células em répteis participam do processo de fagocitose de partículas estranhas e coagulação sanguínea (ALMOSNY, 2014; KINDLOVITS et al., 2017b).

**Figura 07: Leucócitos de serpentes *Boa constrictor* em esfregaço sanguíneo corado com Panótico rápido. A) Heterófilo; B) Eosinófilo; C) Basófilo; D) Linfócitos; E) Azurófilos; F) Trombócitos. Escala de Barra: 10µm**



Fonte: Rodamilans, 2021

## **2.4 Bioquímica Clínica em Serpentes**

As análises bioquímicas e enzimáticas do sangue, juntamente ao histórico clínico do paciente, do exame físico completo e de outros exames complementares, são importantes instrumentos para o diagnóstico das diversas enfermidades que podem acometer as serpentes. Relatamos a seguir a importância de alguns componentes bioquímicos séricos de serpentes.

### **2.4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)**

A enzima aspartato aminotransferase está presente em todos os tecidos do organismo, especialmente na musculatura esquelética e no fígado, tendo seus níveis aumentados na presença de lesões hepáticas ou de células musculares estriadas e cardíacas. Doenças generalizadas, tais como septicemias ou toxemias, bem como processos infecciosos, podem lesar estes tecidos e provocar elevações plasmáticas desta transaminase devido a necrose celular generalizada (ALMONSY, 2014).

### **2.4.2 Creatina quinase (CK)**

A enzima creatina quinase é encontrada no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e músculos lisos (CAMPBELL, 2015). É uma enzima bastante específica para a avaliação de danos musculares em répteis e outros animais, sendo bastante comum haver aumento dos níveis de CK após lesão muscular provocada por injeções intramusculares e infecções sistêmicas que afetam músculos esqueléticos e cardíacos (ALMONSY, 2014). Animais que resistem à contenção para coleta de sangue tendem a apresentar elevações nos níveis de CK, acompanhadas de elevação de lactato desidrogenase (KANEKO, 1997).

### **2.4.3 Glicose**

A concentração normal de glicose no sangue de répteis varia de acordo com espécie, estado nutricional e condições ambientais, sendo que há variações sazonais normais. Os valores da concentração sérica de glicose em répteis variam entre 60 a 100 mg/dL (CAMPBELL, 2015). Casos de hipoglicemia e hiperglicemias podem ser observados nas serpentes por desnutrição, dietas altamente proteicas, hepatopatia severa, septicemia, ou por causas iatrogênicas, tais como administração excessiva de glicose ou de glicocorticoides (ALMONSY, 2014).

#### **2.4.4 Creatina**

Os valores de creatina em répteis são fisiologicamente baixos (< 1mg/dL), sendo que podem se elevar por desidratação severa e doença renal (ALMONSY, 2014). No entanto, Campbell (2015) não considera este parâmetro como um bom teste diagnóstico para doenças renais.

#### **2.4.5 Ácido Úrico**

O ácido úrico é o produto primário final do catabolismo de proteínas e purinas em répteis terrestres, representando 80 a 90% no nitrogênio total excretado pelos rins (CAMPBELL, 2015). Desidratação, dietas altamente proteicas e lesão renal grave são as principais causas de hiperacidemia (FRYE, 1991), sendo que em casos graves há deposição de microcristais em rins, fígado, saco pericárdico e articulações (MESSONNIER, 1996). Valores superiores a 15 mg/dL caracterizam hiperacidemia, sendo este dado normalmente associado a doenças renais de etiologia bacteriana (ALMONSY, 2014). Répteis carnívoros podem alcançar picos de concentração de ácido úrico de até 2 vezes maior no período pós-prandial (CAMPBELL, 2015).

#### **2.4.6 Ureia**

Os répteis terrestres são animais uricotélicos e sua concentração normal de ureia é muito reduzida, não ultrapassando 10 mg/dL (ALMONSY, 2014). A elevação dos valores normais pode ser sugestiva de doenças renais ou pré-renais, contudo pode ser observada fisiologicamente após ingestão de grandes concentrações de proteínas (CAMPBELL, 2015).

#### **2.4.7 Colesterol**

Aumentos nos níveis de colesterol tem sido associados a vitelogênese (CALLE *et al.*, 1994; LAMIRANDE *et al.*, 1999), sendo que a diminuição dos níveis de colesterol está relacionada com o período de ecdise (SILVESTRE, 2003).

#### **2.4.8 Cálcio**

O metabolismo do cálcio sanguíneo e a quantidade de cálcio ionizado no plasma de répteis são mediados pelo paratormônio, calcitonina e vitamina D<sub>3</sub> ativada, bem como pelo estrógeno, tiroxina e glucagon (CAMPBELL, 2015). Valores maiores que 20mg/dL caracterizam hipercalcemia, sendo causados por dietas ricas em cálcio e

vitamina D<sub>3</sub>, hiperparatireoidismo primário e lesões osteolíticas. Fisiologicamente, pode ocorrer durante a formação de ovos (ALMONSY, 2014). Casos de hipocalcemia normalmente são consequência de hipoalbuminemia, hiperfosfatemia, deficiência de vitamina D, deficiência de cálcio na dieta ou em sua absorção, acidose tubular renal, pancreatite aguda, bacteremia, hipomagnesemia, e uso de alguns medicamentos (ALMONSY, 2014).

#### **2.4.9 Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) e Albumina**

Em répteis, a hipoproteinemia está relacionada com a má nutrição, má absorção, perda de proteínas em enteropatias e em intensas hemorragias, doenças hepáticas ou renais crônicas (ALMONSY, 2014). Casos de hiperproteinemia ocorrem em animais desidratados ou em casos de infecções crônicas, sendo que hiperglobulinemias indicam doenças inflamatórias (CAMPBELL, 2015). Fêmeas em fase folicular ativa apresentam hiperproteinemias (ALMONSY, 2014).

#### **2.4.10 Triglicérides**

Em répteis os valores séricos de triglicérides são pouco utilizados no perfil hepático, mas mostram-se mais elevados na fase de vitelogênese (GOLDBERG et al., 2011).

#### **2.4.11 Ferro**

A determinação de ferro sérico é útil para diagnóstico diferencial das anemias hipocrômicas e microcíticas. Níveis séricos de ferro tendem a diminuir em casos de ingestão e absorção inadequados, perda crônica de sangue e liberação reduzida de ferro dos estoques orgânicos, causando anemia da inflamação (ALMONSY, 2014). Casos de níveis séricos elevados de ferro podem acontecer devido a hemossiderose, anemias hemolíticas causadas por hemoparasitos, hepatopatias, necrose hepática aguda e sobrecarga de ferro (CAMPBELL, 2015).

### **2.5 Haemogregarinidae**

As Hemogregarinas são um grupo de parasitos encontrados nos leucócitos e eritrócitos de hospedeiros vertebrados. Pertencem à ordem Eucoccidia (BARTA *et al.*, 2012; DAVIES e JOHNSTON, 2000), sendo divididos em duas subordens: Eimeriina e Adeleina (LEVINE et al., 1980). A divisão destas subordens é baseada no número de

fases do parasito no hospedeiro vertebrado e invertebrado, sendo que os membros de Eimeriina apresentam as fases de merogonia, gametogonia e esporogonia no hospedeiro vertebrado, e o hospedeiro invertebrado atua somente como vetor (TELFORD, 1984). Adeleina apresenta apenas a merogonia no hospedeiro vertebrado, enquanto a gametogonia e a esporogonia ocorrem no hospedeiro invertebrado (LANE e MADER, 1996).

Organismos pertencentes à subordem Adeleina são caracterizados por realizarem parte do ciclo em diversos órgãos, tais como fígado, baço e pulmão, e, pelo desenvolvimento dos macros e microgametas simultaneamente dentro das células do hospedeiro vertebrado (DAVIES, 1995). Essa subordem é dividida em três famílias e seis gêneros, das quais são muito semelhantes morfológicamente na fase sanguínea, e diferem apenas nas fases do ciclo no vetor, tipo de hospedeiro e localidade, o que faz com que a taxonomia desse grupo seja um desafio (SIDALL, 1995; SMITH, 1996; TELFORD, 2009).

A família Haemogregarinidae engloba os gêneros *Haemogregarina*, *Desseria* e *Cyrtia*, sendo os dois últimos conhecidos como parasitos exclusivos de peixes e transmitidos por sanguessugas (MAGRO et al., 2016; SIDALL, 1995), enquanto o gênero *Haemogregarina* é encontrada no ambiente aquático, onde é transmitida por sanguessugas e isopodos, infectando peixes e tartarugas. No ambiente terrestre, seus vetores são mosquitos e carrapatos, e infectam cágados e anfíbios (KARADJIAN et al., 2015; SIDALL, 1995).

A família Karyolysidae é composta pelos gêneros *Karyolysus* e *Hemolivia*, sendo que o gênero *Hemolivia* é o único capaz de realizar merogonia intraeritrocitária, possuindo três espécies descritas infectando anfíbios e cágados, onde carrapatos são os vetores (KVIČEROVÁ et al., 2014). *Karyolysus* foi descrito em lagartos na Europa e na Ásia e possuem como único vetor o ácaro *Ophionyssus* sp. (HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ, 2014; HASSI, 2012).

## **2.6 Hepatozoon spp. em serpentes.**

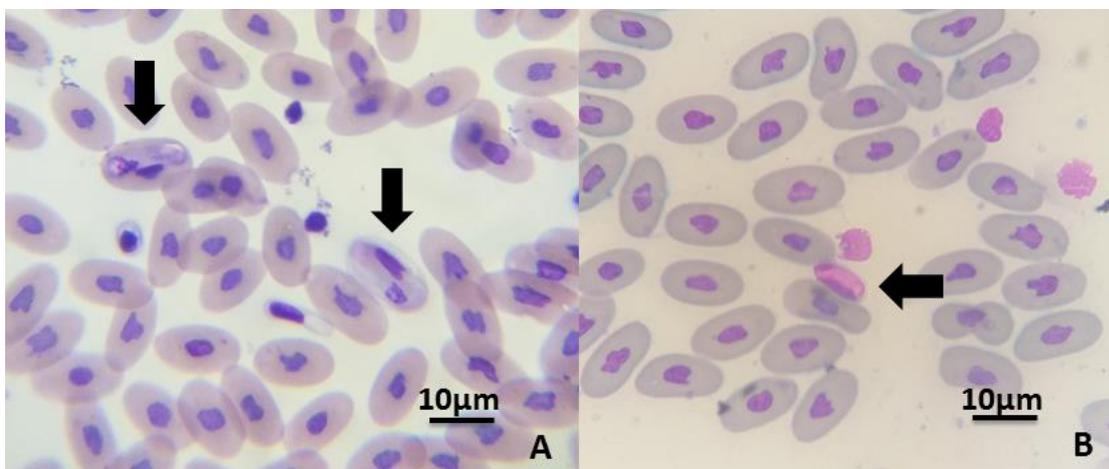
O gênero *Hepatozoon* é o único representante da família Hepatozoidae (BARTA, 1989; SIDALL, 1995). Desta maneira, este protozoário pertence ao filo Apicomplexa; classe Conoidasida; subclasse Coccidia; ordem Eucoccidiida; subordem Adeleorina (NBCI, 2020). São hemoparasitos que infectam eritrócitos de aves, anfíbios e répteis ou leucócitos de mamíferos (TELFORD, 2009). Possui morfologia no estado

gamonte e merontes tissulares muito similares a outras famílias de Hemogregarinas, sendo desta forma dificilmente identificados apenas microscopicamente (HARRIS et al., 2011; TELFORD, 2010). Desser et al. (1995), observaram que a identificação genérica é também dependente da natureza do desenvolvimento esporogônico no vetor.

Uma das características marcantes dos parasitos do gênero *Hepatozoon*, e que os diferencia de parasitos filogeneticamente próximos tais como os hemosporídeos do gênero *Plasmodium*, diz respeito à transmissão para os hospedeiros vertebrados. Os hepatozoídeos são transmitidos pela ingestão do vetor invertebrado portando esporozoítos dentro dos oocistos, enquanto em *Plasmodium* spp. os esporozoítos são injetados no sangue dos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo dos mosquitos vetores (BARTA et al., 2001; MERINO et al., 2006). Em serpentes, são descritas as formas de transmissão horizontal, onde a serpente ingere diretamente o vetor invertebrado infectado ou o hospedeiro vertebrado primário, (O'DWYER et al., 2013; SMITH, 1996), e a forma de infecção vertical (KAUFFMAN et al., 2017; LOWICHIK e YAEGER, 1987).

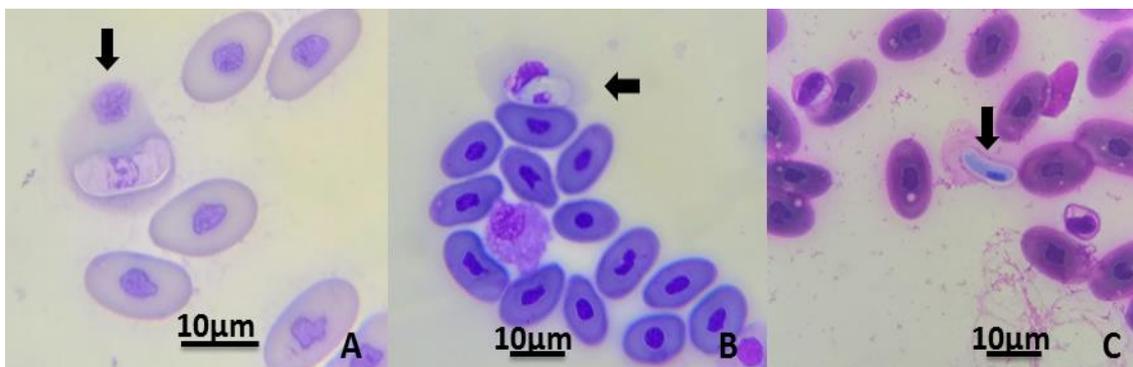
A fase de gamonte é encontrada dentro dos eritrócitos (**Figura 08A**), caracterizada por apresentar uma forma elíptica (TELFORD, 2009), estendendo-se pelo comprimento da célula hospedeira e apresentando citoplasma uniforme com núcleo condensado, quando maduro. Algumas vezes, os gamontes podem ser visualizados extracelularmente, e nesses casos o parasito pode apresentar formato mais alongado (**Figura 08B**) (TELFORD, 2009). A presença do gamonte no eritrócito pode afetar sua capacidade de carrear oxigênio devido a alterações morfológicas no eritrócito (**Figura 09A**), perda de hemoglobina (**Figura 09B**). Em alguns casos, pode haver o rompimento do eritrócito infectado (**Figura 09C**), provocando a liberação compensatória de eritrócitos jovens na corrente sanguínea (BROWN et al., 2006; TELFORD, 2009).

**Figura 08: Gamontes de *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor*.** A – Gamontes intraeritrocitários de *Hepatozoon* spp., em esfregaço sanguíneo corado por Panótico; B – Gamonte de *Hepatozoon* spp. em meio extracelular, esfregaço sanguíneo corado por May-Grunwald Giemsa. Escala de barra 10µm.



Fonte: Rodamilans, 2021.

**Figura 09: Esfregaços sanguíneos de *Boa constrictor* infectadas por gamontes de *Hepatozoon* spp.** A- Eritrócito infectado apresentando alteração na morfologia; B- Eritrócito infectado apresentando perda da hemoglobina; C- Gamonte de *Hepatozoon* spp. em meio extracelular, após romper o eritrócito. Escala de barra 10µm.



Fonte: Rodamilans, 2021.

## 2.7 Diagnóstico de infecção por *Hepatozoon* spp. em serpentes.

São descritas mais de 130 espécies de *Hepatozoon* em serpentes (UNGARI et al., 2018). Contudo, a maioria desses achados descreve as espécies baseando-se basicamente em características morfológicas do gamonte, hospedeiro e localização geográfica (TELFORD, 2009).

O diagnóstico de *Hepatozoon* spp. em serpentes normalmente é realizado pela observação da forma gamonte em esfregaço sanguíneo na microscopia. Atualmente, com o intuito de diferenciar o máximo possível os gamontes, outras variáveis morfométricas vêm sendo observadas, como a área do parasito e do seu núcleo, bem como a utilização de sistemas computacionais de análise de imagens (MOÇO et al., 2012; O'DWYER et al., 2011). O'Dwyer et al. (2011) observaram que é comum que serpentes sejam infectadas por gamontes com diferentes características morfológicas, sugerindo que fossem diferentes espécies ou diferentes estágios de desenvolvimento da mesma espécie. Smith (1996) relatou baixa especificidade aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, e que uma mesma espécie de *Hepatozoon* pode parasitar mais de uma espécie de serpente, e um único animal pode ser parasitado por mais de uma espécie de *Hepatozoon*.

A semelhança entre gamontes de diversas espécies de *Hepatozoon* torna a morfometria insuficiente para identificação dessas espécies (HARRIS et al., 2011; TELFORD, 2010). Outro fato que dificulta a identificação de espécies de *Hepatozoon*, é a possibilidade de uma mesma espécie apresentar características morfológicas e morfométricas diferentes em hospedeiros diversos (BALL, 1970).

Maia et al. (2014) relataram que serpentes com infecções crônicas tendem a apresentar variações de parasitemia, podendo não apresentar gamontes no sangue periférico e, conseqüentemente, resultados falsos negativos à microscopia. Com isso, percebe-se que o uso da microscopia não pode ser eficaz para o diagnóstico de infecção por *Hepatozoon*, bem como para identificação de espécies deste hemoparasito, apesar de auxiliar na sua caracterização (MOÇO et al., 2012). Calil et al. (2019) observaram que técnicas moleculares são mais sensíveis e eficazes para o diagnóstico e identificação destes parasitos.

Os primeiros estudos sobre caracterização molecular de *Hepatozoon* spp. de serpentes foram conduzidos por Wozniak et al. (1994). Os autores conseguiram

amplificar uma região do rDNA de cinco diferentes isolados de *Hepatozoon* utilizando oligonucleotídeos desenvolvidos a partir da sequência de rDNA dos genes estruturais 18S de *Plasmodium* e *Babesia*. Contudo, estudos posteriores observaram que os oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Wozniak *et al.* (1994) não apresentaram especificidade para hemogregarinas e amplificavam também os genes SSU rDNA dos hospedeiros vertebrados quando o DNA era extraído do sangue (PERKINS e MARTIN, 1999). Assim, Perkins e Keller (2001) desenvolveram novos oligonucleotídeos iniciadores para caracterização de *Hepatozoon* spp. de serpentes, denominados HEMO1 e HEMO2.

Ujvari *et al.* (2004) também utilizaram técnicas moleculares para diagnosticar a infecção por *Hepatozoon* sp. em *Liasis fuscus*, lançando mão dos iniciadores HepF300 e Hep900, encontrando uma alta taxa de infecção. Contudo, os autores não nomearam a espécie de *Hepatozoon*, pois observaram a mesma sequência de nucleotídeos em outras quatro espécies de serpentes e por não possuírem outros dados biológicos do protozoário. Os autores sugeriram ainda que uma mesma espécie de *Hepatozoon* tem capacidade de infectar hospedeiros de diferentes níveis taxonômicos.

Telford *et al.* (2004) compararam sequências de hemogregarinas encontradas em serpentes no nordeste da Flórida, morfologicamente semelhantes com o já descrito *Hepatozoon sauritus* comumente encontrado no sul da Flórida e com *Hepatozoon sirtalis*, este morfologicamente distinto, porém descrito no norte da Flórida. Para tal, utilizaram os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2, desenhados por Perkins e Keller (2001). Os autores observaram dois haplotipos de Hemogregarinas, indicando a existência de dois grupos, sendo um deles incluindo *H. sauritus* e as quatro amostras do nordeste da Flórida compostos de amostras de *H. sirtalis*.

Rubini *et al.* (2005) realizaram a primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. de serpentes, no caso *Hydrodynastes gigas*, na América Latina, utilizando os oligonucleotídeos HepF e HepR (INOKUMA *et al.*, 2002). A PCR foi eficiente em detectar *Hepatozoon* sp. do sangue de *H. gigas* com amplificação de um produto de PCR de 625 pb. O sequenciamento indicou a possibilidade de se tratar de uma única espécie de *Hepatozoon*, com 98,9% de identidade com o isolado 1 (AY252110) de *Stegonotus cucullatus* (Colubridae) da Austrália, e 96,0% de identidade com *H. catesbiana* (AF176837) de anfíbios no estado de Oklahoma, Estados Unidos.

Harris *et al.* (2011) caracterizaram molecularmente espécies de *Hepatozoon* em répteis das Ilhas Seychelles, sequenciando regiões do gene 18S rDNA, utilizando os

oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 (PERKINS e KELLER, 2001), bem como HepF300 e Hep900 (UJVARI et al., 2004). A análise filogenética indicou que as espécies de *Hepatozoon* de Seychelles formam uma linhagem monofilética. Maia et al. (2011) realizaram um inquérito molecular sobre espécies de *Hepatozoon* de lagartos do Norte da África, sequenciando regiões do 18S rDNA, utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos utilizados por Harris et al. (2011), e encontraram múltiplas linhagens geneticamente distintas.

Moço et al. (2012) conduziram estudos com *Hepatozoon* sp. de *Caudisona durissa terrificata* utilizando os oligonucleotídeos HepF/HepR (INOKUMA et al., 2002) e PiroA1/PiroB (JEFFERIES et al., 2003), os quais amplificaram, respectivamente, 650 e 500 pb da região 18S rDNA. Apesar do sucesso dos mesmos em detectar tais parasitos, a caracterização molecular utilizando o fragmento amplificado mostrou-se incapaz de diferenciar espécies de *Hepatozoon* de serpentes.

O'Dwyer et al. (2013) foram os primeiros autores na América do Sul a descreverem novas espécies de *Hepatozoon* spp. em serpentes através de caracterização molecular e dados morfológicos. Os autores testaram diferentes pares de oligonucleotídeos e observaram que somente os pares HepF300/Hep900 e HEMO1/HEMO2 foram eficientes para amplificar e distinguir diferentes isolados de *Hepatozoon* spp. de serpentes. Com isso, conseguiram propor três novas espécies, *Hepatozoon cuestensis*, *Hepatozoon cevapii* e *Hepatozoon massardii* em serpentes *Crotalus durissus terrificus* de cativeiro, em Botucatu - São Paulo - Brasil.

Borges-Nojosa et al. (2017) descreveram uma nova espécie de *Hepatozoon* sp. no Nordeste brasileiro em *Philodryas nattereri* de vida livre. Além da caracterização morfológica do gamonte, os autores realizaram teste molecular utilizando os oligonucleotídeos HEP e HEMO. A nova espécie sugerida, chamada *Hepatozoon musa*, gerou uma sequência de nucleotídeos muito próxima a descrita por O'Dwyer et al. (2013) para a espécie *H. cuestensis*.

Ungarí et al. (2018) realizaram testes moleculares em diferentes espécies de serpentes de cativeiro no estado de São Paulo, Brasil, que apresentaram eritrócitos infectados por *Hepatozoon* spp. Os autores utilizaram os oligonucleotídeos HEP e HEMO e conseguiram identificar a espécie *H. musa* e *H. cuestensis* além de identificar uma potencial nova espécie em *Boa constrictor*. Este estudo foi o primeiro a relatar *H. musa* parasitando *Epicrates crassus* e *C. durrisus*.

Calil et al. (2019) realizaram diagnóstico de *Hepatozoon* em 110 animais de cativeiro ou recém resgatados, locados no Zoológico de São Paulo e no Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Dos 110 animais, apenas 13,3% dos animais (15/110) apresentaram eritrócitos infectados à microscopia de luz, e 5,5% (6/110) foram positivos ao PCR utilizando pares de oligonucleotídeos HEPF300/HEPR900.

Úngari et al. (2021) diagnosticaram uma possível nova espécie de *Hepatozoon* em uma serpente *Dipsas mikanii* coletada no estado de Goiás, Brasil. Foram utilizados nesses estudo os *primers* HEPF300/HEPR900 para as amostras sanguíneas e os *primers* 4558 e 2733 nas amostras de tecido hepático. Os autores conseguiram também caracterizar morfológicamente os gamontes localizados em sangue periférico, bem como os merontes e cistos monozoicos encontrados no exame histopatológico presentes no tecido hepático.

Portanto, considerando a importância ecológica dos parasitos do gênero *Hepatozoon* em diferentes espécies de animais, e em especial em serpentes, é de alta relevância diagnosticar, estimar a prevalência e identificar a espécie destes hemoparasitos em animais de vida livre, bem como avaliar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas induzidas pela infecção por *Hepatozoon*. Paralelamente, a observação e comparação destes resultados podem servir de ferramentas na conservação de animais silvestres e na clínica de animais de estimação.

### 3. Referências

- ALMOSNY, N.R.P. Patologia clínica em vertebrados ectotérmicos. In: Cubas Z.S., Silva J.C.S. & Catão-Dias J.L. **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. 2ª ed., São Paulo: Roca, 2014. p.1597-1623.
- ALVES, R.R.N.; NETO, N.A.L.; SANTANA, G.G.; VIEIRA, W.L.S.; ALMEIDA, W.O. Reptiles used for medicinal and magic religious purposes in Brazil. **Applied Herpetology**, v.6, p.257–274. 2009. doi.org/10.1163/157075409X432913.
- ALVES, R.R.N.; ARAÚJO, B.M.C.; POLICARPO, I.S.; PEREIRA, H.M.; BORGES, A.K.M.; VIEIRA, W.L.S.; VASCONCELLOS, A. Keeping reptiles as pets in Brazil: Ethnozoological and conservation aspects. **Journal for Nature Conservation**, v.49, p.09-21. 2019. doi.org/10.1016/j.jnc.2019.02.002.
- AULIYA, M. Conservation Status and Impact of Trade on the Oriental Rat Snake *Ptyas Mucosa* in Java. A Traffic Southeast Asia Report. **TRAFFIC Southeast Asia, Petaling Jaya, Selangor, Malaysia, Indonesia**. 2010 Disponível em: <https://www.traffic.org/site/assets/files/3211/oriental-rat-snake-java.pdf>.
- BALL, H.G. Hemogregarine life cycles. **Journal of Parasitology**, v. 56, p. 17, 1970.
- BANETH, G.; MATHEW, J.S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D. K.; BARTA, J.R.; EWING, S.A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. **Trends in Parasitology**, v.19, n.1, p. 27-30. 2003.
- BARTA, J. R. Phylogenetic analysis of the class Sporozoea (phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. **The Journal of Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 195-206. 1989.
- BARTA, J. R., D. S. MARTIN, R. A. CARRENO, M. E. SIDDALL, H. PROFOUS-JUCHELKA, M. HOZZA, M. A. POWLES, AND C. SUNDERMANN. Molecular phylogeny of the other tissue coccidia: *Lankesterella* and *Caryospora*. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 121–127. 2001. doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0121:MPOTOT]2.0.CO;2
- BARTA, J.R.; OGEDENGBE, J.D.; MARTIN, D.S.; SMITH, T.G. Phylogenetic Position of the Adeleorinid Coccidia (Myxozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) Inferred Using 18S rDNA Sequences. **Journal of**

**Eukaryotic Microbiology**, v.59, n. 2, p. 171 – 180. 2012. doi: 10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x

BAUER, A; BAUER, G. Squamata – sauria (Iguana e Lagartos) In: CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014, 2ªed, p. 170-185.

BÖHM, M. The conservation status of the world's reptiles. **Biological Conservation** v. 157, p. 372-385. 2013.

BORGES-NOJOSA, D.M.; BORGES-LEITE, M. J.; MAIA, J. P.; ZANCHI-SILVA, D.; BRAGA, R.R.; HARRIS, D. J. A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adelerina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 65 – 72. 2017. doi: 10.1007/s11230-016-9676-2

BROWN, G.P.; SHILTON, C.M.; SHINE, R. Do parasites matter? Assessing the fitness consequences of haemogregarine infection in snakes. **Canadian Journal of Zoology**, v.84, p. 668-676. 2006. doi: 10.1139/Z06-44

CABRAL, S.O.; FREITAS, I. S.; MORLANES, V.; KATZENBERGER, M.; CALABUIG, C. Seed dispersers: a new facet of the ecological role of *Boa constrictor constrictor* Linnaeus 1758. **Biota Neotropica**, v.19(4): e20180626. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0626>

CALIL, P.R.; PUORTO, G.; DUNN, J.C.; CHAGAS, C.R.F.; RAMOS, P.L. Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp. in Brazilian snakes. **Amphibia-Reptilia**, v. 40, n. 3, p. 337 – 347. 2019. doi:10.1163/15685381-20191113

CALLE, P.P; RIVAS, J.; MUÑOZ, M.; THORBJARNARSON, J.; DIERENFELD, E.S.; HOLMSTROM, W.B.A.; BRASELTON, W.E.; KARESH, W.B. Health assessment of free-ranging anacondas (*Eunectes murinus*) in Venezuela. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 25, n.1, p. 53 -62. 1994.

CAMPBELL T: Interpretation of the reptilian blood profile. **Exotic Pet Practice**, v. 3, p. 33-36. 1998.

CAMPBELL, T.W. Hematologia dos répteis. In: THRALL, M.A., WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p. 594 – 637.

CHAFFIN, K.; NORTON, T. M.; GILARDI, K.; POPPENG, R.; JENSEN, J. B.; MOLER, P.; CRAY, C.; DIERENFELD, E. S.; CHEN, T.; OLIVA, M.; ORIGGI, F. C.; GIBBS, S.; MAZZARO, L.; MAZETCHAFFIN, J. K. Health assessment of free-ranging alligator snapping turtles (*Macrochelys temminckii*) in Georgia and Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 3, p. 670-686, 2008. doi.org/10.7589/0090-3558-44.3.670

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. **Répteis brasileiros: Lista de espécies 2015. Sociedade Brasileira de Herpetologia**, 2018. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso 31/07/2019.

CUNNINGHAM, A.A. Disease Risks of Wildlife Translocations. **Conservation Biology**. v. 10, n. 2, p. 349 – 353. April 1996.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropica**. v.78, p. 103–116. 2001.

DASZAK, P.; TABOR, G.M.; KILPATRICK, A.M.; EPSTEIN, J.; PLOWRIGHT, R. Conservation Medicine and a New Agenda for Emerging Diseases. **Annals New York Academy Of Sciences**. v.1026, p.1–11. 2004. doi: 10.1196/annals.1307.001

DAVIES, A. J. The Biology of Fish Haemogregarines. **Advances in Parasitology**, v. 36, p.117-203. 1995.

DAVIES, A.J.; JOHNSTON, M.R.L. The Biology of some Intraerythrocytic Parasites of Fishes, Amphibia and Reptiles. **Advances in Parasitology**, v. 45, p. 1 – 107. 2000. doi: 10.1016/S0065-308X(00)45003-7

DAWSON, D.E.; HOSTETLER, M.E. Herpetofaunal use of edge and interior habitats in urban forest remnants. **Urban habitats**, v.5, n.1, p. 103-125. 2008.

DESSER, S. S.; HONG, H.; MARTIN, D. S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbiana* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin park, Ontario. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 212-222. 1995.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; MAVINGUI, P.; BOETSCH, G.; BOISSIER, J.; DARRIET, F.; DUBOZ, P.; FRITSCH, C.; GIRAUDOUX, P.; LE ROUX, F.; MORAND, S.; PAILLARD, C.; PONTIER, D.; SUEUR, C.; VOITURON, Y. The One

Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5. fevereiro 2018. doi: 10.3389/fvets.2018.00014

FORSTER, P.; FORSTER, L.; RENFREW, C.; FORSTER, M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.17, n. 17, p. 9241-9243. April 2020. doi/10.1073/pnas.2004999117

FRYE, F.L. **Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry**. 2<sup>a</sup> edição. Malabar, Florida: Krieger Publishing, 1991. 2 v, 637p.

GOLDBERG, D.W.; WANDERLINDE, J.; FREIRE, I.M.A.; SILVA, L.C.P.; ALMOSNY, N.R.P. Serum biochemistry profile determination for wild loggerhead sea turtles nesting in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 41, n. 1, p. 143 – 148. 2011.

GOMES, N. M. B.; PUORTO, G.; BUONONATO, M. A.; RIBEIRO, M. F. M. Atlas anatomico de *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 (serpente, boidae). **Monografias do Instituto Butantan**, São Paulo, n. 2 , p. 1-59, 1989.

GOMES, D.M.; SILVA, M.N.; SILVA, R.M.M.; DÓREA, R.D.; BASTOS, B.L; AYRES, M.C.C. Hemograma e bioquímica clínica sanguínea de araras (*Ara* sp.) mantidas em sítios ecológicos no estado da Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.4, p. 699 – 711. Outubro - Dezembro 2011. doi: 10.5216/cab.v12i4.6230

HANLEY, C.S.; STEPHEN J. HERNANDEZ-DIVERS, S.J.; SHAY BUSH, S.; LATIMER, K.S. Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 3, p.328-332. 2004. <http://dx.doi.org/10.1638/03-057>

HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ, B., HIŽŇANOVÁ, A.; MAJLÁTH, I.; RAČKA, K.; HARRIS, D.J.; FÖLDVÁRI, G.; TRYJANOWSKI, P.; KOKOŠOVÁ, N.; MALČEKOVÁ, B.; MAJLÁTHOVÁ, V. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* – a neglected but common parasite infecting some European lizards. **Parasite e Vectors**, v. 7, n. 555. 2014. doi: 10.1186/s13071-014-0555-x

HARR, K.E.; RASKIN, R.E.; HEARD, D.J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 4, p. 383 – 388. 2005. [10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x)

HARRIS, D.J.; MAIA, J.P.; PERERA, A. Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. **Journal of Parasitology**, n. 97, p. 106–110. 2011. doi: [10.1645/GE-2470.1](https://doi.org/10.1645/GE-2470.1)

HASSI, A.R. Blood parasitism by hemogregarines in central European lizards. **Herpetozoa**. v.25, p. 83 – 86. 2012.

HENDERSON, R. W. On the diets of some arboreal boids. **Herpetological Natural History**, v. 1, p. 91-96. 1993a

HENDERSON, R. W. Foraging and diet in West Indian *Corallus enydris* (Serpentes: Boidae). **Journal of Herpetology**, v. 27, p. 24-28. 1993b.

HIERINK, F.; BOLANA, I.; DURSO, A.M.; CASTAÑEDA, R.R.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; ESKEWC, E.A.; RAYA, N. Forty-four years of global trade in CITES-listed snakes: Trends and implications for conservation and public health. **Biological Conservation**, v.248. 2020 doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108601.

IBAMA. **Diagnóstico da criação comercial de animais silvestres no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2019.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISHI, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 265-271. June, 2002. doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00065-1

JEFFERIES R.; RYAN, U.M.; MUHINICKEL, C.J.; IRWIN, P.J. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 409 - 412. April, 2003. doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0409:TSOCBI]2.0.CO;2

JENSEN, T.J.; AULIYA, M.; BURGESS, N.D.; AUST, P.W.; PERTOLDI, C.; STRAND, J. Exploring the international trade in African snakes not listed on CITES: highlighting the role of the internet and social media. **Biodiversity and Conservation**, v.28, p.1–19. 2019. doi.org/10.1007/s10531-018-1632-9.

KANEKO, J. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 5. Edição. Pennsylvania: Academic Press, 1997. 932pp

KARADJIAN G.; CHAVATTE, J.M.; LANDAU, I. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. **Parasite**. v. 22, n. 31. 2015. doi: 10.1051/parasite/2015031

KARESH, W.B.; COOK, R.A.; BENNETT, E.L.; NEWCOMB, J. Wildlife trade and global disease emergence. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, p.1000–1002. 2005. doi.org/10.3201/eid1107.050194.

KASTERINE, A., ARBEID, R., CAILLABET, O., NATUSCH, D. The Trade in South-East Asian Python Skins. **International Trade Centre**, Geneva. 2012. Disponível em <http://www.intracen.org/uploadedFiles/intracenorg/Content/Publications/The%20Trade%20in%20southeast%20Asian%20Python%20Skins%20for%20web.pdf>.

KAUFFMAN, K.L.; SPARKMAN, A.; BRONIKOWSKI, A. M.; PALACIOS, M. G. VERTICAL transmission of *Hepatozoon* in the garter snake *Thamnophis elegans*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n.1, p. 121 – 125. 2017. doi: 10.7589/2016-03-056

KEGLER, K.; NUFER, U.; ALIC, A.; POSTHAUS, H.; OLIAS, P.; BASSO. W. Fatal infection with emerging apicomplexan parasite *Hepatozoon silvestris* in a domestic cat. **Parasites & Vectors**. v.11. 2018. doi.org/10.1186/s13071-018-2992-4.

KELLER K.A.; GUZMAN D.S.; PAUL-MAURPHY J.; BYRNE B. A.; OWENS S. D.; KASS P. H.; WEBER S. Hematologic and Plasma Biochemical Values of Free-Ranging Western Pond Turtles (*Emys marmorata*) with Comparison to a Captive Population. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 22, n. 3-4, p. 99-106, 2012. doi: 10.5818/1529-9651-22.3.99

KELLY T. R.; MCNEIL J.B.; AVENS L.; HALL A.G.; GOACHE L.R.; HOHN A.A.; GODFREY M.H.; MIHNOVETS A. N.; CLUSE W.M.; HARMS C. A. Clinical Pathology Reference Intervals for an In-Water Population of Juvenile Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) in Core Sound, North Carolina, USA. PLoS ONE. v.10, n.3, p.1-13, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0115739

KLEMENS, M.W., THORBJARNARSON, J.B. Reptiles as a food resource. **Biodiversity & Conservation**., v.4, p.281–298. 1995. doi.org/10.1007/BF00055974.

KINDLOVITS, L.M.; MIRANDA, F.J.B.; DAMASCENO-SÁ, J.C.; DA MATTA, R.A.; ALMOSNY, N.R.P. Aspectos morfológicos e ultraestruturais de células sanguíneas de *Crotalus durissus terrificus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.2, p.183-194, 2017a. doi.org/10.1590/s0100-736x2017000200014

KINDLOVITS, L.M.; TEMOCHE, L.F.C.; MACHADO, C.; ALMOSNY, N.R.P. 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. doi.org/10.1590/1678-4162-9072

KVIČEROVÁ, J.; HYPŠA, V.; DVOŘÁKOVÁ, N.; MIKULÍČEK, P.; JANDZIKE, D.; GARDNER, M.G.; JAVANBAKHT, H.; TLAR, G.; SIROKY, P. *Hemolivia* and *Hepatozoon*: Haemogregarines with tangled evolutionary relationships. **Protist**, v. 165, p. 688 – 700. 2014. doi.org/10.1016/j.protis.2014.06.001

LAMIRANDE, E. W.; BRATTHAUER, A. D.; FISCHER, D. C.; NICHOLS, D. K. Reference Hematologic and Plasma Chemistry Values of Brown Tree Snakes (*Boiga irregularis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 30, n. 4, p. 516 – 520. Dezembro 1999.

LANE, T. J.; MADER, D. R. Parasitology. In: Mader DR. **Reptile Medicine and Surgery**. Philadelphia, W.B. Saunders, 1996. 1242pp.

LANFRANCHI, P.; FERROGLIO, E.; POGLAYEN, G.; GUBERTI, V. Wildlife Veterinarian, Conservation and Public Health. **Veterinary Research Communications**. v.27, p.567-574. 2003.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANDKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LOCKWOOD, J.L.; WELBOURNE, D.J.; ROMAGOSA, C.M.; CASSEY, P.; MANDRAK, N.E.; STRECKER, A.; LEUNG, B.; STRINGHAM, O.C.; UDELL, B.; EPISCOPIO-STURGEON, D.J.; TLUSTY, M.F.; SINCLAIR, J.; SPRINGBORN, M.R.; PIENAAR, E.F.; RHYNE, A.L.; KELLER, R. When pets become pests: the role

of the exotic pet trade in producing invasive vertebrate animals. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.17, p.323–330. 2019. doi.org/10.1002/fee.2059.

LOWICHIK, A.; YAEGER, R.G. Ecological aspects of snake hemogregarine infections from two habitats in southeastern Louisiana. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 6, p. 1109 – 1115. 1987. doi: 10.2307/3282289

LUISELLI, L., BONNET, X., ROCCO, M., AMORI, G. Conservation implications of rapid shifts in the trade of wild African and Asian pythons. **Biotropica**. v.44, p.569–573. 2012, doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00842.x.

MACHADO, C. Um panorama dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil. **Journal Health NPEPS**. v. 1, n.1, p. 1 – 3. 2016.

MADSEN, T.; UJVARI, B.; OLSSON, M. Old pythons stay fit: effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. **Oecologia** v. 142, p. 407-412. 2005 doi.org/10.1007/s00442-004-1742-9

MAGRO, N.M.; DE OLIVEIRA, A.T.; O'DWYER, L.H. First report and description of a *Cyrtosporidium* sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from a freshwater cururu stingray *Potamotrygon* cf. *histrrix* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae), from the Amazon Region, Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 39, n. 8, p. 907 – 911. 2016. <https://doi.org/10.1111/jfd.12425>

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

MAIA, J.P.; HARRIS, D.J.; CARRANZA, S.; GÓMEZ-DÍAZ, E. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of Hemogregarine Hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. **PLoS One**, v. 9, n. 4. 2014 doi:10.1371/journal.pone.0095010

MARTÍNEZ-SILVESTRE, A.; LAVÍN, S.; CUENCA, R. Hematología y citología sanguínea en reptiles. **Clínica Veterinaria de Pequeños Animales**, v. 31, n. 3, p. 131-141. 2011.

MARTINS, N.B.; FERREIRA, L.A.R.; SANTOS, A.L.Q.; SOUZA, R.R.; OLIVEIRA, W.J.; MOREIRA, T.A.; QUEIROZ, C.L.; LIMA, A.M.C. Dermatopathy caused by *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* in *Boa constrictor amarali*. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 45, p. 1 – 4. 2017. doi: 10.22456/1679-9216.86173

MCKINNEY, M. L. Urbanization, Biodiversity, and Conservation. **BioScience** v. 52, n. 10, p. 883-890. 2002.

MCKINNEY, M. L. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. **Biological conservation**. v.27, p. 247-260. 2006.

MERINO, S.; MARTÍNEZ, J.; PUENTE, J.M.; CRIADO-FORNELIO, A.; TOMÁS, G.; MORALES, J.; LOBATO, E.; GARCÍA-FRAILE, S. Molecular characterization of the 18S rDNA gene of avian *Hepatozoon* reveals that it is closely related to *Lankesterella*. **Journal of Parasitology**. v. 92, n. 6, p. 1330 – 1335. 2006. doi.org/10.1645/GE-860R.1

MESSONIER, S.P. Diseases and Treatment of Snakes. IN: MESSONIER, S.P. **Common Reptile Diseases and Treatment**, Blackwell Science. 1ª Edição, 1996. p.93-95.

MITCHELL, M.A. Zoonotic Diseases Associated with Reptiles and Amphibians: An Update. **Veterinary Clinics Exotic Animal**, v. 14, p. 439-456. 2011. doi:10.1016/j.cvex.2011.05.005

MOÇO, T.C.; DA SILVA, R.J.; MADEIRA, N.G.; PADUAN, K.D.S.; RUBINI, A.S.; LEAL, D.D.M.; O'DWYER, L.H. Morphological, morphometric, and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisona durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitology Research**, v. 110, n. 4, p. 1393 -1401. 2012. doi: 10.1007/s00436-011-2639-2

MURO, J.; CUENCA, R.; PASTOR, J.; VINAS, L.; LAVIN, S. Effects of lithium heparin and tripotassium edta on hematologic values of hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 29, n. 1, p.40 – 44. Março 1998.

MURRAY M. J. Cardiopulmonary Anatomy and Physiology In: Mader D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2 ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006, p.124-134.

NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 1-30. 2013. doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001

NATIONAL Center for Biotechnology Information (NCBI), c2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=110120>>. Acesso em: 07/nov/2020.

NAVEGA-GONÇALVES, M.E.C.; PORTO, T. Conservação de serpentes nos biomas brasileiros. **BIOIKOS**, v. 30, n. 1, p. 55-76. 2016.

NOGUEIRA, C.C.; ARGOLO, A.J.S.; ARZAMENDIA, V.; AZEVEDO, J.A.; BARBO, F.E.; BÉRNILS, R.S.; BOLOCHIO, B.E.; BORGES-MARTINS, M.; BRASIL-GODINHO, M.; BRAZ, H.; BUONONATO, M.A.; CISNEROS-HEREDIA, D.F.; COLLI, G.R.; COSTA, H.C.; FRANCO, F.L.; GIRAUDO, A.; GONZALEZ, R.C.; GUEDES, T.; HOOGMOED, M.S.; MARQUES, O.A.V.; MONTINGELLI, G.G.; PASSOS, P.; PRUDENTE, A.L.C.; RIVAS, G.A.; SANCHEZ, P.M.; SERRANO, F.C.; SILVA JR, N.J.; STRUSSMANN, C.; VIEIRA-ALENCAR, J.P.S.; ZAHER, H.; SAWAYA, R.J.; MARTINS, M. Atlas of Brazilian snakes: Verified point-locality maps to mitigate the wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. **South American Journal of Herpetology**, v.1, p. 1-274. 2019. doi.org/10.2994/SAJH-D-19-00120.1

O'DWYER, L.H.; SILVA, R.J.; MADEIRA, N.G. Description of gamontogonic and sporogonic stages of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from *Caudisona durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). **Parasitology Research**, v. 108, p. 845–851. 2011. doi.org/10.1007/s00436-010-2124-3

O'DWYER, L.H.; MOCO, T.C.; PADUAN, K. DOS S.; SPENASSATTO, C.; DA SILVA, R.J.; RIBOLLA, P.E.; Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 200–207. 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.019

OZZETTI, P.A. **Hematopoese 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.

PERKINS, S.L.; MARTIN, J.M. Conserved primers fail in the diagnosis of parasitic infection. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 982-984. October, 1999. doi: 10.2307/3285844

- PERKINS, S.L.; KELLER, A.K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotídeos. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 870-876. August, 2001. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0870:PONSSR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0870:PONSSR]2.0.CO;2)
- PINTO-COELHO, D.; Hamdan, B.; Lira-da-Silva, R. M. Geographic and altitudinal distribution of snakes of the family boidae in the state of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Nordestina de Zoologia**.v. 12, n. 2, p. 26 – 50. 2020.
- PIZZATTO, L.; FACURE, K. & MARQUES, O.A.V. Food habits of Brazilian boid snakes: overview and new data, with special reference to *Corallus hortulanus*. **Amphibia-Reptilia**. v. 30 n.4, p. 533–544. 2009.
- RODAMILANS, G.M.; FONSECA, M.S.; PAZ, L.N.; FERNANDEZ, C.C.; BIONDI, I.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; MEYER, R.; PINNA, M.H.; PORTELA, R.D. *Leptospira interrogans* in wild *Boa constrictor* snakes from Northeast Brazil peri-urban rainforest fragments. **Acta Tropica**. v. 209. 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105572
- RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; RIBEIRO, V.C.; RIBOLLA, P.E.M.; SILVA, R.J.; O'DWYER, L.H. Caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HERPETOLOGIA, 2., 2005, Belo Horizonte. **Anais do Congresso Brasileiro de Herpetologia**. Belo Horizonte: Minas Gerais, 2005.
- SARMIENTO, J.C.F.; GLORIA HELENA JARAMILLO, G.H.; RAMIREZ, D.M.; PICO, J.E.N. Establishment of hematological parameters in boas (*Boa constrictor*) in the Centro de Atencion y Valoracion de Fauna Silvestre del Valle de Aburra (Cav AMVA). **International Journal of Avian & Wildlife Biology Research**, v. 3, n. 2, p. 146 – 150. 2018. doi: 10.15406/ijawb.2018.03.00076
- SCARTOZZONI, R. R.; MOLINA, F.B. Comportamento alimentar de boa constrictor, *Epicrates cenchria* e *Corallus hortulanus* (Serpentes: Boidae) em cativeiro. **Revista de Etologia**, v.6, n.1, p. 25-31. 2004.
- SIDDALL, M. E. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 42, p. 116–125. 1995. doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb01551.x

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 8º CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL**; Caxambu (Br); 2007, p.1-2.

SILVESTRE, A. M. **Enfermidades de los reptiles**. Barcelona: Reptilia Ediciones, 2003. 207pp.

SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of Parasitology**. V.82, p.565–585. 1996.

SMITH, K.M.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; WHITE, A.; ASMUSSEN, M.; MACHALABA, C.; KENNEDY, S.; LOPEZ, K.; WOLF, T.M.; DASZAK, P.; TRAVIS, D.A.; KARESH, W.B.; Summarizing US wildlife trade with an eye toward assessing the risk of infectious disease introduction. **EcoHealth** v.14, p.29–39. 2017.<https://doi.org/10.1007/s10393-017-1211-7>.

SOMAWEERA, R., SOMAWEERA, N. Serpents in jars: the snake wine industry in Vietnam. **Journal of Threatened Taxa.**, v.2, p.1251–1260. 2010 [doi.org/doi.org/10.11609/JoTT.o2361.1251-60](https://doi.org/10.11609/JoTT.o2361.1251-60).

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos: reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros, clínica, tratamento de envenenamentos**. São Paulo: Ateneu, 1996. 138p.

STAFFORD, P. J., & HENDERSON, R. W. **Kaleidoscopic Tree Boas: the genus *Corallus* of Tropical America**. 1ª edição, Malabar, Flórida: Krieger, 1996, 120 pp. ISBN 978-0-89464-975-2

SYKES, J.M.; KLAPHAKE, E. Reptile hematology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 3, p. 661 – 680. 2015. doi: 10.1016/j.cll.2015.05.014

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**. v. 356, p. 983 – 989. 2001. doi: 10.1098/rstb.2001.0888

TELFORD, S.R. Haemoparasites of reptiles. In: Hoff, G.L.; Frye, F.L.; Jacobson, E.R. **Diseases of Amphibians and Reptiles**, Editora Plenum Press, New York. 1984.

TELFORD, S.R.; ERNST, J.A.; CLARCK, A.M.; BUTLER, J.F. *Hepatozoon sauritus*: A polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome analysis. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 2, p. 352-358. 2004. [dx.doi.org/10.1645/GE-3258](https://doi.org/10.1645/GE-3258)

TELFORD, S.R. **Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text**. CRC Press, Florida. 2009. 394p.

TELFORD, S.R. Three new *hepatozoon* species (apicomplexa: hepatozoidae) infecting the Florida kingsnake, *lampropeltis getula floridana*. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 162 – 169. February 2010. doi: 10.1645/GE-2161.1

THRALL, M. A. Classificação e abordagem diagnóstica da anemia. In: THRALL, M.A., WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p. 170 – 179.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Scham's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2009. p. 152-161.

UETZ, P.; FREED, P.; HOŠEK, J. The Reptile Database: Species Numbers (as of August 2019). 2020. Disponível em <http://www.reptile-database.org>, (eds.) (2020). Acesso em: 08/08/2020

UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) From Tropical Australia. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 670 – 672. 2004. doi: 10.1645/ge-204r

ÚNGARI, L.P.; SANTOS, A.L.Q.; O'DWYER, L.H.; DA SILVA, M.R.L.; RODRIGUES SANTOS, T.C.; DA CUNHA, M. J. R.; PINTO, R.M.C.P.; CURY, M.C. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 12, p. 3857 -3865. 2018. doi: 10.1007/s00436-018-6092-3

ÚNGARI, L.P.; NETHERLANDS, E.C.; ALCANTARA, E.P.; EMMERICH, E.; SILVA, R.J.; O'DWYER, L.H. 2021. Description of a New Species *Hepatozoon quagliattus* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting the Sleep Snake, *Dipsas mikanii* (Squamata: Colubridae: Dipsadinae) from Goiás State, Brazil. **Acta Parasitologica**. 2021 <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00355-x>

WEISER, G. Hematologia dos répteis. In: THRALL, M.A., WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p. 22 – 86.

WOSNIAK, E.J.; TELFORD, S.R.; MCLAUGHLIN, G.L. Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n. 4, p. 538-547, December, 1994.

ZIPPEL, K.C.; LILLYWHITE, H.B.; MLADINICH, C.R.J. New vascular system in reptiles: Anatomy and postural hemodynamics of the vertebral venous plexus in snakes. **Journal of Morphology**, v. 250, n. 2, p. 173 – 184. 2001. 10.1002/jmor.1063

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo geral:

Caracterizar a infecção por *Hepatozoon* spp. em serpentes *Boa constrictor* de vida livre provindas de fragmentos periurbanos de Mata Atlântica do Nordeste brasileiro, através de diagnóstico microscópico e molecular, avaliar as espécies de *Hepatozoon* envolvidas, e observar os efeitos da infecção por *Hepatozoon* spp. nos componentes sanguíneos celulares e bioquímicos destes animais.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência da infecção por *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor* de vida livre provenientes de áreas periurbanas do nordeste brasileiro;
- b) Avaliar os diferentes métodos de diagnóstico para *Hepatozoon* spp. em *Boa constrictor*;
- c) Determinar a parasitemia nos animais infectados apresentando gamontes em sangue periférico;
- d) Realizar filogenia molecular a partir das sequências obtidas dos amplificadores em PCR.;
- e) Caracterizar morfológicamente e morfometricamente os gamontes dos parasitos, bem como as possíveis alterações provocadas nos eritrócitos infectados;
- f) Observar possíveis alterações induzidas nos constituintes sanguíneos pela infecção por *Hepatozoon* spp., e comparar com animais não infectados;
- g) Estabelecer padrão de valores de referência hematológicos e bioquímicos para *Boa constrictor* de vida livre no nordeste brasileiro.

## 5. Hipóteses

Parasitas do gênero *Hepatozoon* são os principais hemoparasitos encontrados em serpentes, sendo relatada mais de 130 espécies nesses animais. Embora serpentes infectadas normalmente não apresentem sinais clínicos, relatos de animais que apresentaram manifestações clínicas e mesmo óbito são conhecidos. Estudos anteriores observaram que técnicas de biologia molecular são mais sensíveis e eficazes, além de possibilitar a posterior identificação do parasito. Estudos epidemiológicos e de interação ecológica entre parasito e o hospedeiro em animais de vida livre são importantes para a conservação das espécies e do entendimento da saúde ambiental do habitat. Desta forma, admite-se que serpentes *Boa constrictor* de vida livre são infectadas por parasitos do gênero *Hepatozoon*, em frequência maior que a encontrada em animais de cativeiro, bem como possivelmente albergam espécies de *Hepatozoon* nunca descritos para esta espécie, bem como há alterações hematológicas e de bioquímica clínica decorrentes da infecção.

## CAPÍTULO I

(Artigo a ser submetido ao periódico *International Journal For Parasitology: Parasites and Wildlife*, Qualis A2, Fator de Impacto JCR 2019 1,923)

**CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* spp.  
(APICOMPLEXA:HEPATOZOIDAE) EM *Boa constrictor*  
ORIUNDAS DE FRAGMENTOS PERIURBANOS DE MATA  
ATLÂNTICA NO NORDESTE BRASILEIRO**

**Gustavo M. Rodamilans<sup>a</sup>, Máisa S. Fonseca<sup>a</sup>, Flávia F. Aburjaile<sup>b</sup>, Clara C. Fernandez<sup>a</sup>, Ilka Biondi<sup>c</sup>, Rejâne M. Lira-da-Silva<sup>d</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>, Ricardo W. Portela<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100

<sup>b</sup> Laboratório de Genética Celular e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil, 31270-901

<sup>c</sup> Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia State, Brazil, 44036-960.

<sup>d</sup> Núcleo de Ofidiologia e Animais Peçonhentos da Bahia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, Brazil, 40170-290.

**Running Title:** *Hepatozoon* sp. in free living *Boa constrictor*

**\*Corresponding author:** LABIMUNO, Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100. E-mail: [rwportela@ufba.br](mailto:rwportela@ufba.br).

## RESUMO

O gênero *Hepatozoon* compreende hemoparasitos protozoários que atingem anfíbios, répteis, aves e mamíferos, sendo que em serpentes já foram descritas mais de 130 espécies. A forma gamonte deste parasito se aloja no eritrócito do réptil hospedeiro, podendo provocar alterações morfológicas na célula. A serpente *Boa constrictor* é comumente encontrada em fragmentos de floresta Mata Atlântica localizados em áreas periurbanas, porém são poucos os estudos sobre infecção por *Hepatozoon* em espécimes de vida livre. Com isso, o objetivo deste trabalho foi diagnosticar a infecção por *Hepatozoon* em serpentes *Boa constrictor* de vida livre resgatadas em áreas periurbanas, caracterizar os parasitos utilizando técnicas parasitológicas diretas e moleculares, bem como observar possíveis alterações morfológicas nos eritrócitos parasitados. Nos 52 animais pesquisados, foram encontrados gamontes nos eritrócitos de 48,1% (25/52), com média de parasitemia de 0,63%. Foi observado que parasitos encontrados em alguns animais alteravam a morfologia do eritrócito, deslocando o seu núcleo ou provocando perda de hemoglobina. Reações de PCR demonstraram positividade em 90,4% (47/52) das amostras, sendo que todas as amostras positivas em microscopia óptica também foram positivas nos PCRs. Em duas amostras, as sequências originadas se apresentaram filogeneticamente próximas a *Hepatozoon musa*, sendo assim o primeiro possível relato deste parasito em *Boa constrictor*. As sequências de outras três amostras originadas se apresentaram próximos a *Hepatozoon ameivae*. Cinco amostras apresentaram sequências fortemente próximas, formando um único subclado, sugerindo uma possível nova espécie de *Hepatozoon*.

**Palavras-chave:** Diagnóstico Molecular, Hemogregarinas, Ofídios, Hemoparasitos

## ABSTRACT

The genus *Hepatozoon* comprises protozoan hemoparasites that affect amphibians, reptiles, birds and mammals, and more than 130 species have been described in snakes. The gamont form of this parasite is found in the erythrocyte of the host reptile and can lead to morphological changes in the cell. The *Boa constrictor* snake is commonly found in Atlantic Forest fragments located in peri-urban areas, but there are few studies on *Hepatozoon* infection in free-living specimens. Thus, the objective of this work was to diagnose *Hepatozoon* infection in free-living *Boa constrictor* snakes rescued in peri-urban areas, to characterize the parasites using direct parasitological and molecular techniques, as well as to observe possible morphological changes in the parasitized erythrocytes. Of the 52 animals surveyed, 48.1% presented gamonts in their erythrocytes (25/52), with a mean parasitemia of 0.63%. It was observed that parasites found in some animals altered the morphology of the erythrocyte, displacing its nucleus or causing loss of hemoglobin. PCR showed positivity in 90.4% (47/52) of the snakes, and all samples positive in optical microscopy were also positive in PCRs. In two samples, the originated sequences were phylogenetically close to *Hepatozoon musa*, thus being the first possible report of this parasite in *Boa constrictor*. The sequences of three other samples originated were close to *Hepatozoon ameivae*. Five samples showed strongly close sequences, forming a single subclade, suggesting a possible new species of *Hepatozoon*.

**Keywords:** Molecular diagnosis, Hemogregarines, Ofidology, Hemoparasite

## 1. INTRODUÇÃO

Hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* são hemoparasitos intraeritrocitários e/ou intraleucocitários encontrados em anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Telford, 2009). Possuem ciclo de vida heteroxênico onde a fase de reprodução sexuada e esporogonia ocorrem no vetor invertebrado, e as fases de merogonia e gametogonia ocorrem no hospedeiro vertebrado (Wozniak et al., 1994). Em serpentes, já foram descritas mais de 130 espécies pertencentes ao gênero *Hepatozoon* (Úngari et al., 2018), os quais são transmitidos pela ingestão direta do vetor invertebrado ou pela predação do hospedeiro vertebrado paratênico (Smith, 1996; O'Dwyer et al., 2013). A transmissão vertical também já foi observada em serpentes (Lowichik e Yaeger, 1987; Kauffman et al., 2017). Embora mosquitos normalmente não façam parte da dieta das serpentes, estudos experimentais mostraram que estes animais podem se infectar ao ingerir mosquitos ou carrapatos infectados (Telford et al., 2008; Telford, 2010). Fonseca et al. (2020) observaram a presença de *Hepatozoon* na glândula salivar e no intestino de *Amblyomma rotundatum* que estavam parasitando *Boa constrictor* no Nordeste do Brasil.

Serpentes infectadas por *Hepatozoon* spp. normalmente não apresentam sinais clínicos, porém alguns espécimes podem apresentar perda de hemoglobina, hipertrofia eritrocitária, alterações na membrana do eritrócito, deslocamento do núcleo do eritrócito e anemia, provocando perda de peso, diminuição na reprodução e na taxa de crescimento (Wozniak et al., 1996; Madsen et al., 2005; Brown et al., 2006). No Brasil, é conhecida a infecção por *Hepatozoon* spp. em algumas espécies de serpentes de vida livre e cativeiro (Moço et al., 2002; O'Dwyer et al., 2004; Motta et al., 2011; Moço et al., 2012), sendo inclusive descritas novas espécies deste hemoparasito (O'Dwyer et al.,

2013; Borges Nojosa et al, 2017; Úngari et al, 2021). No entanto, poucos estudos relatam a infecção por *Hepatozoon* em serpentes *Boa constrictor*, principalmente de vida livre (Paperna e Lainson, 2004; Úngari et al., 2018; Calil et al., 2019).

A identificação da infecção por *Hepatozoon* em serpentes pode ser realizada através de análise de microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, permitindo também a caracterização morfológica e morfométrica do estágio gamonte do parasito. Porém, apenas análises morfológicas nem sempre são efetivas para diferenciar espécies, e trata-se de um método de baixas sensibilidade e reprodutibilidade (Telford, 2010; Harris et al., 2011). Além disso, o uso apenas da microscopia óptica pode gerar falsos negativos, pois infecções crônicas podem provocar baixas parasitemias (Maia et al., 2014). Desta forma, o uso de técnicas moleculares se mostrou mais sensível e eficaz para o diagnóstico e identificação destes parasitos (Calil et al., 2019).

Portanto, os objetivos deste trabalho foram identificar e quantificar a infecção por hemoparasitos do gênero *Hepatozoon* em serpentes da espécie *Boa constrictor* de vida livre e caracterizar morfológica e molecularmente os espécimes de *Hepatozoon* spp. detectados.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Animais estudados e aspectos éticos**

Foram obtidas amostras sanguíneas de 52 serpentes *Boa constrictor* de vida livre, resgatadas por instâncias governamentais no ano de 2018 em fragmentos periurbanos de Mata Atlântica das cidades do Salvador e Feira de Santana no Estado da Bahia, o mais populoso da região Nordeste do Brasil. Os animais resgatados eram encaminhados ao Setor de Animais Silvestres e Exóticos, Zoológico de Salvador ou ao Núcleo de Ofidiologia e Animais Peçonhentos da Bahia, localizados na cidade do

Salvador, ou ao Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, na cidade de Feira de Santana.

No momento do resgate dos animais, foi realizado exame clínico para detectar quaisquer sinais clínicos que pudessem indicar alguma enfermidade, biometria, pesagem e sexagem por médicos veterinários especializados em animais silvestres. A coleta de sangue de cada animal foi realizada pelo seio venoso paravertebral, sendo coletados 0,5 mL com anticoagulante EDTA para obtenção de DNA genômico e posterior análise molecular, e para confecção de esfregaços sanguíneos, os quais foram feitos imediatamente após a coleta para posterior análise microscópica.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (CEUA/UFBA 94/2018), pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO 63053-3) e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN A789EC8).

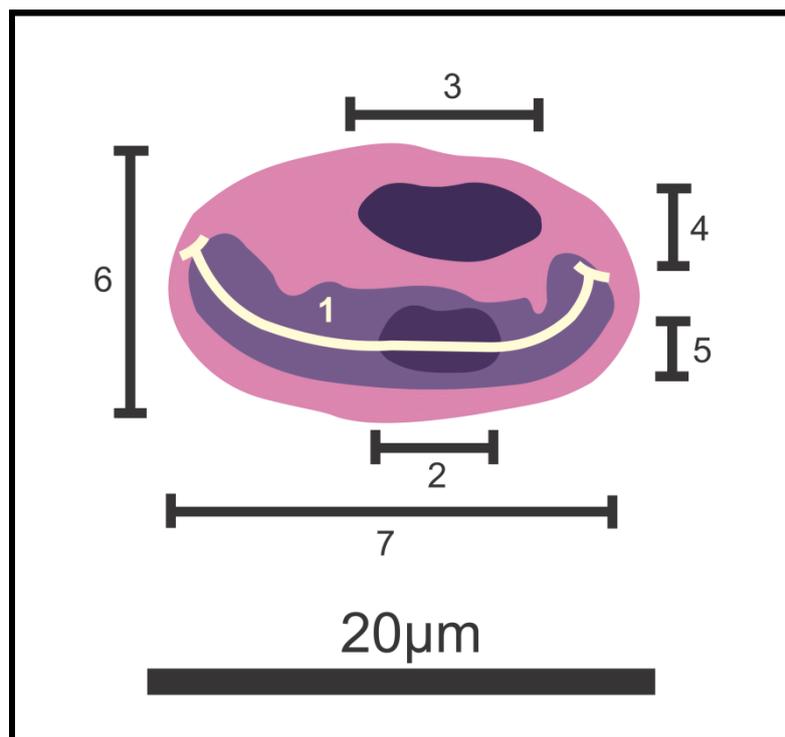
## **2.2 Análises Microscópicas**

Os esfregaços sanguíneos foram corados com corante May-Grunwald-Giemsa e examinados em microscópio óptico de luz com 1000x para presença de hepatozoídeos. Os animais foram considerados positivos na análise de microscopia óptica quando apresentavam gamontes nas hemácias do sangue periférico.

A parasitemia foi calculada como sugerido por Maia et al. (2014), contabilizando os eritrócitos infectados em um total de 4000 eritrócitos e em seguida determinando a porcentagem. Com o intuito de reduzir possíveis erros, as lâminas de espécimes infectados foram contadas três vezes e calculada então a média aritmética.

A morfometria dos eritrócitos foi realizada após os resultados de microscopia e PCR. Desta forma, as amostras foram selecionadas aleatoriamente por conveniência e

classificadas em três grupos de acordo com seus achados microscópicos e moleculares para comparar possíveis alterações morfométricas entre elas, sendo: Grupo 1 = amostras negativas na microscopia e no PCR ( $n = 5$ ); Grupo 2 = amostras negativas na microscopia e positivas no PCR ( $n = 6$ ); Grupo 3 = amostras positivas na microscopia e no PCR ( $n = 17$ ). Foram medidos: a área do núcleo, e o comprimento, largura e área do eritrócito. A morfometria dos gamontes foi realizada medindo o comprimento e largura tanto do parasito quanto do seu núcleo (**Figura 01**). Para essas análises, foi utilizado microscópio binocular (Nikon Eclipse, Nikon, Tokyo, Japão), aumento de 1000x, e com o programa NIS Elements versão 4.60 (Nikon).



**Figura 01: Esquemática dos parâmetros morfológicos de eritrócitos e de gamontes de *Hepatozoon* sp., como determinados nesse estudo.** 1- Comprimento do gamonte; 2- Comprimento do núcleo do gamonte; 3- Comprimento do núcleo do eritrócito; 4- Largura do eritrócito; 5- Largura do núcleo do gamonte; 6- Largura do eritrócito; 7- Comprimento do eritrócito.

Foram avaliadas também, possíveis interferências da presença do parasito no eritrócito infectado. Os eritrócitos eram considerados normais caso se apresentassem de

forma oval, com o núcleo centralizado e citoplasma rico em hemoglobina, permitindo delimitar a forma do eritrócito. Os eritrócitos infectados que apresentassem o seu núcleo deslocado pelo parasito, clareamento do citoplasma por perda da hemoglobina ou alteração morfológica eram então sinalizados.

### 2.3 Diagnóstico Molecular

Amostras de DNA genômico foram extraídas do sangue dos 52 animais utilizando o kit de extração PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas e analisadas com relação à sua pureza em aparelho Nanodrop (ThermoFisher Scientific).

Os ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados utilizando-se dois pares de iniciadores desenhados para amplificar regiões do gene da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU RNAr), específicos para o gênero *Hepatozoon*. O par de iniciadores senso HEP300 – 5'– GTTTCTGACCTAT CAGCTTTCGACG –3' e antissenso HEP900 – 5'– CAAATCTAAGAAT TTCACCTCTGAC –3' foram utilizados para amplificar uma região de 600pb do gene SSU RNAr de *Hepatozoon* sp. conforme descrito por Ujvari et al. (2004). Já o par de iniciadores senso HEMO1 – 5' – TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG – 3' e antissenso HEMO2 – 5' – CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC – 3' amplificam uma região de 1000pb do gene SSU RNAr de hemogregarinas (Perkins e Keller, 2001).

As reações foram realizadas utilizando o kit Go Taq G2 DNA Polymerase (Promega, Madison, WI) onde, para cada reação de volume final de 50 µL foram adicionados 50 ng de amostras de DNA genômico, 1,25 U de DNA polimerase, 1,5 mM

de  $MgCl_2$ , 200  $\mu M$  de cada nucleotídeo, 1  $\mu M$  de cada iniciador (senso e antissenso) e 5  $\mu L$  de tampão 5x colorless GoTaq (Promega). Para todas as reações foram utilizados controles positivo e negativo da reação, onde foram adicionados no lugar da amostra de DNA, respectivamente, uma alíquota de 50  $\mu g$  do DNA extraídos do sangue de uma serpente com alta parasitemia (controle positivo) e água livre de DNase e RNase (controle negativo). A reação de PCR foi realizada para os iniciadores HEP nas seguintes condições: a desnaturação inicial foi realizada à 95 °C por 5 minutos, seguidas por 40 ciclo de desnaturação à 95 °C por 30 segundos, anelamento à 60 °C por 30 segundos e extensão à 72 °C por 1 minuto, ao final foi realizada uma etapa de extensão final à 72 °C por 5 minutos. Para os iniciadores HEMO, as condições da reação de PCR foram as mesmas, exceto para o anelamento onde foi utilizada a temperatura de 50 °C. Após a PCR, foi realizada a corrida das amostras em gel de agarose 2 % preparado com tampão Tris-Borato EDTA 1x (TBE) e 4,5  $\mu L$  de brometo de etídeo 10 mg/mL (para 150 mL de gel), e os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese horizontal a 100 V. Para visualização das bandas, o gel foi submetido à luz ultravioleta em transluminador para visualização de possível amplificação.

#### **2.4 Sequenciamento e Análise Filogenética**

Para a identificação molecular, foram aleatoriamente analisadas 20 amostras positivas no PCR para os iniciadores HEP e HEMO (10 em que havia sido feita a morfometria dos parasitos e 10 em que não houve parasitemia detectável), que foram extraídas e purificadas utilizando-se o kit Pure Link Quick Gel Extraction (ThermoFisher Scientific), segundo informações fornecidas pelo fabricante, e o *amplicon* obtido com a purificação foi submetido ao sequenciamento. O sequenciamento foi realizado pela metodologia de Sanger em Sequenciador ABI 3730

DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Os resultados foram gerados em formato ABI, e a qualidade do sequenciamento analisada pelo software livre FinchTV, e a obtenção de seqüências consenso foi realizada no software livre Bioedit. As sequencias consenso foram submetidas à busca por similaridade utilizando a ferramenta BLAST / NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e acessando o GenBank/NCBI.

Em seguida, gerou-se um banco de dados com as seqüências obtidas pelo sequenciamento das amostras e pelas seqüências armazenadas no GenBank/NCBI para concatenação e alinhamento pelo MAFFT (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences) v. 7. Após o alinhamento foram geradas as árvores filogenéticas para as seqüências geradas pelos iniciadores HEP e HEMO, bem como uma outra árvore filogenética de Máxima Verossimilhança para comparar as seqüências do estudo com as seqüências do banco de dados do GenBank/NCBI.

## **2.5 Análises Estatísticas**

As variáveis morfométricas dos eritrócitos e dos gamontes coletados apresentaram distribuição livre no teste de D'Agostino-Pearson. Por conseguinte, foi realizado o teste de Kruskal -Wallis e o pós-teste de Dunn no *software* IBM SPSS v. 26 (IBM, AMonk, NY) para comparação da distribuição dos dados entre os grupos. A significância foi considerada quando  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Diagnóstico parasitológico direto e molecular

Ao investigar microscopicamente a presença de gamontes no sangue periférico das serpentes, foi encontrada frequência de 48,1% (25/52) de animais positivos, com média de parasitemia de 0,63%, valor máximo de 2,5% e mínimo de 0,03% de parasitemia.

Dos 52 animais analisados, 90,4% (47/52) foram positivos em PCR para um dos iniciadores utilizados, sendo que 7,7% (4/52) amostras amplificaram apenas para o *primer* HEMO. Não foram observadas amostras que amplificassem apenas ao *primer* HEP, como descrito na **Tabela 01**. Todas as amostras que amplificaram apenas para o *primer* HEMO (4/52) obtiveram resultado negativo para a observação de parasitos durante a microscopia óptica. Todas as amostras positivas na microscopia (25/52) obtiveram resultados positivos para a amplificação do *primer* HEP.

**Tabela 01. Número de amostras de *Boa constrictor* de vida livre que amplificaram aos iniciadores HEP e HEMO.**

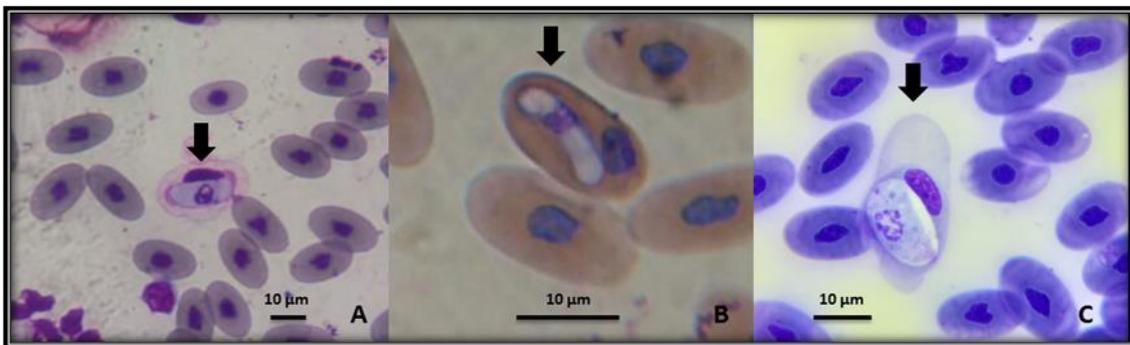
Resultado PCR	Número de amostras (%)
Não amplificou a nenhum iniciador	05 (9,61%)
Amplificou HEP e HEMO	43 (82,7%)
Amplificou somente HEMO	04 (7,69%)
Amplificou somente HEP	00 (0,00%)
<b>TOTAL</b>	<b>52 (100%)</b>

#### 3.2 Morfometria

Os resultados morfométricos dos três grupos são apresentados em medianas junto a seus respectivos valores mínimos e máximos (**Tabela 02**). As medianas dos eritrócitos não infectados diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos outros dois grupos para os parâmetros “comprimento”, “largura”, “área total” e “área do núcleo”.

Foi possível observar diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre os eritrócitos infectados e os não infectados do Grupo 03 para os parâmetros “comprimento”, “largura” e “área total”. A mensuração dos gamontes em 17 espécimes de *Boa constrictor* não apresentou diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para quaisquer dos parâmetros analisados (**Tabela 03**).

Em 100% (17/17) dos indivíduos analisados microscopicamente para morfologia das hemácias, observamos que os eritrócitos infectados apresentavam alterações morfológicas devido à presença do hemoparasito, bem como foi verificado o deslocamento do núcleo dos eritrócitos infectados em 76,47% (13/17). A perda da hemoglobina nos eritrócitos infectados foi observada em 35,29% das amostras (6/17) (**Tabela 04; Figura 02**).



**Figura 02: Influência do parasito na morfologia dos eritrócitos parasitados em serpentes *Boa constrictor* de vida livre. (A) eritrócito parasitado apresentando perda de hemoglobina; (B) eritrócito parasitado apresentando deslocamento do núcleo; (C) eritrócito parasitado apresentando alteração na morfologia e perda de hemoglobina. Barras de escala: 10µm. Coloração de May-Grunwald-Giemsa.**

**Tabela 02: Morfometria eritrocitária em serpentes *Boa constrictor* de vida livre, de acordo com seus diagnósticos microscópicos e moleculares de *Hepatozoon* sp.** Medianas, na mesma linha e seguidas por diferentes letras sobrescritas, não diferem pelo teste Kruskal -Wallis e o pós-teste de Dunn com  $P < 0,05$ . Para o grupo 1 foram analisadas 250 hemácias, 150 hemácias no Grupo 2 e 425 hemácias no Grupo 3.

	<b>GRUPO 1</b>	<b>GRUPO 2</b>	<b>GRUPO 3</b>	<b>Média e desvio padrão dos PCR Positivos (GRUPO 2 e 3)</b>	<b>Média e desvio padrão Geral</b>	<b>Valor <math>P^1</math></b>
	<b>Microscopia e PCR Negativos (n=5)</b>	<b>Microscopia Negativo e PCR Positivo (n= 6)</b>	<b>Microscopia e PCR Positivos (n=17)</b>			
	<b>Medianas com Valores Max e Min</b>	<b>Medianas com Valores Max e Min</b>	<b>Medianas com Valores Max e Min</b>			
Comprimento do Eritrócito não Infectado ( $\mu\text{m}$ )	20,55 (11,46 – 27,08)	19,64 (14,55 – 24,61)	17,71 (13,58 – 21,52)	18,67 ( $\pm$ 0,97)	19,3 ( $\pm$ 1,45)	$P < 0,000$
Comprimento do Eritrócito Infectado ( $\mu\text{m}$ )	Ausente	Ausente	20,80 (13,45 – 34,40)			
Largura do Eritrócito não Infectado ( $\mu\text{m}$ )	11,11 (8,16 -- 15,25)	10,86 (7,71 – 14,08)	10,08 (6,32 – 15,04)	10,47 ( $\pm$ 0,55)	10,68 ( $\pm$ 0,54)	$P < 0,000$
Largura do Eritrócito Infectado	Ausente	Ausente	11,54 (6,85 – 20,15)			
Área do Eritrócito não Infectado ( $\mu\text{m}^2$ )	182,81 (117,72 – 261,26)	168,51 (102,7 – 232,37)	153,02 (93,98 – 201,16)	160,77 ( $\pm$ 10,95)	168,11 ( $\pm$ 14,90)	$P < 0,000$
Área do Eritrócito Infectado ( $\mu\text{m}^2$ )	Ausente	Ausente	207,44 (76,87 – 586,19)			
Área do Núcleo não Infectado ( $\mu\text{m}^2$ )	22,65 <sup>g</sup> (10,07 – 45,84)	21,61 <sup>g</sup> (13,32 – 41,05)	21,45 <sup>g</sup> (5,47 – 43,69)	21,53 ( $\pm$ 0,11)	21,90 ( $\pm$ 0,65)	$P > 0,859$
Área do Núcleo Infectado	Ausente	Ausente	22,09 (9,52 – 56,5)			

**Tabela 03: Morfometria de *Hepatozoon spp.* infectando serpentes *Boa constrictor* de vida livre.** Esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio óptico com aumento de 1000x. Para cada amostra de cada animal, foram analisados 25 parasitos. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para cada parâmetro entre diferentes animais, usando o teste Kruskal -Wallis com  $P < 0,05$ .

Identificação dos espécimes (n=17)	Morfometria expressa em medianas com seus respectivos valores mínimos e máximos			
	Comprimento do parasito (µm)	Largura dos parasitos (µm)	Comprimento do núcleo do parasito (µm)	Largura do núcleo do parasito (µm)
<b>486</b>	12,97 (10,40 – 14,96)	3,54 (2,04 – 5,35)	5,17 (3,07 – 8,78)	1,62 (1,09 – 2,54)
<b>538</b>	16,57 (8,66 – 19,20)	3,78 (2,01 – 8,52)	4,78 (1,83 – 7,21)	2,37 (1,45 – 4,68)
<b>577</b>	13,09 (11,44 – 15,96)	4,02 (2,36 – 7,68)	5,21 (3,33 – 7,77)	1,80 (1,17 – 4,31)
<b>664</b>	12,98 (9,90 – 14,68)	3,57 (1,16 – 5,25)	4,43 (2,70 – 7,88)	1,36 (0,90 – 2,17)
<b>763</b>	14,75 (10,80 – 16,31)	2,71 (1,47 – 6,05)	4,47 (2,51 – 6,97)	1,83 (1,22 – 4,07)
<b>769</b>	14,11 (12,15 – 15,62)	3,49 (2,05 – 5,32)	4,03 (2,32 – 5,60)	2,16 (1,54 – 3,48)
<b>5902</b>	14,03 (11,61 – 16,58)	3,58 (1,16 – 6,74)	4,32 (2,59 – 6,08)	1,74 (1,05 – 3,62)
<b>5913</b>	14,04 (11,75 – 16,54)	3,64 (1,80 – 5,89)	3,96 (2,54 – 5,76)	2,17 (1,26 – 5,32)
<b>5924</b>	14,78 (13,66 – 17,13)	3,08 (1,78 – 5,40)	3,49 (2,76 – 6,84)	2,68 (1,94 – 3,68)
<b>5928</b>	13,49 (11,67 – 14,62)	3,96 (2,05 – 5,54)	4,04 (2,25 – 6,24)	2,12 (1,14 – 4,71)
<b>5934</b>	14,26 (12,07 – 16,12)	4,24 (2,69 – 5,46)	4,67 (2,95 – 5,98)	2,51 (1,55 – 4,26)
<b>5952</b>	14,85 (12,07 – 16,05)	2,51 (0,98 – 4,67)	4,17 (2,01 – 7,08)	1,72 (0,98 – 3,82)
<b>9413</b>	16,90 (11,91 – 22,55)	5,68 (2,45 – 10,4)	6,35 (4,02 – 15,72)	2,68 (1,41 – 4,71)
<b>9489</b>	12,24 (11,05 – 19,95)	4,04 (2,19 – 9,22)	6,48 (2,67 – 11,36)	2,71 (1,54 – 8,09)
<b>9490</b>	13,93 (11,77 – 15,58)	2,26 (0,98 – 4,83)	4,09 (2,46 – 5,62)	1,78 (0,98 – 2,90)
<b>9509</b>	16,63 (11,03 – 21,85)	6,87 (2,56 – 9,30)	4,50 (2,99 – 8,94)	4,15 (1,14 – 7,81)
<b>9653</b>	16,55 (11,74 – 18,82)	6,12 (2,70 – 11,20)	7,25 (2,52 – 11,34)	3,04 (1,02 – 6,48)
<b>Mediana Total</b>	14,06 (8,66 – 22,55)	3,78 (0,98 – 11,20)	4,45 (1,83 – 15,72)	2,16 (0,90 – 8,09)
<b>P</b>	0,1744	0,3256	0,1100	0,4798

**Tabela 04: Influência do *Hepatozoon spp.* na morfologia dos eritrócitos parasitados em serpentes *Boa constrictor* de vida livre.** Os esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio óptico com 1000x de aumento.

<b>Identificação dos espécimes (n=17)</b>	<b>Mudança na anatomia do eritrócito</b>	<b>Deslocamento do núcleo do eritrócito</b>	<b>Perda de hemoglobina</b>
486	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
538	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
577	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
664	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
763	<b>Presente</b>	Ausente	Ausente
769	<b>Presente</b>	Ausente	Ausente
5902	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
5913	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
5924	<b>Presente</b>	Ausente	Ausente
5928	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
5934	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
5952	<b>Presente</b>	Ausente	Ausente
9413	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
9489	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
9490	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	Ausente
9509	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
9653	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>
<b>TOTAL</b>	<b>17 (100%)</b>	<b>13 (76,47%)</b>	<b>6 (35,29%)</b>

### 3.3 Sequenciamento

Não houve consenso no sequenciamento para o *primer* HEMO em 10% das amostras (2/20), enquanto para o *primer* HEP não houve consenso em 25% (5/20).

Ao comparar o banco de dados formado pelas sequências consenso obtidas pelos *primers* HEMO e HEP com o banco de dados disponível no GenBank/NCBI, foi gerada uma tabela que consta como material suplementar deste manuscrito (MATERIAL SUPLEMENTAR 01). Nela, podemos observar que as amostras 538 e 9413 obtiveram porcentagens de homologia maiores que 99,63% com a espécie *Hepatozoon musa* para as sequências HEMO 9413, HEMO 538 e HEP 538. Observamos também, que apenas três únicas amostras (583, 666 e 769) tiveram suas sequências HEP com percentagem de homologia altas para a sequência de *Hepatozoon sp.* encontrado em *Boa constrictor*, depositada no GenBank/NCBI, sendo estes valores respectivamente de 99,26%; 99,81% e 99,81%. Estas mesmas amostras também obtiveram percentagem de homologia altas para a espécie *Hepatozoon ameivae* com respectivos valores de 99,07%; 99,63%; 99,61%.

Sete amostras (486, 664, 5924, 5928, 5934, 9653 e 9736) apresentaram uma característica peculiar, na qual não houve percentagem de homologia maior que 99% entre as sequências geradas pelo *primer* HEP e quaisquer outras sequências do banco de dados do GenBank/NCBI.

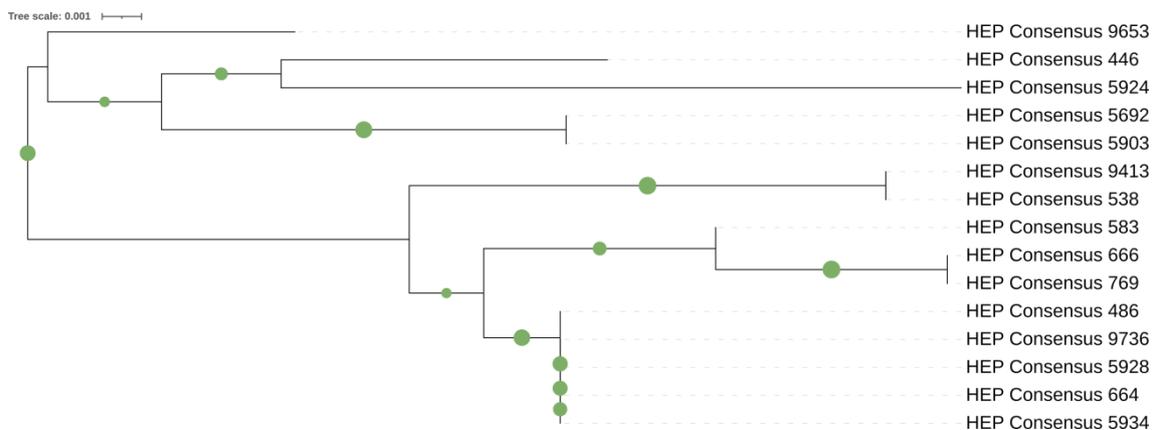
### 3.4 Análises filogenéticas

Analisando a árvore filogenética para as sequências consenso geradas pelo sequenciamento HEP (**Figura 03**), observamos a formação de dois clados, onde um subclado é formado pelas sequências HEP 9653, HEP 446, HEP 5924, HEP 5692 e HEP 5903, que ao serem analisadas juntos ao banco de dados do NCBI e confeccionada uma

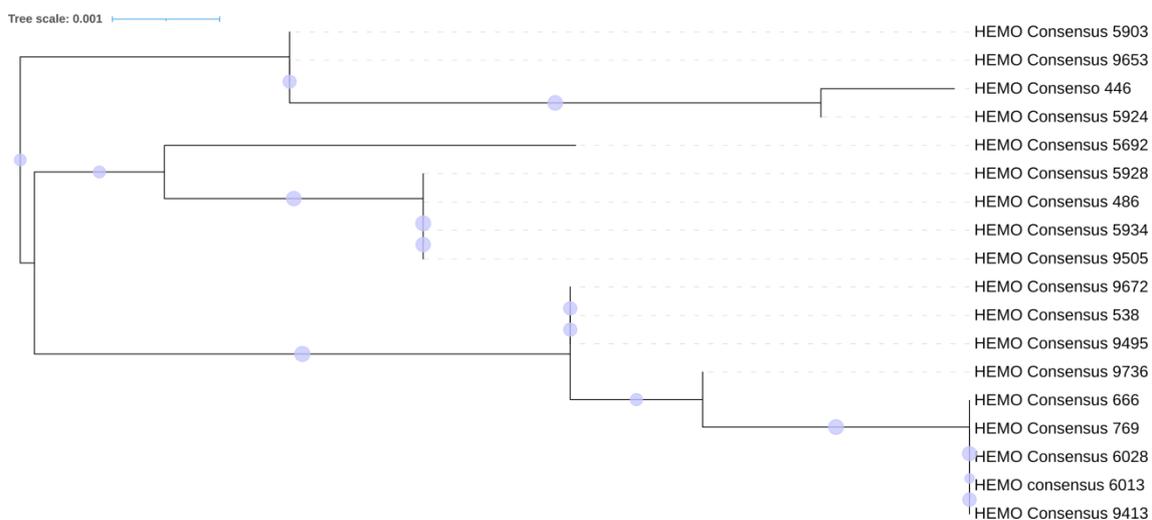
árvore filogenética de máxima verossimilhança (**Figura 05**), pôde-se observar que localizavam-se próximas às amostras HEMO, sendo possível sugerir que as mesmas são do gênero *Hepatozoon*. A sequência HEP 446 foi localizada em um mesmo subclado da árvore de máxima verossimilhança que a espécie *Hepatozoon fitzsimonsi*. O outro subclado da árvore filogenética das sequências HEP apresentam três distintos grupos formados por: grupo A (HEP 9413 e HEP 538), grupo B (HEP 583, HEP 666 e HEP 769) e grupo C (HEP 486, HEP 9736, HEP 5928, HEP 664 e HEP 5934).

O grupo A, quando analisado na árvore de máxima verossimilhança se posicionou no mesmo clado que sequências de *H. musa*, enquanto os grupos B e C se posicionaram em um clado distinto nesta mesma árvore. O grupo B se posicionou em um subclado junto a duas sequências de *H. ameivae* encontrado em lagartos *Ameiva ameiva* e a uma sequência de *Hepatozoon sp.* encontrado em serpente *Boa constrictor*, ambas no Brasil. O grupo C formou um subclado exclusivo, localizado entre subclados de isolados de animais da ordem Squamata. A aproximação evolutiva entre as sequências deste grupo, revelada na árvore com as sequências consenso HEP, sugere que podem representar uma única espécie de *Hepatozoon*.

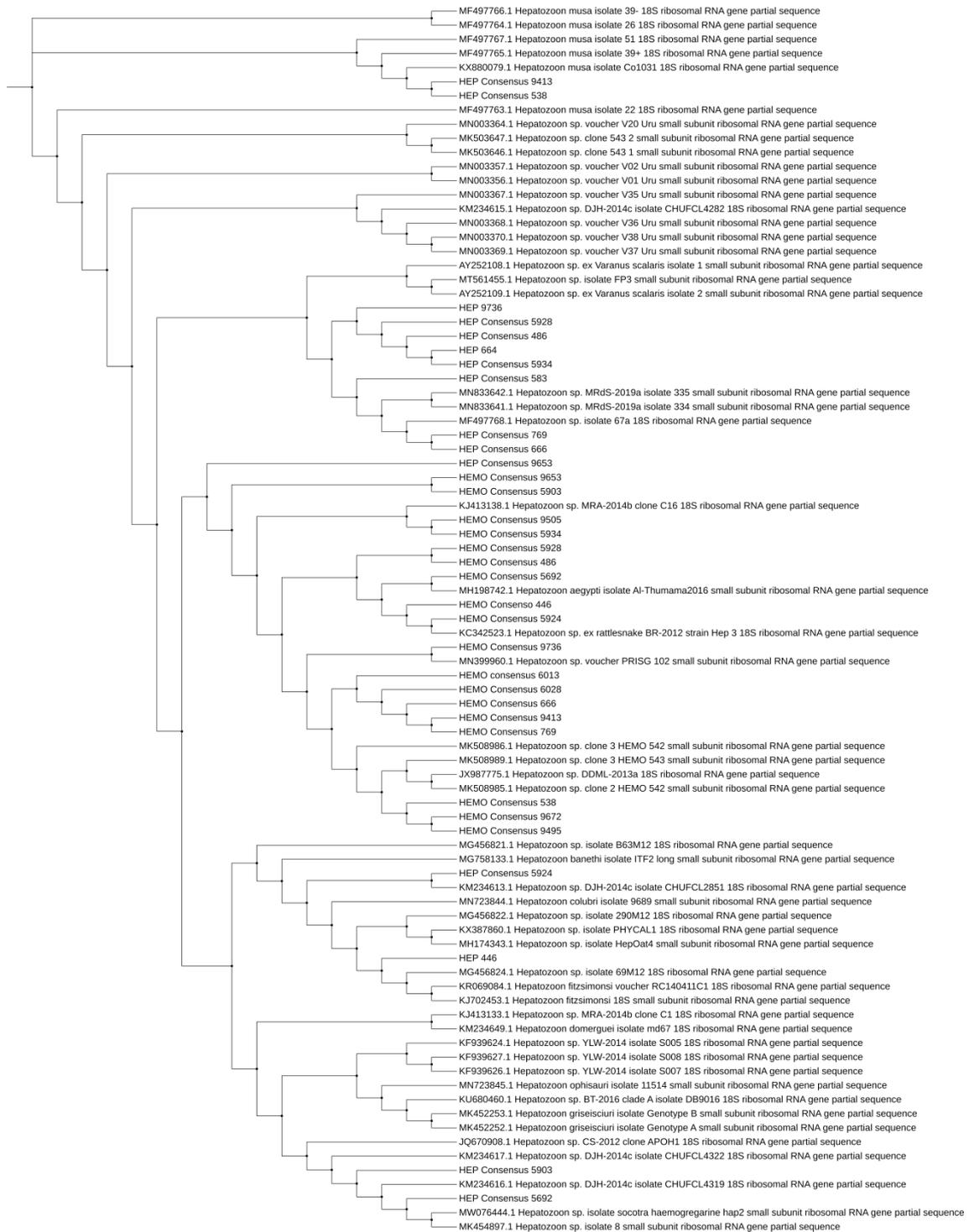
Ao analisar as árvores filogenéticas para as sequências consenso geradas pelo sequenciamento do *primer* HEMO (**Figura 04**) e a de máxima verossimilhança (**Figura 05**), observamos que ambos os cladogramas formados por estas sequências HEMO tendem a se aproximar de sequências do banco de dados identificados apenas em nível taxonômico de gênero, com exceção da sequência HEMO 5692 que se posicionou em um mesmo subclado que o *Hepatozoon aegypti* descrito em serpente *Spalerosophis diadema* na Arábia Saudita. As sequências HEMO 446 e HEMO 5924 se apresentaram em um subclado da árvore de máxima verossimilhança, junto com uma sequência de *Hepatozoon sp.* identificada em serpente *Crotalus durissus terrificus* no Brasil.



**Figura 03.** Árvore filogenética para as sequências consenso geradas pelo sequenciamento do iniciador HEP de amostras de *Boa constrictor* de vida livre.



**Figura 04:** Árvore filogenética para as sequências consenso geradas pelo sequenciamento do iniciador HEMO de amostras de *Boa constrictor* de vida livre.



**Figura 05: Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com sequências dos iniciadores HEP e HEMO e sequências do banco de dados do NCBI.**

#### 4. DISCUSSÃO

Hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* são descritos como os mais comuns hemoparasitos em serpentes (Úngari et al., 2018) e, embora muitas vezes os animais infectados não apresentem sinais clínicos, há relatos de serpentes com significativas parasitemias que desenvolveram patologias (Wozniak et al., 1996; Madsen *et al.*, 2005; Brown et al., 2006). Estudos em animais selvagens de vida livre são escassos, negligenciando a importância de informações sobre o hemoparasito e suas infecções no hospedeiro em condições naturais, em contraste com animais em cativeiro (Metzger et al., 2008; Calil et al., 2019). Desta forma investigações sobre a relação *Hepatozoon* sp. e serpentes de vida livre são importantes para que possamos analisar a frequência da infecção pelo parasito no ambiente selvagem, identificação correta da espécie, parasitemia dos animais e danos funcionais a célula infectada. Neste estudo foi possível diagnosticar microscopicamente e por PCR a infecção por *Hepatozoon* sp. em serpentes *Boa constrictor* de vida livre, estimar sua parasitemia, bem como possivelmente identificar as espécies de *Hepatozoon* encontradas.

Observamos que houve diferença entre a frequência da infecção por *Hepatozoon* sp. em *Boa constrictor* de vida livre nos diferentes métodos de diagnóstico utilizados, sendo encontrada frequência de 48,1% na microscopia óptica e de 90,4% (47/52) pelo método de PCR, indicando que o método de PCR é mais sensível e eficaz para o diagnóstico de *Hepatozoon* sp. Segundo Maia et al (2014), esta diferença pode ser justificada pela baixa presença de gamontes no sangue periférico dos répteis em casos de infecções crônicas, bem como devido à variação natural da parasitemia no ciclo da infecção, determinando falsos negativos ao diagnóstico microscópico. São raros os estudos que lancem mão do método de PCR para determinar a prevalência de infecções por *Hepatozoon* sp. em serpentes, sendo o PCR normalmente utilizado em amostras

positivas para a presença de gamontes na microscopia, para que seu produto seja sequenciado e identificada a espécie do hemoparasito. Calil et al (2019) pesquisaram pelo método de PCR a prevalência de *Hepatozoon* spp. em diferentes espécies de serpentes de cativeiro e recém resgatadas e encaminhadas a centros de pesquisa em São Paulo, Brasil, observando prevalência de 5,5% (6/110). Considerando apenas estudos com animais de vida livre, a frequência de 48,1% encontrada microscopicamente em nosso estudo foi maior do que encontrado por O'Dwyer et al. (2003), que identificaram 38,9% em serpentes *Boa constrictor amarali* recém capturadas e encaminhadas a centros de pesquisa no estado de São Paulo, Brasil. O'Dwyer et al. (2003) sugerem que diferenças entre prevalência da infecção podem ser influenciadas por características climáticas e abundância de vetores.

De Biase et al (1989) observaram que animais de vida livre tendem a ter uma prevalência maior para infecção por *Hepatozoon* sp. devido ao maior contato com carrapatos e mosquitos transmissores, bem como com presas hospedeiras intermediárias. A frequência encontrada na microscopia da infecção por *Hepatozoon* sp. em nosso estudo foi menor do que a encontrada por Lopes et al (2010) que observaram prevalência de 100% (7/7) em *Boa constrictor* de cativeiro no semiárido do Rio Grande do Norte. No entanto, foi maior do que encontrado por Ungari et al. (2018) e Calil et al. (2019) em *Boa constrictor* de cativeiro, ambos na região Sudeste do Brasil, com valores de 16,7% (4/24) e 18,2% (2/11), respectivamente. De Biase et al (1989) acreditam que a presença de animais em cativeiro infectados com *Hepatozoon* sp. pode estar relacionada à longevidade do parasito em seu hospedeiro e não por uma reinfecção. Por outro lado, Ungari et al (2018) sugerem que a gestão adequada da saúde contribui para a baixa prevalência de parasitos em cobras em cativeiro. Ainda não possuímos informações mais precisas que possam indicar qual ponto de vista estaria mais próximo da realidade.

Em nosso trabalho encontramos parasitemia mínima de 0,03% e máxima de 2,5%, porém, devido à ausência de pesquisas similares com *Boa constrictor* de vida livre, podemos comparar nossos resultados somente com pesquisas em serpentes de cativeiro. Normalmente são encontradas parasitemias que não ultrapassam 1% (Santos et al., 2005; Glaser et al., 2008; Calil et al., 2019), apesar de Lopes et al., (2010) terem encontrado parasitemia de 4,5% em uma espécime de *Boa constrictor* em cativeiro. Santos et al. (2005) acompanharam a parasitemia de serpentes de cativeiro infectadas por 2 anos e observaram que o *Hepatozoon* levou a infecções crônicas nos animais e que a parasitemia tende a oscilar, porém sempre havendo um decréscimo com o tempo após primeiro exame. É provável que o achado de parasitemias mais altas do que o relatado em cativeiro esteja relacionado com o fato de que as serpentes aqui analisadas eram de vida livre, e que se alimentavam de animais infestados com ectoparasitos infectados com o hemoparasito, o que não acontece normalmente em cativeiro. Ewing et al., (2003) sugerem que mesmo animais com parasitemias baixas demandam cuidados ao serem introduzidos em ambientes com outras serpentes, pois o vetor invertebrado se infecta mesmo quando infestando animais com baixas parasitemias.

Os resultados da morfometria dos eritrócitos não infectados apresentaram diferença estatística entre as medianas dos parâmetros “comprimento”, “largura” e “área do eritrócito” entre os três Grupos, sendo que o Grupo 1 obteve a maior mediana para estes parâmetros. Estes resultados nos fazem suspeitar que a presença de *Hepatozoon* sp., mesmo que na infecção crônica, estimule a hematopoese nas serpentes, seja por produção medular ou por mitoses eritrocitária, pois é sabido que as células jovens nesses animais são de menor tamanho, diferentemente dos mamíferos (Almosny, 2014). Gonzalez et al (2021) observaram que anfíbios parasitados tendiam a ter um maior número de eritrócitos jovens no sangue periférico, bem como a ocorrência de mitoses

nestas células. Madsen et al (2005) sugerem que uma das consequências fisiológicas possíveis pela infecção por *Hepatozoon* sp. seria justamente a redução na capacidade de carreamento do oxigênio pelo eritrócito e consequente liberação compensatória de eritrócitos jovens. A ausência de trabalhos similares, realizando a mensuração de animais infectados e não infectados confirmados por PCR, dificulta comparações.

Observamos que *Hepatozoon* sp. altera a morfologia do eritrócito infectado em *Boa constrictor* de vida livre, bem como pode haver a perda da hemoglobina destes eritrócitos provocada pelos gamontes. Madsen et al. (2005) observaram que serpentes infectadas por *Hepatozoon* sp. apresentaram diminuição do seu “*fitness*” e sugeriram que seja devido a alterações na morfologia, consumo da hemoglobina e diminuição da área livre para o carreamento do oxigênio pelo eritrócito infectado, bem como a presença de eritrócitos imaturos na circulação periférica. Em relação a característica de perda da hemoglobina do eritrócito, ao cruzarmos as informações dos espécimes que apresentavam esta característica junto com a posição na árvore filogenética de máxima verossimilhança, percebemos que estes espécimes podem ou não estar no mesmo sub Clado que outros espécimes que não apresentavam perda de hemoglobina, sugerindo assim que esta não é uma característica peculiar na diferenciação de uma espécie de *Hepatozoon*.

Nossos resultados de sequenciamento das amostras positivas dos *primers* HEMO e HEP sugerem que os hemoparasitos encontrados são realmente do gênero *Hepatozoon*, tendo indícios que duas amostras seriam da espécie *H. musa*. A espécie *H. musa* (KX 880079), foi descrita pela primeira vez por Borges-Nojosa et al. (2017) parasitando *Philodryas nattereri* no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Úngari et al., (2018) relataram pela primeira vez a infecção por *H. musa* em *Crotallus durissus* (MF 497763; MF 497764; MF 497765; 497766) e *Epicrates crassus* (MF 497767) no

estado de Minas Gerais, Brasil. A distribuição geográfica das serpentes *Boa constrictor* convergem com a distribuição das serpentes *P. nattereri*, *C. durissus* e *E. crassus* (Nogueira et al. 2020) bem como compartilham de alguns hábitos alimentares (Sant'Anna e Abe, 2007; Mesquita et al., 2011; Mesquita et al., 2013). Somada ainda a baixa especificidade ao hospedeiro relatada para este gênero de hemoparasito (Telford, 2009), torna-se plausível que *Boa constrictor* seja infectada por *H. musa*, sendo assim, o primeiro relato desta interação interespecífica. Outras três amostras obtiveram sequências pelo PCR utilizando *primers* HEP que apresentavam percentagem de homologia fortes (> 99%) com as sequências depositadas de *H. ameivae* (MN 833642; MN 833641) encontrados em lagartos *Ameiva ameiva*, e *Hepatozoon* sp. (MF497768) encontrado em *B. constrictor*, ambos no Brasil. Este resultado corroborou com o resultado da árvore filogenética de verossimilhança, onde as sequências destas amostras se apresentaram em um subclado mais fortemente ligados as sequências de *A. ameiva* e *Hepatozoon* sp. descritas acima. Picelli et al (2020) encontraram uma relação muito próxima entre as sequências de diferentes répteis, sugerindo que esta proximidade se deve a relação presa-predador entre o lagarto e a serpente, podendo o lagarto ser tanto um hospedeiro intermediário quanto um hospedeiro paratênico.

Cinco amostras originaram sequências no PCR com *primers* HEP que se apresentaram como um subclado específico na árvore filogenética de máxima verossimilhança, localizado entre outros subclados da ordem Squamata. Estas amostras não obtiveram percentagens de homologia maiores que 99% entre as sequências geradas pelo primer HEP e nenhuma das sequências disponíveis no GenBank/NCBI. Picelli et al (2020), comparando estudos e resultados filogenéticos de *Hepatozoon* sp., observaram que o gene 18S rRNA é um marcador de área conservada, sugerindo que diferenças maiores ou próximas a 1% podem ser consideradas para distinção entre espécies. Dessa

forma, é possível sugerir que estas amostras sejam potencialmente uma espécie de *Hepatozoon* ainda não descrita. Além disso, devido a forte aproximação entre as sequências observada na árvore filogenética HEP bem como seus resultados do sequenciamento, é possível que estas sequências sejam de uma mesma única espécie.

## **5. CONCLUSÃO**

Este trabalho observou, através de técnicas moleculares, uma alta prevalência de serpentes *Boa constrictor* de vida livre infectadas por *Hepatozoon* spp., ratificando a sensibilidade deste método para diagnóstico de infecções crônicas por este hemoparasito, bem como pôde apresentar pela primeira vez a infecção por *H. musa* nesses animais.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores são gratos a Francisca Soares (LABIMUNO-UFBA), Leane Gondim (SASE-UFBA) e Paulo Roberto Bahiano (Zoológico de Salvador - INEMA) pelo auxílio técnico.

## **FINANCIAMENTO**

Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX), através de recursos obtidos de forma contínua por projetos de extensão. GMR é bolsista de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). RMLS é bolsista de produtividade em pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ). RWP é bolsista produtividade em desenvolvimento tecnológico do CNPQ (Proc. 313350/2019-1). As agências de fomento

não tiveram nenhuma influência no desenvolvimento dos estudos e nos resultados aqui apresentados.

### **DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram que não possuem conflitos de interesses na publicação desse artigo. Declaram também que os financiadores não tiveram influência no design e realização do estudo, muito menos na análise de resultados e confecção desse manuscrito.

### **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

GMR e RWP participaram na concepção do estudo e desenho experimental. GMR, IB and RMLS realizaram o trabalho de campo. GMR, MSF, CCF realizaram o trabalho laboratorial. FFA conduziu as análises filogenéticas. GMR escreveu o manuscrito. RWP e RM revisaram criticamente o manuscrito. Todos os autores aprovaram o manuscrito final e sua submissão.

### **ASPECTOS ÉTICOS**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (CEUA/UFBA 94/2018), pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO 63053-3), e registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN A789EC8).

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Haleem, H.M., Mansour, L., Holal, M., Qasem, M.A.A., Al-Quraishy, S., Abdel-Baki, A.A.S., 2018. Molecular characterisation of *Hepatozoon aegypti* Bashtar, Boulos & Mehlhorn, 1984 parasitising the blood of *Spalerosophis diadema* (Serpentes: Colubridae). *Parasitol. Res.* 117, 3119–3125. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6006-4>
- Almosny N.R.P. 2014. Patologia clínica em vertebrados ectotérmicos, p.1597-1623. In: Cubas Z.S., Silva J.C.S. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. 2ª ed. Roca, São Paulo.
- Bashtar A-R, Boulos R, Mehlhorn H (1984) *Hepatozoon aegypti* nov. sp 1 Life cycle. *Z Parasitenkd.* 70, 29–41
- Borges-Nojosa, D.M., Borges-Leite, M.J., Maia, J.P., Zanchi-Silva, D., da Rocha Braga, R., Harris, D.J., 2017. A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adelerina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. *Syst. Parasitol.* 94, 65–72. <https://doi.org/10.1007/s11230-016-9676-2>
- Brown, G.P., Shilton, C.M., Shine, R., 2006. Do parasites matter? Assessing the fitness consequences of haemogregarine infection in snakes. *Can. J. Zool.* 84, 668–676. <https://doi.org/10.1139/Z06-044>
- Calil, P.R., Puerto, G., Dunn, J.C., Chagas, C.R.F., Ramos, P.L., 2019. Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp. In Brazilian snakes. *Amphib. Reptil.* 40, 337–347. <https://doi.org/10.1163/15685381-20191113>

Ewing, S.A., Panciera, R.J., Mathew, J.S., 2003. Persistence of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina) in a naturally infected dog. *J. Parasitol.* 89, 611–613. <https://doi.org/10.1645/GE-3138RN>

Fonseca, M.S., Bahiense, T.C., Silva, A.A.B., Onofrio, V.C., Barral, T.D., Souza, B.M.P., Lira-da-Silva, R.M., Biondi, I., Meyer, R., Portela, R.W., 2020. Ticks and Associated Pathogens From Rescued Wild Animals in Rainforest Fragments of Northeastern Brazil. *Front. Vet. Sci.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00177>

Glaser, V., Boni, A.P., Albuquerque, C.A.C., 2008. Ocorrência de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes do gênero *Bothrops* de cativeiro. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 60, 1288–1290. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000500040>

González, L.P., Vargas-León, C.M., Fuentes-Rodríguez, G.A., Calderón-Espinosa, M.L., & Matta, N.E. (2021). Do blood parasites increase immature erythrocytes and mitosis in amphibians? *Revista de Biología Tropical*, 69, 615-625. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.45459>

Harris, D.J., Maia, J.P.M.C., Perera, A., 2011. Molecular Characterization of *Hepatozoon* Species in Reptiles from the Seychelles. *J. Parasitol.* 97, 106–110. <https://doi.org/10.1645/ge-2470.1>

Kauffman, K.L., Sparkman, A., Bronikowski, A.M., Palacios, M.G., 2017. Vertical transmission of *Hepatozoon* in the garter snake *Thamnophis elegans*. *J. Wildl. Dis.* 53, 121–125. <https://doi.org/10.7589/2016-03-056>

Landis J.R., Koch G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33, 159-74.

Lopes, F.C., Azevedo, S.S., Dantas, L.A.B., Freitas, C.I.A., Batista, C.S.A., Azevedo, A.S., 2010. Ocorrência de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes captive *Boa constrictor* mantidas em cativeiro no semiárido do estado do Rio Grande do Norte. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec. 62, 1285–1287. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000500038>

Lowichik, A., Yaeger, R.G., 1987. Ecological Aspects of Snake Hemogregarine Infections from Two Habitats in Southeastern Louisiana. J. Parasitol. 73, 1109. <https://doi.org/10.2307/3282289>

Madsen, T., Ujvari, B., Olsson, M., 2005. Old pythons stay fit; effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. Oecologia 142, 407–412. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1742-9>

Maia, J.P., James Harris, D., Carranza, S., Gómez-Díaz, E., 2014. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of hemogregarine hemoparasites (apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. PLoS One 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095010>

Mesquita, P.C.M.D.; Borges-Nojosa, D.M.; Passos, D.C. e Bezerra, C.H. 2011. Ecology of *Philodryas nattereri* (Serpentes: Dipsadidae) in the Brazilian semi-arid region. Herpetological Journal, 21:193-198.

Mesquita, P.C.M.D., Passos, D.C., Borges-Nojosa, D.M., Cechin, S.Z., 2013. C.m.d. m. Pap. Avulsos Zool. 53, 99–113.

Metzger, B., Paduan, K. dos S., Rubini, A.S., Oliveira, T.G. de, Pereira, C., O'Dwyer, L.H., 2008. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. Vet. Parasitol. 152, 28–33.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.006>

Moço, T.C., O'Dwyer, L.H., Vilela, F.C., Barrella, T.H., Da Silva, R.J., 2002. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 1169–1176. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800019>

Moço, T.C., Da Silva, R.J., Madeira, N.G., Paduan, K.D.S., Rubini, A.S., Leal, D.D.M., O'Dwyer, L.H., 2012. Morphological, morphometric, and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisona durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). Parasitol. Res. 110, 1393–1401. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2639-2>

Motta, R.O.C., Cunha, L.M., Leite, R.C., da Silva, I.J., Pinto, A.C.A., Braga, É.M., da Cunha, A.P., de Oliveira, P.R., 2011. *Hepatozoon* ssp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) Infection and Selected Hematological Values of the Neotropical Rattlesnake, *Crotalus durissus collilineatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae), from Brazil . J. Zoo Wildl. Med. 42, 399–407. <https://doi.org/10.1638/2010-0209.1>

Nogueira, C.C., Argolo, A.J.S., Arzamendia, V., Azevedo, J.A., Barbo, F.E., Bérnils, R.S., Bolochio, B.E., Borges-Martins, M., Brasil-Godinho, M., Braz, H., Buononato, M.A., Cisneros-Heredia, D.F., Colli, G.R., Costa, H.C., Franco, F.L., Giraudo, A., Gonzalez, R.C., Guedes, T., Hoogmoed, M.S., Marques, O.A.V., Montingelli, G.G., Passos, P., Prudente, A.L.C., Rivas, G.A., Sanchez, P.M., Serrano, F.C., Silva JR, N.J., Strussmann, C., Vieira-Alencar, J.P.S., Zaher, H., Sawaya, R.J., Martins, M. 2019. Atlas of Brazilian Snakes: Verified Point-Locality Maps to Mitigate the Wallacean Shortfall in a Megadiverse Snake Fauna. South American Journal of Herpetology, v.1, p. 1-274. [doi.org/10.2994/SAJH-D-19-00120.1](https://doi.org/10.2994/SAJH-D-19-00120.1)

- O'Dwyer, L.H., Moço, T.C., Da Silva, R.J., 2004. Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Parasitol. Res.* 92, 110–112. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1005-4>
- O'Dwyer, L.H., Moço, T.C., Paduan, K. dos S., Spenassatto, C., da Silva, R.J., Ribolla, P.E.M., 2013. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Exp. Parasitol.* 135, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.06.019>
- Paperna, I., Lainson, R., 2004. *Hepatozoon cf. terzii* (Sambon & Seligman, 1907) infection in the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: Transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. *Parasite* 11, 175–181. <https://doi.org/10.1051/parasite/2004112175>
- Perkins, S.L., Keller, A.K., 2001. Phylogeny of Nuclear Small Subunit rRNA Genes of Hemogregarines Amplified with Specific Primers. *J. Parasitol.* 87, 870. <https://doi.org/10.2307/3285147>
- Sant'Anna, S.S., Abe, A.S., 2007. Diet of the rattlesnake *Crotalus durissus* in southeastern Brazil (Serpentes, Viperidae). *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 42, 169–174. <https://doi.org/10.1080/01650520601148313>
- Santos, M.M.V, O'Dwyer, L.H., Da Silva, R.J., 2005. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). *Parasitol. Res.* 97, 94–97. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1385-8>

Smith, T.G., 1996. The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J. Parasitol. 82, 565. <https://doi.org/10.2307/3283781>

Telford, S.R., Moler, P.E., Butler, J.F., 2008. *Hepatozoon* Species of the Timber Rattlesnake in Northern Florida: Description of a New Species, Evidence of Salivary Gland Oocysts, and a Natural Cross-Familial Transmission of an *Hepatozoon* Species. J. Parasitol. 94, 520–523. <https://doi.org/10.1645/ge-1330.1>

Telford, J.S.R., 2009. Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. CRC Press, Florida. 394pp. <https://doi.org/10.1201/9781420080414>

Telford, S.R., 2010. Three New *Hepatozoon* Species (Apicomplexa: Hepatozoidae) Infecting the Florida Kingsnake, *Lampropeltis getula floridana*. J. Parasitol. 96, 162–169. <https://doi.org/10.1645/ge-2161.1>

Ujvari, B., Madsen, T., Olsson, M., 2004. High Prevalence of *Hepatozoon* Spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) From Tropical Australia. J. Parasitol. 90, 670–672. <https://doi.org/10.1645/ge-204r>

Úngari, L.P., Santos, A.L.Q., O’Dwyer, L.H., da Silva, M.R.L., Rodrigues Santos, T.C., da Cunha, M.J.R., de Melo Costa Pinto, R., Cury, M.C., 2018. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. Parasitol. Res. 117, 3857–3865. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6092-3>

Úngari, L.P., Edward C. Netherlands, E.C., Alcantara, E.P., Enzo Emmerich, E., Silva, R.J., Lucia Helena O’Dwyer, L.H., 2021. Description of a New Species *Hepatozoon quagliattus* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting the Sleep

Snake, *Dipsas mikanii* (Squamata: Colubridae: Dipsadinae) from Goiás State, Brazil.

Acta Parasitologica. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00355-x>

Wozniak, E.J., McLaughlin, G.L., Telford Jr, S.R., 1994. Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert sidewinders (*Crotalus cerastes cerastes*). J. Zoo Wildl. Med. 25, 103–110.

Wozniak, E.J., Kazacos, K.R., Telford, S.R., McLaughlin, G.L., 1996. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. Int. J. Parasitol. 26, 141–146. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00110-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00110-7)

### Material Suplementar 01

Tabela 01: Análise das sequências de nucleotídeos de amplificadas de produtos de PCR utilizando os *primers* HEMO e HEP. Os amplificadas foram sequenciados por metodologia de Sanger, e as sequências submetidas a análise BLAST.

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 446	<i>Hepatozoon sp.</i>	KC342523.1	99.88%	<i>C. durissus terrificus</i> / Squamata	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456821.1	99.75%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	OAXACA / MÉXICO
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456824.1	99.75%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	DISTRITO FEDERAL / MÉXICO
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MH174343.1	99.63%	<i>O. atacamensis</i> / Ixodida	CHILE
	<i>H. colubri</i>	MN723844.1	99.51%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
HEP 446	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456824.1	100%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	DISTRITO FEDERAL / MÉXICO
	<i>H. colubri</i>	MN723844.1	99.89%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MH174343.1	99.89%	<i>O. atacamensis</i> / Ixodida	CHILE
	<i>H. fitzsimonsi</i>	KJ702453.1	99.81%	<i>C. angulata</i> / Jabuti	ÁFRICA DO SUL
	<i>H. fitzsimonsi</i>	KR069084.1	98.81%	<i>K. zombensis</i> / Testudinata	ÁFRICA DO SUL
HEMO 5692	<i>Hepatozoon sp.</i>	KU680460.1	99.88%	<i>T. deserti</i> / Squamata	MARROCOS
	<i>H. chinensis</i>	KF939627.1	99.88%	<i>E. carinata</i> / Squamata	SHANGAI / CHINA
	<i>H. chinensis</i>	KF939626.1	99.88%	<i>E. carinata</i> / Squamata	SHANGAI / CHINA
	<i>H. aegypti</i>	MH198742.1	99.88%	<i>S. diadema</i> / Squamata	ARABIA SAUDITA
	<i>H. chinensis</i>	KF939624.1	99.77%	<i>E. carinata</i> / Squamata	SHANGAI / CHINA
HEP 5692	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234617.1	100%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	PARAÍBA / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234616.1	100%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MW076444.1	100%	Repteis	SOCOTRA / YEMEN
	<i>H. ophisauri</i>	MN723845.1	94.54%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK454897.1	94.54%	<i>M. musculus</i> / Rodentia	CHILE

CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 5903	<i>H. ophisauri</i>	MN723845.1	100%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>H. griseisciuri</i>	MK452253.1	100%	<i>S. carolinensis</i> / Rodentia	ONTARIO / CANADÁ
	<i>H. griseisciuri</i>	MK452252.1	100%	<i>S. carolinensis</i> / Rodentia	ONTARIO / CANADÁ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003370.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003369.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
HEP 5903	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234617.1	100%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	PARAÍBA / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234616.1	100%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MW076444.1	100%	Repteis	SOCOTRA / YEMEN
	<i>H. ophisauri</i>	MN723845.1	99.75%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK454897.1	99.75%	<i>M. musculus</i> / Rodentia	CORRAL / CHILE
HEMO 5924	<i>Hepatozoon sp.</i>	KC342523.1	100%	<i>C. durissus terrificus</i> / Squamata	BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456821.1	99.88%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	OAXACA / MEXICO
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MH174343.1	99.75%	<i>O. atacamensis</i> / Ixodida	CHILE
	<i>H. colubri</i>	MN723844.1	99.63%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>H. banethi</i>	MG758133.1	99.63%	<i>I. tasmani</i> / Ixodida	TASMANIA / AUSTRALIA
HEP 5924	<i>H. colubri</i>	MN723844.1	98.68%	SEM INFORMAÇÃO	IRAN
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MH174343.1	98.11%	<i>O. atacamensis</i> / Ixodida	CHILE
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234613.1	97.92%	<i>P. pollicaris</i> / Squamata	PERNAMBUCO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456824.1	97.73%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	DISTRITO FEDERAL / MÉXICO
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KX387860.1	97.73%	<i>P. calcogaster</i> / Squamata	SEM INFORMAÇÃO

## CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 9653	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003370.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003369.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234615.1	100%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	CEARÁ / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456822.1	99.78%	<i>Sauromalus sp.</i> / Squamata	BAIXA CALIFÓRNIA / MEXICO
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456824.1	99.56%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	DISTRITO FEDERAL / MEXICO
HEP 9653	<i>H. colubri</i>	MN723844.1	98.70%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MH174343.1	98.52%	<i>O. atacamensis</i> / Ixodida	CHILE
	<i>H. ophisauri</i>	MN723845.1	98.33%	SEM INFORMAÇÃO	IRÃ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MG456824.1	98.33%	<i>C. pectinata</i> / Squamata	DISTRITO FEDERAL / MEXICO
HEMO 486	<i>H. chinensis</i>	KF939627.1	98.33%	<i>E. carinata</i> / Squamata	SHANGAI / CHINA
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003370.1	99.34%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003369.1	99.34%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003368.1	99.34%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. griseisciuri</i>	MK452252.1	99.20%	<i>S. carolinensis</i> / Rodentia	ONTARIO / CANADÁ
HEP 486	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003356.1	99.20%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	98.67%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	98.67%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.67%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497765.1	98.67%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497764.1	98.67%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL

## CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 664	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
HEP 664	<i>H. musa</i>	MF497765.1	99%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497766.1	98.63%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.63%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	98.63%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	98.63%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
HEMO 5928	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234615.1	99.39%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	CEARÁ / BRASIL
	<i>H. griseisciuri</i>	MK452252.1	99.27%	<i>S. carolinensis</i> / Rodentia	CANADÁ
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003370.1	99.27%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003369.1	99.27%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. caimani</i>	KJ413133.1	99.15%	<i>C. crocodilus yacare</i> / Crocodylia	MATO GROSSO / BRASIL
HEP 5928	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	98.66%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	98.66%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.66%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497766.1	98.66%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497765.1	98.66%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL

## CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 5934	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003370.1	99.10%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003369.1	99.10%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234615.1	99.10%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	CEARÁ / BRASIL
	<i>H. caimani</i>	KJ413138.1	99.10%	<i>C. crocodilus yacare</i> / Crocodylia	MATO GROSSO / BRASIL
	<i>H. caimani</i>	KJ413133.1	99.10%	<i>C. crocodilus yacare</i> / Crocodylia	MATO GROSSO / BRASIL
HEP 5934	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	98.75%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	98.75%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.54%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497766.1	98.54%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MT561455.1	98.54%	<i>H. angulatus</i> / Squamata	MACAPÁ / BRASIL
HEMO 9736	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	99.77%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	99.77%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	99.77%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN399960.1	99.54%	<i>A. lituratus</i> / Chiroptera	MATO GROSSO DO SUL / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508986.1	99.54%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
HEP 9736	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	98.69%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	98.69%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.69%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497765.1	98.69%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497763.1	98.69%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL

## CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 9413	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	99.63%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	99.63%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	99.63%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.51%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	JX987775.1	99.51%	<i>Leptodactylus spp.</i> / Anura	MATO GROSSO DO SUL / BRASIL
HEP 9413	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK503647.1	99.45%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK503646.1	99.45%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>H. ameiva</i>	MN833642.1	98.71%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameiva</i>	MN833641.1	98.71%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	AY252108.1	97.97%	<i>L. fuscus</i> / Squamata	AUSTRÁLIA
HEMO 538	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	100%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003357.1	99.87%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.62%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
HEP 538	<i>H. musa</i>	MF497767.1	99.82%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497765.1	99.82%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497763.1	99.82%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK503647.1	99.45%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK503646.1	99.45%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL

CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 583	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
HEP 583	<i>Hepatozoon sp.</i>	MF497768.1	99.26%	<i>B. constrictor</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	99.07%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	99.07%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	JQ670908.1	98.52%	<i>A. varanense</i> / Ixodida	TAILÂNDIA
	<i>Hepatozoon sp.</i>	AY252109.1	98.52%	<i>V. scalaris</i> / Squamata	AUSTRALIA
HEMO 666	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	99.64%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	99.64%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	99.64%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.52%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508985.1	99.52%	<i>L. latrans</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
HEP 666	<i>Hepatozoon sp.</i>	MF497768.1	99.81%	<i>B. constrictor</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	99.63%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	99.63%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.89%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497765.1	98.89%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL

CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 769	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	99.63%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	99.63%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	99.63%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.51%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508985.1	99.51%	<i>L. latrans</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
HEP 769	<i>Hepatozoon sp.</i>	MF497768.1	99.81%	<i>B. constrictor</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833642.1	99.61%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. ameivae</i>	MN833641.1	99.61%	<i>A. ameiva</i> / Squamata	AMAZONAS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497767.1	98.94%	<i>E. crassus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
	<i>H. musa</i>	MF497765.1	98.94%	<i>C. durissus</i> / Squamata	MINAS GERAIS / BRASIL
HEMO 9505	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003370.1	99.10%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003369.1	99.10%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	KM234615.1	99.10%	<i>H. mabouia</i> / Squamata	CEARÁ / BRASIL
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	98.88%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>H. domerguei</i>	KM234649.1	98.88%	<i>Furcifer sp.</i> / Squamata	MADAGASCAR
HEP 9505	<b>SEM CONSENSO</b>	XXX	XXX	XXX	XXX
	<b>SEM CONSENSO</b>	XXX	XXX	XXX	XXX
	<b>SEM CONSENSO</b>	XXX	XXX	XXX	XXX
	<b>SEM CONSENSO</b>	XXX	XXX	XXX	XXX
	<b>SEM CONSENSO</b>	XXX	XXX	XXX	XXX

CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 9672	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	100%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003357.1	99.88%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.63%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
HEP 9672	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
HEMO 9495	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	100%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	100%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003357.1	99.87%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.62%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	JX987775.1	99.62%	<i>Leptodactylus spp.</i> / Anura	MATO GROSSO DO SUL / BRASIL
HEP 9495	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX

CONTINUAÇÃO TABELA 01

AMOSTRA	ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO GenBank/NCBI	% DE SIMILARIDADE	HOSPEDEIRO / ORDEM TAXONÔMICA	LOCALIDADE
HEMO 6028	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	99.63%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	99.63%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	99.63%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.51%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	JX987775.1	99.51%	<i>Leptodactylus spp.</i> / Anura	MATO GROSSO DO SUL / BRASIL
HEP 6028	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
HEMO 6013	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003367.1	99.58%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MN003364.1	99.58%	<i>P. patagoniensis</i> / Squamata	URUGUAI
	<i>H. musa</i>	KX880079.1	99.58%	<i>P. nattereri</i> / Squamata	RIO GND DO NORTE/ BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	MK508989.1	99.45%	<i>R. diptycha</i> / Anura	SÃO PAULO / BRASIL
	<i>Hepatozoon sp.</i>	JX987775.1	99.45%	<i>Leptodactylus spp.</i> / Anura	MATO GROSSO DO SUL / BRASIL
HEP 6013	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX
	SEM CONSENSO	XXX	XXX	XXX	XXX

## CAPÍTULO II

(Artigo a ser submetido ao periódico *Frontiers in Veterinary Science*, Qualis A2, Fator de Impacto JCR 2019 2,245)

**INFECTION BY *Hepatozoon* spp. IN FREE-LIVING *Boa constrictor*:**

**CLINICAL BIOCHEMISTRY AND HEMATOLOGICAL**

**PARAMETERS**

**Gustavo M. Rodamilans<sup>a</sup>, Marcos A. Mendonça<sup>a</sup>, Maísa S. Fonseca<sup>a</sup>, Clara C. Fernandez<sup>a</sup>, Ludmila R. Moroz<sup>b</sup>, Ilka Biondi<sup>c</sup>, Rejâne M. Lira-da-Silva<sup>d</sup>, Maria Consuelo Ayres<sup>b</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>, Ricardo W. Portela<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100

<sup>b</sup> Hospital Veterinário, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, Brazil, 40170-110

<sup>c</sup> Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia State, Brazil, 44036-960.

<sup>d</sup> Núcleo de Ofidiologia e Animais Peçonhentos da Bahia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, Brazil, 40170-290.

**Running Title:** *Hepatozoon* infection in *Boa constrictor*

**\*Corresponding author:** LABIMUNO, Instituto de Ciências da Saúde – UFBA, Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100. E-mail: [rportela@ufba.br](mailto:rportela@ufba.br).

### Abstract

The *Hepatozoon* genus comprises more than 130 species of hemoparasites, and many of them infect snakes. Although this infection does not normally lead to apparent clinical symptoms, alterations such as anemia, decreased growth and decreased reproductive rate, among others, have already been described. *Boa constrictor* is one of the species of snake most bred as a companion animal and one of the most affected by wild animal trafficking. The aim of this study was to observe possible hematological and biochemical changes caused by the infection by *Hepatozoon* sp. in free-ranging *Boa constrictor*. Fifty-two *Boa constrictors* had blood samples collected, which were subjected to direct parasitological and molecular diagnosis to identify the infection by the hemoparasite, as well as hematological and serum biochemical analyzes. No significant differences were found ( $P < 0.05$ ) between infected and uninfected animals for the hematological and biochemical values analyzed. A significant difference ( $P < 0.05$ ) was observed in the heterophile values between juvenile and adult animals. We observed that there is a negative correlation between serum CK concentration and the level of parasitemia, as well as a positive correlation between condition factor and the serum iron concentration. This work adds information about the hematology and the serum biochemistry of free-ranging *Boa constrictor* and can support professionals of the One Health area and in the clinic of exotic and wild animals.

**Keywords:** Boidae, clinical pathology, Hemogregarines, Hematology

## INTRODUCTION

The genus *Hepatozoon* comprises hemoparasites that affect snakes (1), with more than 130 species affecting these animals (2). The transmission occurs by the accidental ingestion of the vector or by the predation of the primary vertebrate host (3-6), although vertical transmission has also been observed (7, 8).

Snakes usually present chronic infections with this hemoparasite, characterized by variations in parasitemia, which can persist throughout the life of the host (9). Normally, there is no development of clinical symptoms in infected snakes, despite reports of increased infant mortality, influence on growth, or even cases of hemolytic anemia in animals with high parasitemia (1, 10). In infected animals, erythrocytes are parasitized by the gamonte stage of the hemoparasite, which can be observed in blood smears. In these cases, some specimens may show loss of hemoglobin, erythrocyte hypertrophy, changes in the erythrocyte membrane and displacement of the nucleus (11). In Brazil, it was already described the infection with *Hepatozoon* spp. in some species of free-living and captive snakes (12–15), including new species of this hemoparasite (6).

*Boa constrictor* snakes (LINNAEUS, 1758) have a wide distribution in the Americas, being commonly found in peri-urban areas (16). Pinto-Coelho et al (17) investigated the records of the occurrence of *Boa constrictor* in the state of Bahia, Brazil, noting that this species is distributed in 08 of the 09 ecoregions of this state, including records in peri urban regions of cities with high human occupation. These snakes usually feed on small mammals, lizards, amphibians and birds (18, 19). Alves et al. (19) reported that it is the species of snake of the Brazilian fauna with a greater number of individuals bred as companion animals.

The few studies that report the infection with *Hepatozoon* spp. in *Boa constrictor* snakes (2, 20, 21) investigated only the prevalence and morphological characteristics of the parasites, and there are no studies that relate hematological and biochemical parameters in free-living *Boa constrictor* infected by *Hepatozoon* spp. Hematological and biochemical tests provide support for interpretations of animal health, even in those that do not have clinical symptoms. In addition, reference values are necessary to represent the population of the studied species, especially reptiles. (22, 23).

Thus, the objectives of this work were to evaluate possible influences of *Hepatozoon* spp. infection on the hematological and serum biochemistry parameters of free-living *Boa constrictor* snakes, and to establish reference values for the species in northeastern Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Animals and ethical aspects**

Blood samples were obtained from 52 free-living *Boa constrictor* snakes, rescued by the Environmental Police in fragments of the Atlantic Rainforest near urban or peri-urban areas in the state of Bahia, the most populous of the Brazilian northeast region. The rescued animals were sent to the Wild Animals Sector or to the Center for Ophiology and Venomous Animals of Bahia, both located at the Federal University of Bahia, in the city of Salvador, or to the Laboratory of Venomous Animals and Herpetology at the State University of Feira de Santana, in the city of Feira de Santana.

At the time of animal rescue, a clinical examination was carried out to assess the presence of skin lesions, the integrity of scales, the presence of ectoparasites, possible presence of traumatic lesions, and an analysis of the oral cavity, as well as the

measurement of the total length, weighing and sexing by a veterinarian doctor specializing in wild animals, with the aim of detecting any clinical signs that could indicate the presence of diseases. After sexing and biometrics, the animals were categorized as adult males as those with a total length of 1.59 meters or more, and adult females those with a total length of 1.67 meters (24). Then, the condition factor was calculated considering the formula  $\text{weight} / \text{length}^2$ , as described by Falk et al (25) for snakes of the *Python bivittatus* species.

The blood collection of each animal was carried out through the paravertebral venous sinus, with 0.5 ml of anticoagulant being collected to perform a complete blood count, leukogram and genomic DNA obtaining, and 4.0 ml of blood without anticoagulant to obtain serum and posterior biochemical analyzes. Blood smears were prepared immediately for further microscopic analysis.

This project was approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals in Experimentation of the School of Veterinary Medicine of the Federal University of Bahia (CEUA/UFBA 94/2018). In addition, it was obtained approvals by the Brazilian Federal Environmental Organs, such as the National System for Authorization and Information in Biodiversity (SISBIO 63053-3) and the National System for Genetic Resources Management (SISGEN A789EC8).

## **2.2 Diagnosis of the infection by *Hepatozoon* spp.**

The blood smears were stained using the May-Grunwald-Giemsa staining method and observed under an optical microscope with 1000x magnification. The animals were considered positive in this analysis when they presented gamonts in the peripheral blood erythrocytes. The intensity of the parasitemia was calculated as suggested by Maia et al. (26), counting the percentage of infected erythrocytes in a total

of 4000 analyzed erythrocytes. With the objective to reduce possible errors, the blood slides of each animal were counted three times and then the arithmetic mean was calculated.

The molecular diagnosis was performed using genomic DNA samples from the blood of the 52 animals, obtained using the PureLink Genomic DNA Mini Kit extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), according to the manufacturer's instructions. The DNA samples were quantified and analyzed for purity using a Nanodrop device (ThermoFisher Scientific). The polymerase chain reaction (PCR) assays were performed using two pairs of primers designed to amplify regions of the ribosomal RNA minor subunit gene (SSU RNAr). The sense primer HEP300 - 5'-GTTTCTGACCTAT CAGCTTTCGACG -3' and the antisense primer HEP900 - 5'-CAAATCTAAGAAT TTCACCTCTGAC -3' were used to amplify a 600bp region of the SSU RNAr gene from *Hepatozoon* sp. as described by Ujvari et al. (27). The sense primer HEMO1 - 5' - TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG - 3' and antisense primer HEMO2 - 5' - CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTCAC - 3' amplify a region of 1000 bp of the SSU RNAr gene of Hemogregarines (28).

The PCRs were carried out in a final volume of 50  $\mu$ L, where it was added 50 ng of genomic DNA, 1.25 U of Go Taq G2 DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of dNTP nucleotides, 1  $\mu$ M of each primer (sense and antisense) and 5  $\mu$ L of 5x colorless GoTaq buffer (Promega). For all reactions, positive and negative reaction controls were performed, using 50  $\mu$ g of DNA extracted from the blood of a snake with high parasitemia and previously confirmed as infected by *Hepatozoon* spp. through nucleotide sequencing (positive control), or DNase and RNase-free water. The PCR reaction was performed for the HEP primers under the following conditions: the initial denaturation was carried out at 95  $^{\circ}$ C for 5 minutes,

followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 60 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 1 minute, and a final extension step at 72 °C for 5 minutes. For the HEMO primers, the conditions of the PCR reaction were the same, except for the annealing step, where the temperature of 50 °C was used. After the PCR, the samples were run on a 2% agarose gel prepared with 1x Tris-Borate EDTA buffer (TBE) and 4.5 µL of ethidium bromide 10 mg/mL (for a total of 150 mL of gel), and the PCR products were then subjected to horizontal electrophoresis at 100 V. The gel was under an ultraviolet light for the visualization of possible amplifications.

### **2.3 Hemograms**

Samples of whole blood collected from the snakes were used in the erythrogram and leukogram analysis. The samples were diluted in Natt-Herrick's solution (1: 100µL) and subsequently counted in a Neubauer chamber, as described by Almosny (29), and their results were expressed as erythrocytes  $\times 10^3/\mu\text{L}$ . The determination of the globular volume was performed using the microhematocrit technique, with the results expressed as a percentage, thus making it possible to calculate the hematimetric indices of mean globular volume and the mean globular hemoglobin concentration, following the methodology described by Almosny (29).

The differential leukogram was performed by reading blood smears stained with May-Grunwald-Giemsa-Wright and analyzed under an optical microscope with a 1000x magnification. From the count, the absolute quantity of each cell category was calculated, based on the total leukogram value, applying the formula: total leukocyte value (cells / µL)  $\times$  leukocyte count by category (%) / 100 = absolute value of each category (cells / µL) (30).

## 2.4 Clinical biochemistry assays

For the analysis of the clinical biochemical components, commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, Brazil) were used for the determination of the serum concentration of uric acid, albumin, AST, calcium, cholesterol, creatine kinase, iron, glucose, total proteins, triglycerides and urea. The dosages were performed according to the specifications of each kit and in duplicate, using a semi-automatic biochemical analyzer (BS 250, BioPlus, Barueri, Brazil).

## 2.5 Statistical analysis

The hematological and biochemical data were submitted to the D'Agostino-Pearson test, where it was found that they did not presented a normal distribution. The Mann-Whitney non-parametric statistical test was used to assess the relationship between blood parameter data and the groups: (i) infected or not infected by *Hepatozoon*; (ii) sex; and (iii) life stage, and a statistically significant difference was considered when  $P < 0.05$ . This same test was carried out to evaluate the relationship between the values of the condition factor and parasitemia within these same three groups. To check if there is an association between blood parameters and the level of parasitemia and the condition factor, the Spearman's correlation test was used, and significance was declared when  $P < 0.05$ . The Kruskal-Wallis test was used to verify the relationship between blood findings and the three different groups related to the diagnosis of *Hepatozoon* spp., being (i) positive under microscopy and PCR; (ii) positive only for PCR; and (iii) PCR negative, being considered a statistically significant difference when  $P < 0.05$ . The statistical analysis described herein were conducted using the software SPSS v. 22.0 (IBM, Amonk, NY).

### 3 Results

#### 3.1 Clinical exam

After clinical evaluation, biometrics and sexing of the animals, it was possible to notice that no animal presented any apparent clinical symptom in the clinical examination, being thus considered healthy animals. The results of the biometrics and the condition factor are shown in **Table 01**. It was also observed that 21.15% (11/52) of the animals had small amounts of ectoparasites (maximum of 3 ticks / animal).

**Table 01. Biometric and condition factor analysis of free-living *Boa constrictor*.** It was analyzed 52 animals.

	Minimum Value	25% Percentile	Median	75% Percentile	Maximum Value
<b>Length (cm)</b>	95	131	159	181	249
<b>Weight (Kg)</b>	0.52	1.33	2.22	3.71	10.00
<b>Condition factor</b>	0.0430	0.0736	0.0888	0.1164	0.2413

The classification of animals according to sex and life stage are shown in Table 02 along with their respective confidence intervals. There was 28 juvenile animals and 24 adult animals. There was no statistically significant difference between the medians of the animals' length and weight when related to sex or life stage ( $P < 0.05$ ).

**Table 02. Absolute and relative frequencies of the free-living *Boa constrictor* included in this study, according to sex and life stage (n=52).** CI – confidence interval (95%).

Parameter	Absolute Frequency	Relative Frequency (%)	CI (95%)
<b>Females</b>	27	51.92	38.65 – 64.93
<b>Males</b>	25	48.08	35.06 – 61.37
<b>Juveniles</b>	28	53.85	40.45 – 66.70
<b>Adults</b>	24	46.15	33.30 – 59.55

### 3.2 Diagnosis of the infection by *Hepatozoon* spp.

The animals considered positive for the infection by *Hepatozoon* spp. were all those that presented positive amplification at the PCRs using the Hep and/or Hemo primers (47/52). In animals that were positive only by microscopy (25/47), it was possible to detect the parasitemia by counting the number of erythrocytes infected by *Hepatozoon* spp. in the total of 4,000 erythrocytes, where it was observed the median of 0.30%, the 25th percentile of 0.23% and the 75th percentile of 1.23%, and minimum values of 0.03% and maximum of 1.65% respectively.

### 3.3 Hematology

When comparing the results of the hematological parameters of animals infected with *Hepatozoon* spp. with the results of uninfected animals, it was not possible to observe a statistically significant difference at  $P < 0.05$  (**Figure 01**) for any of the analyzed parameters. It is presented the hematological parameters in **Table 03**, with their respective medians, percentiles and minimum and maximum limits, and without distinction as to whether they were infected or not with *Hepatozoon* spp., as a reflection of these values in the total population.

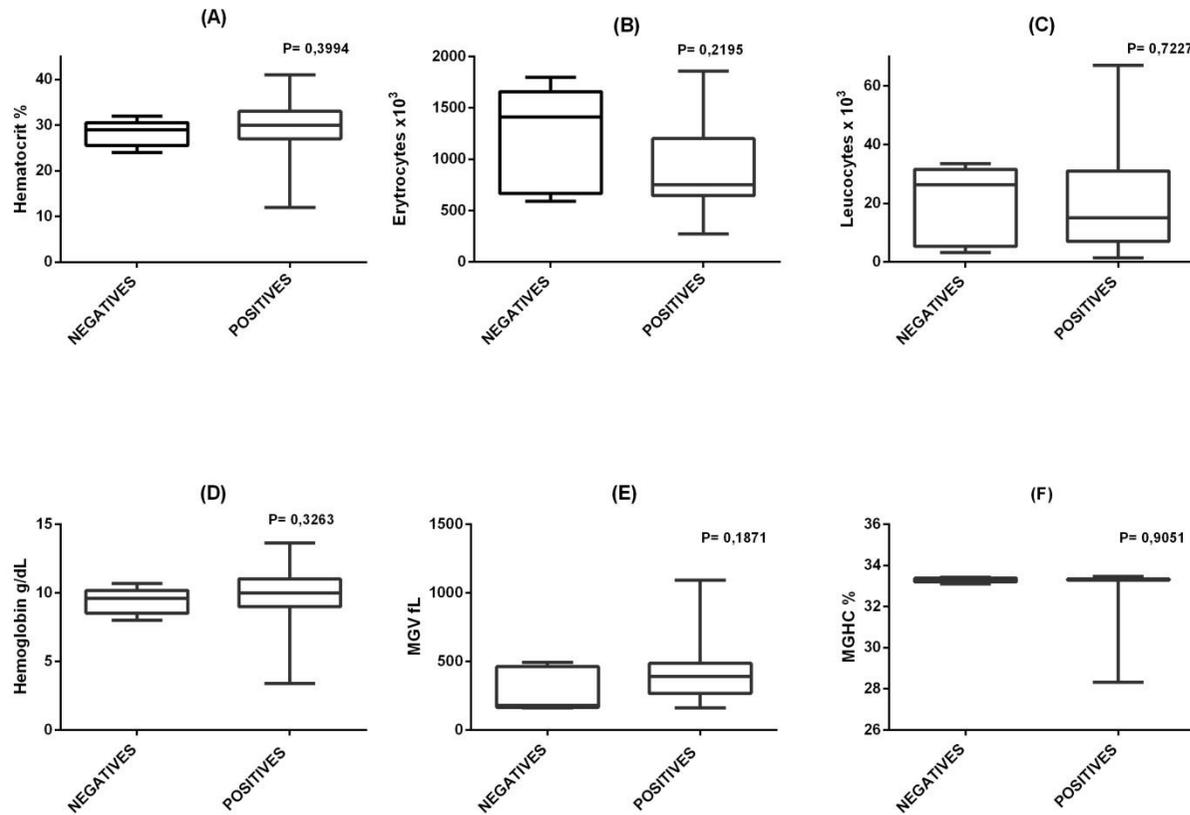
When the animals were classified according to their stage of life (juvenile and adult), a statistically significant difference ( $P = 0.0288$ ) was observed between the medians of heterophiles percentages (**Figure 02**), where the juveniles had a higher median value. It was not possible to observe a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between hematological values in males and females. Eosinophils and basophils were identified in only 19.23% (10/52) and 15.38% (08/52) of the animals, respectively, always in numbers greater than 04 per animal. According to the Mukaka's classification (31), a weak positive association was observed ( $r = 0.2886$ ;  $P = 0.0379$ ) between

condition factor and erythrocyte count (**Figure 03**). A female juvenile presented a hematocrit result of 12%, which indicates anemia.

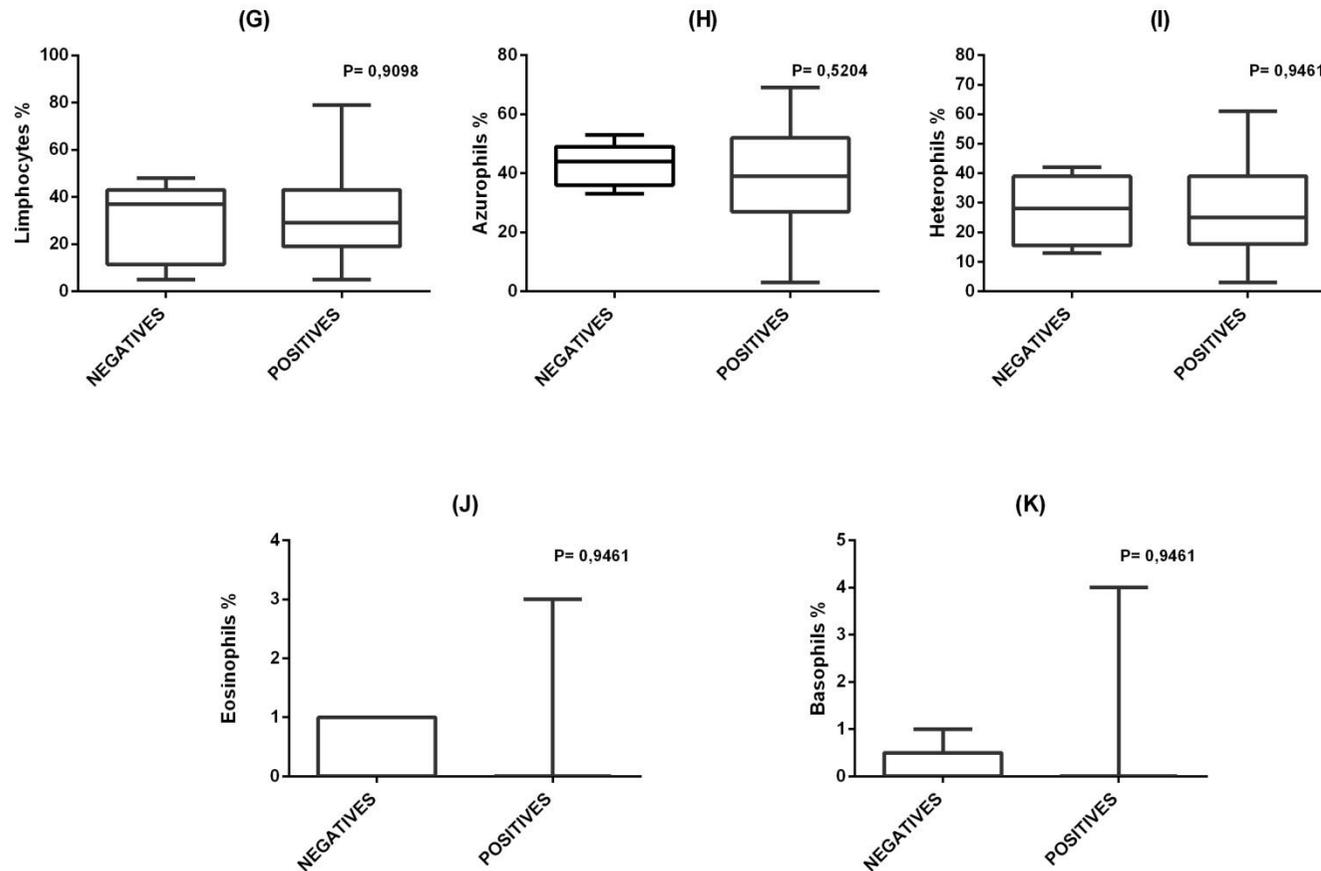
### 3.4 Clinical biochemistry

The mean values found in the serum biochemistry analysis in *Hepatozoon* spp. infected and non-infected animals presented no statistically significant difference ( $P < 0.05$ ), as it can be seen in **Table 04**. A weak negative association was observed ( $r = -0.4138$ ;  $P = 0.0023$ ) between creatinine kinase serum concentration and parasitemia levels (**Figure 04**), as well as it was possible to observe a weak positive association ( $r = 0.3431$ ;  $P = 0.0127$ ) between the iron serum concentration and condition factor (**Figure 05**), both for  $P < 0.05$ . The same female juvenile that presented lower hematocrit levels also had low levels of aspartate aminotransferase (5.23 U/L).

**Figure 01. Erythrogram values in negative and positive animals for the infection by *Hepatozoon* spp.** Parameters evaluated: Hematocrit (A), Erythrocyte Count (B), Leukocyte Count (C), Hemoglobin (D), Mean Globular Volume (E), Mean Globular Hemoglobin Concentration (F), Lymphocyte Count (G), Azurophil Count (H), Heterophil Count (I), Eosinophil Count (J), Basophil Count (K). 52 animals were evaluated, being 47 positive and 05 negative. Values with statistical difference at  $P < 0.05$  according to the Mann Whitney test. To be continued.



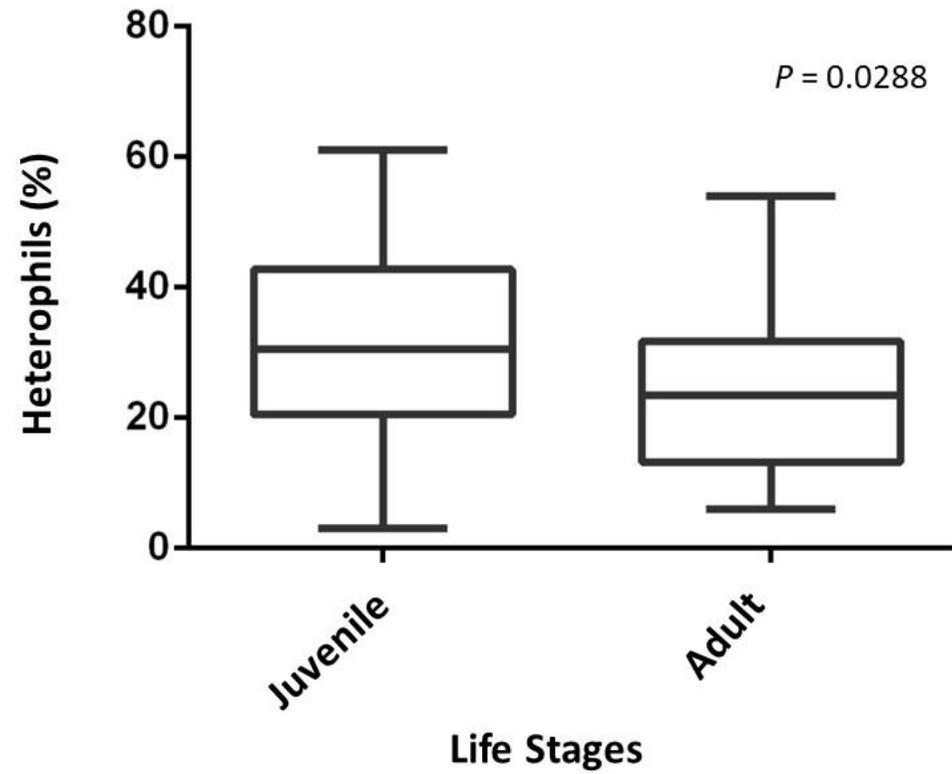
**Figure 01 (continuation).** Erythrogram values in *Hepatozoon* spp negative ( $n = 05$ ) and positive ( $n = 47$ ) free-living *Boa constrictor*. Parameters evaluated: Hematocrit (A), Erythrocyte Count (B), Leukocyte Count (C), Hemoglobin (D), Mean Globular Volume (E), Mean Globular Hemoglobin Concentration (F), Lymphocyte Count (G), Azurophil Count (H), Heterophil Count (I), Eosinophil Count (J), Basophil Count (K). Values with statistical difference at  $P < 0.05$  according to the Mann Whitney test.



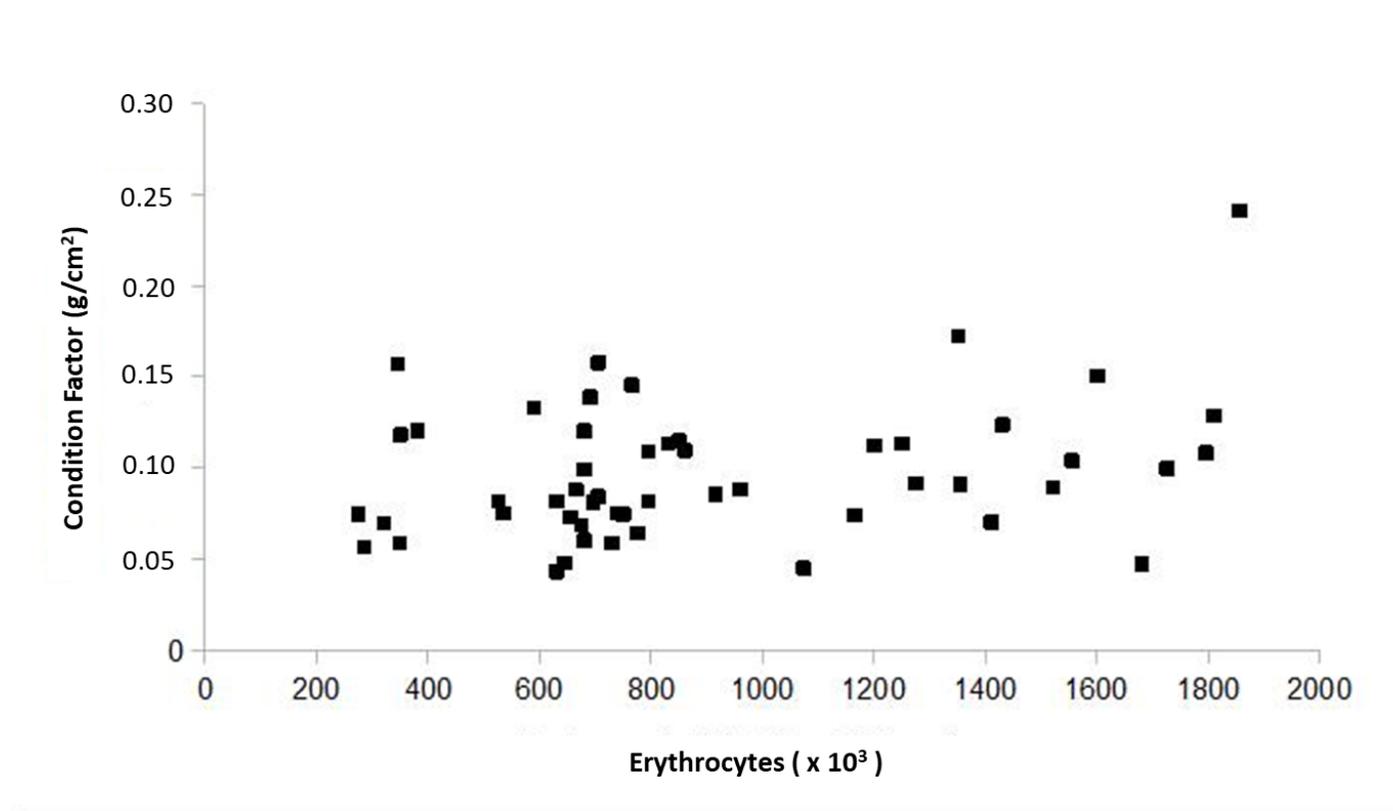
**Table 03. Hematological values in free-living *Boa constrictor* from the Brazilian northeast region.** It was evaluated 52 clinically healthy animals. MGV – mean globular volume; MGHC - mean globular hemoglobin concentration.

<b>Parameters</b>	<b>Minimum Value</b>	<b>25% Percentile</b>	<b>Median</b>	<b>75% Percentile</b>	<b>Maximum Value</b>
<b>Hematocrit (%)</b>	12	27	29.50	32	41
<b>Erythrocytes (x 10<sup>3</sup>)</b>	275	650	757.50	1262.50	1855
<b>Leucocytes (x 10<sup>3</sup>)</b>	1.50	7.12	15.50	30.25	67
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	3.40	9	9.85	10.70	13.66
<b>MGV (fL)</b>	160.22	254.48	378.42	481.98	1093.75
<b>MGHC (%)</b>	28.33	33.30	33.32	33.33	33.47
<b>Lymphocytes (%)</b>	5	18.50	29.50	41.50	79
<b>Azurophils (%)</b>	3	31.50	39.50	49.50	69
<b>Heterophils (%)</b>	3	17.00	26.50	38.50	61
<b>Eosinophils (%)</b>	0	0	0	0	3
<b>Basophils (%)</b>	0	0	0	0	4

**Figure 02. Heterophil blood counts in free-living *Boa constrictor* in different life stages.** 52 animals were analyzed, being 28 juveniles and 24 adults, and the data were submitted to the Mann Whitney statistical test, with a significance level set at  $P < 0,05$ .



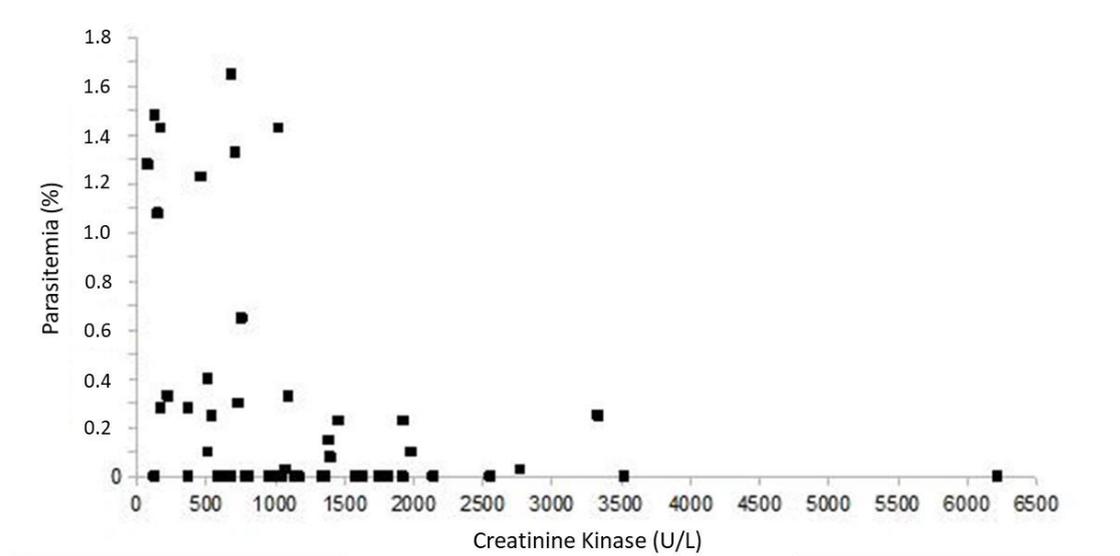
**Figure 03.** Correlation between condition factor and erythrocyte blood counts in 52 free-living *Boa constrictor* from the Brazilian northeast. The data were submitted to the Spearman correlation test, and the significance level was set at  $P < 0.05$ , and the correlation index was 0.28886, with  $P = 0.0379$ .



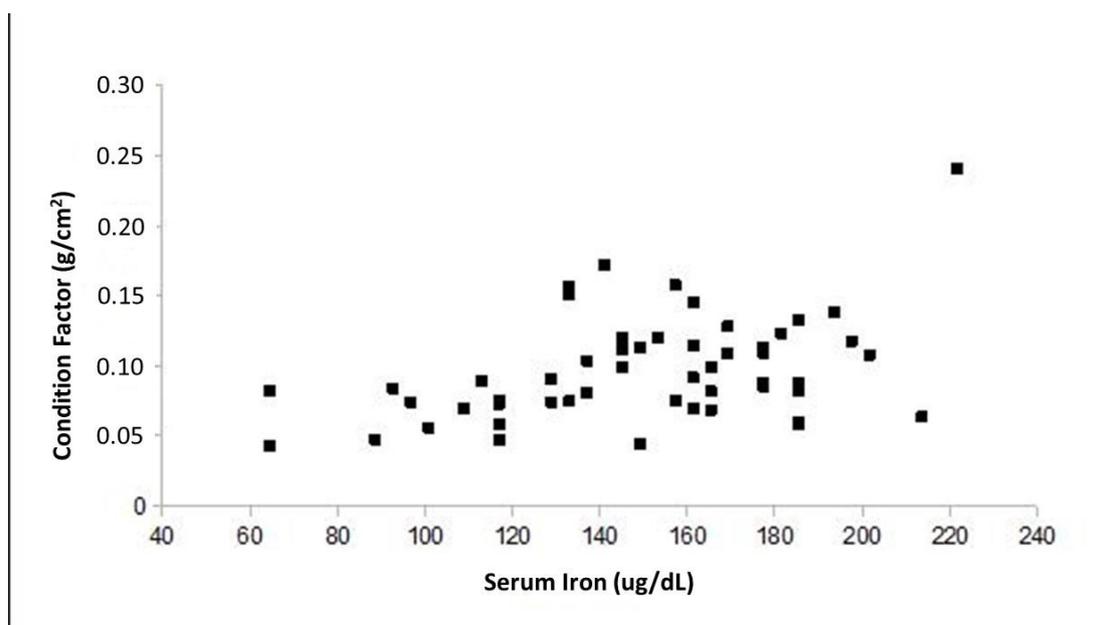
**Table 04. Concentrations of serum components in *Hepatozoon* spp. infected and not infected *Boa constrictor*.** It were analyzed 52 animals, being 47 positive and 05 negative. The median values of the infected and not infected animals were compared using the Kruskal Wallis statistical test, with a significance level set at  $P < 0.05$ . AST – aspartate aminotransferase; CK – creatinine kinase.

Parameter	Positives (n=47)					Negatives (n=05)					P Value
	Minimum Value	25% Percentile	Median	75% Percentile	Maximum Value	Minimum Value	25% Percentile	Median	75% Percentile	Maximum Value	
Total protein (g/dL)	3.97	4.93	5.23	5.63	9.70	4.36	4.85	4.88	5.08	5.70	1.0000
Albumin (g/dL)	1.18	1.37	1.48	1.62	2.61	1.33	1.38	1.46	1.56	1.68	1.0000
Globulin (g/dL)	2.32	3.42	3.75	4.13	8.34	3.03	3.16	3.32	3.62	4.32	1.0000
Triglycerides (mg/dL)	49.41	52.93	54.80	63.47	177.75	50.58	55.74	60.89	63.47	83.37	0.4848
Cholesterol (mg/dL)	46.77	77.73	91.31	135.85	197.94	55.55	76.87	103.87	109.20	143.25	1.0000
Glucose (mg/dL)	38.78	44.90	50.15	56.78	83.467	36.62	42.13	43.95	44.33	73.62	1.0000
Urea (mg/dL)	5.77	6.84	7.45	7.95	11.81	6.53	6.70	7.08	7.43	8.74	1.0000
Calcium (mg/dL)	12.55	13.79	14.67	15.21	22.21	13.55	13.59	13.66	14.05	15.33	1.0000
Iron (µg/dL)	64.52	129.03	153.22	177.42	221.77	108.87	112.90	157.26	185.48	201.61	1.0000
Uric Acid (mg/dL)	3.12	4.22	4.60	5.77	20.87	4.23	4.47	5.62	6.23	6.71	1.0000
AST (U/L)	5.23	5.23	10.48	15.71	47.14	5.23	10.48	15.71	15.71	20.95	0.5306
CK (U/L)	72.85	510.00	801.40	1579.00	3521.00	607.00	947.10	1020.00	1809.00	6217.00	0.3205

**Figure 04. Correlation between parasitemia and serum creatinine kinase concentration levels in free-living 47 free-living *Boa constrictor*.** The data were submitted to the Spearman's correlation test, with a significance level set at  $P < 0.05$ . The correlation index found was  $-0.4138$  ( $P = 0.0023$ ).



**Figure 05. Correlation between 52 free-living *Boa constrictor* condition factors and their serum iron concentration levels.** The data were submitted to the Spearman's correlation test, with a significance level set at  $P < 0.05$ . The correlation index found was  $0.3432$ , with a  $P = 0.0127$ .



#### 4. Discussion

The genus *Hepatozoon* comprises species considered as the main hemoparasites found in snakes (2), and although in most cases there is no clinical symptomatology resulting from the infection, there are some reports of damages to the health of these animals (10, 11). Complementary tests such as hematology and serum biochemistry are important tools in the search for a more comprehensive clinical diagnosis. Thus, the evaluation of hematological parameters and serum biochemistry in *Hepatozoon* spp. naturally infected and not infected free-living *Boa constrictor* is justified to observe the possible changes in these parameters caused by the infection with this hemoparasite. In this study, it was possible to evaluate erythrogram and leukogram values in animals infected and not infected by *Hepatozoon* spp., as well as to perform a detailed biochemical panel of the main hematological and clinical biochemistry parameters for free-living *Boa constrictor* from the Brazilian northeast.

It was possible to observe that there was no statistical difference between the parameters of the erythrogram between *Hepatozoon* spp. infected and non-infected animals. However, we verified a negative correlation between parasitemia and the MGHC values, at  $P < 0.10$ , suggesting that the presence of gametes in erythrocytes may lead to the consumption of hemoglobin, causing hemolytic anemia with an increase in young red blood cells in the circulation. Motta et al. (14) also observed that free-living *Crotalus durissus collilineatus* snakes infected with *Hepatozoon* spp. from Minas Gerais, Brazil, presented polychromatophilia in the blood count. The values of MCV and MGHC were similar to the reference values used for *Boa constrictor* in captivity at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil (29).

Anemias can be diagnosed by observing hematocrit values, mean globular volume and mean globular hemoglobin concentration (32, 33). Only one animal

presented anemia, where their hematocrit value was 12%, and according to Frye (34) the normal hematocrit value for reptiles varies between 15% and 55%. This animal did not present gamonts in peripheral blood, but it was PCR positive for *Hepatozoon* spp., and the only other parameter that drew attention was the low AST serum concentration (5.23 U/L), indicating liver injury in the acute phase. Wosniack et al. (35), reported that even animals with low parasitemia can develop severe granulomatous hepatitis due to the presence of meronts in the liver.

In our study, the values of differential leukocyte counts were within the standards suggested by Almonsy (29). However, when evaluating the relative quantification of these cells, the azurophils presented the highest differential count (38.96%), followed by lymphocytes (32.49%) and heterophils (27.7%). Machado et al. (36) reported an increase in azurophil counts in *Boa constrictor amarali* snakes in captivity parasitized by Hemogregarines, suggesting an immune response to infection. Ozzetti et al (37) also observed that azurophils were the most common leukocyte subtype found in *Oxyrhopus guibei* and *Xenodon newwiedii* snakes in captivity, even though these animals were not parasitized. 44.2% (23/52) of the animals in this study presented  $\geq 40\%$  of azurophils. Campbell (22) reports that increases in the number of azurophils may represent a granulomatous inflammatory disease or mild chronic infections, but these situations were not found in this study, as shown by the clinical examination.

In 5.8% (3/52) of the animals, it was possible to observe heterophiles  $\geq 50\%$ , all of which were positive for *Hepatozoon* spp. in PCR, and only one presented a detectable parasitemia (0.23%). In addition, we observed that there is a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) between the relative frequency of heterophils in juvenile and adult animals, being found in greater quantity in the juvenile ones. It is

known that increases in the number of heterophiles in snakes may be related to non-inflammatory responses, such as stress (22), especially in free-living animals that are not used to handling by humans, a situation that can be potentiated in young animals (38-39). When analyzing 07 clinically healthy *Corallus hortulanus* snakes from captivity, Quadrini et al. (40) observed that heterophils and azurophils were present in the same proportion, followed by lymphocytes. Campbell (22) reports that the number of normal heterophils in reptiles may be around 40% of total leukocytes and adds that these values may vary in the same individual due to seasonal climatic factors, management, diet and stress.

Eosinophils were found in 23% of the animals (12/52) and basophils in 17.3% (9/52), but always in a number that did not represent more than 4% of the leukocyte subtypes. Eosinophils act against parasites in reptiles, mainly against helminths, and their findings tend to decrease during the summer. In snakes, it can be found in a small number or even represent 0% of leukocyte subtypes (22). Basophils are also rare in snakes, however, unlike heterophiles and eosinophils, their seasonal variations are minimal (22). Sarmiento et al. (23) evaluated adult and juvenile *Boa constrictor* recently captured by the local environmental police in Mexico, finding values of 1.5% eosinophils for both groups and 2.6% and 4.2% basophils for adult and juvenile animals, respectively. Machado et al (36) did not observe eosinophils in the differential leukocyte count in *Boa constrictor amarali* kept in captivity, and this same observation was reported by other authors working with other snake species (37, 40-41).

The results of serum biochemistry showed no statistically significant difference between the group of infected and non-infected animals. The median value of total proteins found in our study (5.23 g / dL) is similar to that reported in other studies with *Boa constrictor* (23, 38) and by Silva et al (43) in *Boa constrictor amarali* kept in

captivity. However, we observed that 01 animal presented hyperproteinemia accompanied by hyperglobulinemia, and that the same animal was infected with *Hepatozoon* spp. with 0.65% parasitemia, with a high increase in the leukocyte count ( $67 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ), with 69% of azurophils, suggesting a chronic infection (22) not detected in the clinical examination.

When observing the AST, cholesterol and CK values, we concluded that the median value for AST found in this study (10.84 U/L), was lower than that reported for *Boa constrictor* of free life in the Amazon and in Mexico, and kept in captivity in São Paulo (23, 41, 42), and the difference in these values may be associated with food and temperature, among other variables. The median cholesterol value considering the 52 specimens (91.40 mg/dL) was lower than that found by Carlos et al. (44) in snakes of the *Bothrops* genus kept in captivity in Argentina. In the animals examined, 3.85% (2/52) showed a significant increase in cholesterol values together with high AST values, suggesting liver problems. Due to the fact that the AST enzyme is not exclusively an hepatic indicator, but also a muscular one, it is recommended that the results of AST tests be analyzed together with the results of creatinine kinase (CK), since this indicator will accompany the increase in AST in cases of muscle injuries (29).

In our study, the median creatinine kinase value found (983.55 U/L) was considered high when compared to that reported by Lamirande et al, (45) ( $177.9 \pm 99.3$ ) in *Boiga irregularis* snakes from Australia. We believe that, because they are free-living animals, this difference in values is a consequence of the capture stress and great physical resistance during handling and containment for blood collection. However, the absence of work on snakes makes further comparisons difficult. It was observed that CK levels are negatively associated with the level of parasitemia. It is known that CK is a muscular enzyme and an increase in its level is related to muscular inflammation or

trauma. So far, no influence of *Hepatozoon* spp. on skeletal or cardiac musculature has been reported, and such an association could be inferred by euthanasia and necropsy of the animals, which could not be done in this work because they are animals of the Brazilian fauna protected by specific legislation.

The median values found for the urea and uric acid were 7.43 mg / dL and 4.61 mg / dL respectively, and in our study the median value found for urea was higher than that found by Sarmiento et al (23) in free-living *Boa constrictor*, equal to the values found for species of the genus *Bothrops* kept in captivity (44), and lower than that found by Glaser et al (46) in captive snakes of the genus *Bothrops*. This diversity of results illustrates the importance of producing reference values that cover a given population of a species, observing the variables that can interfere with biochemical and hematological values, such as management, species, climate, captivity, among other factors (23).

## **5. Conclusions**

This work allowed us to measure the hematological and biochemical values of free-living *Boa constrictor* snakes naturally infected by *Hepatozoon* spp., showing that there was no significant change in these parameters. Also, for the first time, hematological and biochemical reference values for the *Boa constrictor* species in northeastern Brazil

## **Author's contributions**

RDP and GMR designed the study. GMR, RMLS and IB conducted the fieldwork. GMR, MAM, MSF, CCF, LRM and MCA conducted the laboratory work. GMR conducted the statistical analysis. GMR and RDP wrote the manuscript. RDP and RM revised the manuscript. All the authors approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Francisca Soares (LABIMUNO-UFBA), Leane Gondim (SASE-UFBA) e Paulo Bahiano (Zoológico de Salvador – INEMA) for technical assistance.

## Funding

This work was funded by the Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX), through continuous resources obtained by an extension project. GMR is a PhD fellow from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). RWDP is a Technical Development fellow from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ - Proc. 313350/2019-1). The funders had no role in the design of the study, in collection, analysis, and interpretation of data, or in the writing of the manuscript.

## References

1. Telford SR. Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. CRC Press, Florida. 2009. 394p.
2. Úngari LP, Santos ALQ, O'Dwyer LH, Da Silva MRL, Rodrigues Santos TC, Da Cunha MJR, et al. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. Parasitol. Res, (2018) 117:3857-65. doi: 10.1007/s00436-018-6092-3
3. Smith TG. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J Parasitol. (1996) 82:565- 85.
4. Telford SR, Moler PE, Butler JF. *Hepatozoon* species of the timber rattlesnake in

- northern Florida: description of a new species, evidence of salivary gland oocysts, and a natural crossfamilial transmission of an *Hepatozoon* species. *J Parasitol.*(2008)94:520-3.
5. Telford SR. Three new *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting the Florida kingsnake, *Lampropeltis getula floridana*. *J Parasitol.* (2010) 96:162–9.
  6. O'Dwyer LH, Moco TC, Paduan KDS, Spenassatto C, Da Silva RJ, Ribolla PE. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Exp. Parasitol.* (2013) 135:200–7.
  7. Lowichik A, Yaeger RG. Ecological aspects of snake hemogregarine infections from two habitats in southeastern Louisiana. *J Parasitol* (1987) 73:1109–15.
  8. Kauffman KL, Sparkman A, Bronikowski AM, Palacios MG. Vertical transmission of *Hepatozoon* in the garter snake *Thamnophis elegans*. *J. Wildl. Dis.* (2017) 53:121–5.  
doi: 10.7589/2016-03-056
  9. De Vieira Santos MM, O'Dwyer LH, Da Silva RJ. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). *Parasitol. Res.* (2005) 97, 94–7. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1385-8>
  10. Madsen T, Ujvari B, Olsson M. Old pythons stay fit: effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia.* (2005) 142:407  
12. doi.org/10.1007/s00442-004-1742-9
  11. Brown GP, Shilton CM, Shine R. Do parasites matter? Assessing the fitness consequences of haemogregarine infection in snakes. *Can. J. Zool.* (2006) 84:668-76.
  12. Moço TC, O\_Dwyer LH, Vilela FC, Barrella TH, Silva RJ. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2002) 97:1169–76.

13. O'Dwyer LH, Moço TC, Da Silva RJ. Description of the gamonts of a small species of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Parasitol. Res.* (2004) 92:110–2. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1005-4>
14. Motta RO, Cunha LM, Leite RCL, Silva IJ, Pinto AC, Braga EM et al. *Hepatozoon* ssp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) infection and selected hematological values of the neotropical rattlesnake, *Crotalus durissus collilineatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Viperidae), from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* (2011) 42:399-407.
15. Moço TC, Silva RJ, Madeira NG, Paduan KS, Rubini AS, Leal DDM, et al. Morphological, morphometric and molecular characterization of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisoma durissa terrifica*. *Parasitol. Res.* (2012)110:1393–401.
16. Navega-Gonçalves MEC, Porto T. Conservação de serpentes nos biomas brasileiros. *Bioikos, Campinas,* (2016) 30:55-76.
17. Pinto-Coelho D, Hamdan B, Lira-da-Silva RM. Geographic and altitudinal distribution of snakes of the family boidae in the state of Bahia, northeastern Brazil. *Revista Nordestina de Zoologia.*(2020) 12:26–50.
18. Pizzatto L, Marques OAV, Facure K. Food habits of Brazilian boid snakes: overview and new data, with special reference to *Corallus hortulanus*. *Amphibia-Reptilia.* (2009) 30:533–44. <https://doi.org/10.1163/156853809789647121>
19. Alves RRN, Araújo BMC, Policarpo IS, Pereira HM, Borges AKM, Vieira WLS, et al. Keeping reptiles as pets in Brazil: Ethnozoological and conservation aspects. *J. Nat. Conserv.* (2019) 49:09-21. [doi.org/10.1016/j.jnc.2019.02.002](https://doi.org/10.1016/j.jnc.2019.02.002).

20. Paperna I, Lainson R. *Hepatozoon cf. terzii* (Sambon & Seligman, 1907) infection in the snakes *Boa constrictor constrictor* from North Brazil: Transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizards *Tropidurus torquatus*. *Parasite* (2004) 11:175-81.
21. Calil PR, Puerto G, Dunn JC, Chagas, CRF, Ramos PL. Molecular and morphological characterization of *Hepatozoon* spp. in Brazilian snakes. *Amphibia-Reptilia*. (2019) 40:337–47. doi:10.1163/15685381-20191113
22. Campbell TW. “Hematologia dos répteis.” In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, editors. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (2015). p. 594–637.
23. Sarmiento JCF, Jaramillo GH, Ramirez DM, Pico JEN. Establishment of hematological parameters in boas (*Boa constrictor*) in the centro de atencion y valoracion de fauna silvestre del valle de aburra (Cav amva). *International Journal of Avian & Wildlife Biology Research* (2018) 3:146–50. doi: 10.15406/ijawb.2018.03.00076
24. Gomes N, Puerto G, Buononato MA, Ribeiro MFM. Atlas Anatômico de *Boa constrictor*, Linnaeus, 1758. *Monografia Instituto Butantan* (1989) 2: 1-59.
25. Falk BG, Snow RW, Reed RN, A validation of 11 body-condition indices in a giant snake species that exhibits positive allometry. *PLoS ONE* (2017) 12(7): e0180791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180791>
26. Maia JP, Harris DJ, Carranza S, Gómez-Díaz E. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of Hemogregarine Hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. *PLoS One*. (2014) 9. doi:10.1371/journal.pone.0095010

27. Ujvari B, Madsen T, Olsson M. High Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) From Tropical Australia. J. Parasitol. (2004) 90:670 – 2. doi: 10.1645/ge-204r
28. Perkins SL, Keller AK. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotídeos. J. Parasitol. (2001) 87:870-76. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0870:PONSSR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0870:PONSSR]2.0.CO;2)
29. Almosny NRP. “Patologia clínica em vertebrados ectotérmicos.” In: Cubas ZS, Silva JCS, & Catão-Dias JL. editors Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. 2ª ed., São Paulo: Roca (2014) p.1597-1623.
30. Weiser G. “Hematologia dos répteis.” In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. Editors. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2015) p. 22 – 86.
31. Mukaka MM, Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. Malawi Medical Journal. (2012) Sep; 24(3): 69–71.
32. Thrall MA. “Classificação e abordagem diagnóstica da anemia.” In: Thrall M.A., WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2015) p.170 – 9.
33. Tvedten H. “Laboratory and clinical diagnosis of anemia.” In: Weiss DJ, Wardrop KJ. Scham’s Veterinary Hematology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins (2009) p.152-61.
34. Frye FL. Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry. 2a edição. Malabar, Florida: Krieger Publishing, (1991) 2v, 637p.
35. Wozniak E, Telford SR, DeNardo DF, Mclaughlin G, Butler JF. Granulomatous Hepatitis Associated with *Hepatozoon* sp. Meronts in a Southern Water Snake (*Nerodia fasciata pictiventris*). J Zoo Wildlife Med. (1998) 29:68-71.

36. Machado CC, Silva LFN, Ramos PRR, Takahira RK. Seasonal influence on hematologic values and hemoglobin electrophoresis in Brazilian *Boa constrictor amarali*. J. Zoo Wildl. Med. (2006) 37:487-91.
37. Ozzetti PA, Cavlac CL, Sano-Martins IS. Hematological reference values of the snakes *Oxyrhopus guibei* and *Xenodon neuwiedii* (Serpentes: Dipsadidae). Comp Clin Pathol. (2013) doi 10.1007/s00580-013-1866-6
38. Johnstone CP, Reina RD, Lill A. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. J Comp Physiol B (2012) 182, 861–879. doi.org/10.1007/s00360-012-0656-9
39. Rensel MA, Schoech SJ. Repeatability of baseline and stress-induced corticosterone levels across early life stages in the Florida scrub-jay (*Aphelocoma coerulescens*). Hormones and Behavior (2011) 59 (4), 497-502. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.01.010.
40. Quadrini AE, Garcia VC, Freire BC, Martins MFM. Haematological reference of snakes: Amazon tree boa (*Corallus hortulanus*, Linnaeus, 1758) and Burmese Python (*Python bivittatus*, Kuhl, 1820) in captive. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. (2018) 70. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9865>
41. Kindlovits LM, Temoche LFC, Machado C, Almosny NRP. Aspectos citoquímicos e morfológicos de elementos sanguíneos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidas em cativeiro no serpentário do Instituto Vital Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. (2017) 69:667-75. doi.org/10.1590/1678-4162-9072.
42. Lima DJDS, Bastos RKG, Seixas LDS, Luz MA, Branco ER, Souza NF, et al. Variação sazonal dos valores de bioquímica sérica de jiboias amazônicas (*Boa constrictor constrictor*) mantidas em cativeiro. Biotemas. (2012) 25:165-73. doi: 10.5007/2175-7925.2012v25n4p165

43. Silva LFN, Riani-Costa CCM, Ramos PRR, Takahira RK. Influência sazonal sobre o perfil bioquímico e a eletroforese de proteínas séricas de *Boa constrictor amarali* criada em cativeiro. *Braz. J. Biol.* (2011) 71:517-20 <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000300023>.
44. Carlos TJ, Ignacio HD, Xavier SI, Ariel LE. Biochemical reference intervals in four snakes of the genus *bothrops* (serpentes: Viperidae) from Argentina. *Haemat Open A Open J.* (2019) I: 1-4.
45. Lamirande EW, Bratthauer AD, Fischer DC, Nichols DK. Reference Hematologic and Plasma Chemistry Values of Brown Tree Snakes (*Boiga irregularis*). *J Zoo Wildlife Med.* (1999) 30:516-20.
46. Glaser V, Boni AP, Pitz HDS, Albuquerque CAC, Zeni ALB. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de *Bothropoides jararaca* e *Bothrops jararacussu* (ophidia-viperidae) mantidas em cativeiro. *Arch. Vet. Sci.* (2013) 18:68-74.

## **8. Considerações Finais**

Em plena era do Antropoceno, vivemos em um cenário onde as ações humanas impactam diretamente na qualidade de vida dos animais e do meio ambiente, causando um efeito rebote, seja o surgimento de doenças emergente e reemergentes, ou efeitos climáticos graves. Desta forma, são necessárias pesquisas e trabalhos no intuito de mitigar as consequências das ações humanas ao meio ambiente, oferecendo ferramentas para a conservação de animais silvestres. Estudos epidemiológicos e clínicos com animais de vida livre são de suma importância para entender os impactos humanos nas espécies, bem como a relação interespecífica entre hospedeiro e parasito, e suas manifestações clínicas e subclínicas durante a infecção. A partir disso, os resultados de trabalhos com animais de vida livre tendem a contribuir com projetos de conservação e centros de reabilitação de animais silvestres, fundamentalmente na clínica destes animais. Tendo dito, observa-se a importância da multidisciplinaridade no conceito de Saúde Única para o equilíbrio sustentável a saúde humana, animal e do meio ambiente.

## 9 Anexos

### 9.1 ANEXO 01: ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ACTA TROPICA (Qualis A1, Fator de Impacto 2,555).

Acta Tropica 209 (2020) 105572



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

#### *Leptospira interrogans* in wild *Boa constrictor* snakes from Northeast Brazil peri-urban rainforest fragments



Gustavo M. Rodamilans<sup>a</sup>, Maisa Santos Fonseca<sup>a</sup>, Lucas N. Paz<sup>b</sup>, Clara C. Fernandez<sup>a</sup>, Ilka Biondi<sup>c</sup>,  
Rejane M. Lira-da-Silva<sup>d</sup>, Roberto Meyer<sup>a</sup>, Melissa H. Pinna<sup>b</sup>, Ricardo D. Portela<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, 40110-100, Brazil

<sup>b</sup> Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, 40170-100, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Animais Peçonhentos e Herpetologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia State, 44036-960, Brazil

<sup>d</sup> Núcleo de Ofitologia e Animais Peçonhentos da Bahia, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia State, 40170-290, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Leptospirosis  
Zoonosis  
Wild life  
Reptiles  
Snakes

#### ABSTRACT

Leptospirosis, a disease that occurs worldwide, especially in tropical regions, is caused by bacteria of the genus *Leptospira* and affects mammals, amphibians, and reptiles. *Boa constrictor* snakes are commonly found in Atlantic rainforest fragments in peri-urban areas, which indicates a greater possibility of the contact of these animals with humans residing there. Therefore, the aim of this work was to detect *Leptospira* spp infection through molecular assays in wild *B. constrictor* snakes rescued in peri-urban areas and verify seroreactivity, by the microscopic agglutination test (MAT), as well as the most common serogroups. Among the 46 samples tested, 7 (15.21%) were positive according to PCR and confirmed as *Leptospira interrogans* through *secY* gene sequencing. In MAT, 37 (80.43%) of the 46 samples were classified as reactive. Panama was the serogroup with the highest occurrence. The results showed the presence of *Leptospira* spp DNA in asymptomatic snakes rescued in rainforest fragments located in peri-urban areas and support further investigations on the influence of these animals in the epidemiology of leptospirosis in tropical peri-urban areas.

#### 1. Introduction

Urban growth and deforestation can cause greater contact between humans and wild animals, favoring the occurrence of emerging and re-emerging diseases (Hassell et al., 2017). Urbanization alters the composition of ecological communities by changing habitat quality, animal dispersal capacity, and nutrient availability (Gottdenker et al., 2014), which may increase the hosts susceptibility to infection by pathogens owing to chronic stress and/or immunosuppression (Keesing et al., 2010).

Leptospirosis is caused by bacteria of the genus *Leptospira* and uses mammals, reptiles, and amphibians as hosts in Latin America (Vieira et al., 2018). Domestic, synanthropic and wild animals are considered the main reservoirs and are responsible for the persistence of infection foci (Rodrigues et al., 2016). Several wild animals can act as hosts, although some species are neglected in the epidemiology of this zoonosis (Vieira et al., 2018; Paz et al., 2019).

*Boa constrictor* (LINNAEUS, 1758) snakes have a wide distribution in the Americas, being commonly found in peri-urban rainforest fragments (Navega-Gonçalves and Porto, 2016), feeding on small mammals,

lizards, amphibians, and birds (Pizzatto et al., 2009; Cabral et al., 2019). They are considered to be of no medical importance owing to their non-venomous nature; therefore, they are neglected as reservoirs of pathogens with zoonotic potential, such as fungi, viruses, and bacteria (Mitchell, 2011).

Considering the scarcity of studies that show the detection of *Leptospira* spp. in snakes, as well as the high number of rescues of these animals in tropical peri-urban areas, the aim of this work was to detect infection by *Leptospira* spp. and their respective serogroups in wild *B. constrictor* rescued in the Brazilian Northeast Region.

#### 2. Material and methods

##### 2.1. Ethical aspects

This project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine of the Federal University of Bahia (CEUA / UFBA 94/2018), by the System on Biodiversity Authorization (SISBIO 63,053–3) and by the National System on Genetic Resources Management (SISGEN A789EC8).

\* Corresponding author at: LABIMUNO-UFBA, Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Salvador, Bahia State, 40110-100, Brazil

E-mail addresses: [rejane@ufba.br](mailto:rejane@ufba.br) (R.M. Lira-da-Silva), [rmeyer@ufba.br](mailto:rmeyer@ufba.br) (R. Meyer), [melissahp@ufba.br](mailto:melissahp@ufba.br) (M.H. Pinna), [rwportela@ufba.br](mailto:rwportela@ufba.br) (R.D. Portela).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105572>

Received 31 March 2020; Received in revised form 31 May 2020; Accepted 31 May 2020

Available online 03 June 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 2.2. Sample collection

This study included 46 wild *B. constrictor*, rescued by the environmental police in peri-urban areas of the state of Bahia, the most populous of the Northeast of Brazil, in 2018. Right after rescue, a clinical examination was performed by a veterinarian staff specialized in reptile medicine with the objective to perform a general health assessment and to detect any clinical sign of illness, such as animals in bad conditions and/or presenting reduced weight (Ebani, 2017; Pérez-Flores et al., 2017). Blood collection was made by puncture of the paravertebral venous sinus using tubes with and without anticoagulant.

## 2.3. PCR detection of *Leptospira* and molecular characterization

Genomic DNA samples were extracted from the blood of 46 snakes using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA samples were quantified and analyzed for purity with a Nanodrop system (Thermo Fisher). PCR was performed to amplify the *lipL32* gene (present exclusively in pathogenic *Leptospira*), as previously described (Stoddard et al., 2009; Almeida et al., 2019). The *secY* gene was amplified in positive samples (Ahmed et al., 2009; Paz et al., 2019). After amplification, the PCR products were purified and the amplicons were sequenced using the Big Dye Terminator 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA) with the ABI 3500 Genetic Analyzer XL sequencer. Data was analyzed with the Staden Software Package version 2.0b9. Consensus sequences were then compared with sequences available in the GenBank database using BLAST.

## 2.4. Microscopic agglutination test (MAT)

The MAT assay was carried out according to the methodology recommended by the World Organization for Animal Health (OIE, 2018), including 19 serovars belonging to 16 serogroups (Australis, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasima, Grippyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Louisiana, Panama, Pomona, Pyrogenes, and Serjoe). The titers were determined as the highest serum dilution in which there was at least 50% agglutination of *Leptospira*. The samples were considered reactive when they had titers greater than or equal to 25, as recommended by Rodrigues et al. (2016) for *Crotalus durissus collilineatus* snakes.

## 3. Results

During the clinical analysis of the rescued *B. constrictor*, no clinical signs of illness were detected in these animals. During PCR, the *Leptospira* spp. genes *lipL32* and *secY* were amplified in 7 (15.21%) of the 46 blood samples tested. Sequencing demonstrated 100% homology with *secY* sequences from *Leptospira interrogans*, deposited in the GenBank database (GenBank MT508667).

The serological analysis using the MAT technique revealed that 80.43% (37/46) of the boas presented titers greater than or equal to 25, which was herein considered positives as recommended by Rodrigues et al. (2016). The Autumnalis serogroup showed high titers ( $\geq 100$ ) in 80% (4/5) of the times that it reacted positively, with two samples obtaining the highest titer found (400) among all positive samples (Table 1). The serogroup Panama had the highest occurrence 51.35% (19/37), with titers of 25 or 50. The serogroup with the second highest occurrence was Icterohaemorrhagiae, with 16.21% (6/37), followed by Autumnalis with 13.51% (5/37) (Table 2).

When the serological and molecular biology results were correlated, two PCR positive animals presented a titer of 200, one for Australis and another for Autumnalis. Furthermore, two animals that presented positive results in PCR had a 50 titer in MAT, both for serovar Panama. One animal with a 25 titer for serovar Panama in MAT was positive in PCR, and two *Boa constrictor* showed positive results in PCR but did not

**Table 1**  
Description of MAT and PCR results for pathogenic *Leptospira* in *Boa constrictor* from Northeast Brazil rainforest peri-urban fragments. The samples that presented positive results at PCR and/or MAT are listed.

Sample	PCR	MAT	Serogroup and titer
A1	Negative	Positive	Icterohaemorrhagiae/CopM20: 100; Icterohaemorrhagiae/CopL1130: 100
A2	Negative	Positive	Grippyphosa: 100; Cynopteri: 100
A3	Negative	Positive	Panama: 25; Icterohaemorrhagiae/CopM20: 25
A4	Negative	Positive	Grippyphosa: 50
A5	Positive	Positive	Panama: 25; Grippyphosa: 25
A6	Negative	Positive	Panama: 25; Hebdomadis: 25
A7	Negative	Positive	Grippyphosa: 200
A8	Negative	Positive	Autumnalis: 400; Icterohaemorrhagiae/CopM20: 200
A9	Negative	Positive	Panama: 25
A10	Negative	Positive	Icterohaemorrhagiae/CopM20: 400; Autumnalis: 200
A11	Negative	Positive	Icterohaemorrhagiae/CopM20: 100
A12	Negative	Positive	Panama: 25; Australis: 25
A13	Negative	Positive	Autumnalis: 400
A14	Positive	Positive	Australis: 200
A15	Positive	Positive	Panama: 50
A16	Negative	Positive	Serjoe: 25
A17	Negative	Positive	Panama: 25; Icterohaemorrhagiae/CopM20: 25; Serjoe: 25; Icterohaemorrhagiae/CopL1130: 25; Djasiman: 25; Cynopteri: 25; Icterohaemorrhagiae/Lal: 25
A18	Negative	Positive	Icterohaemorrhagiae/CopM20: 200
A19	Positive	Positive	Panama: 50
A20	Negative	Positive	Panama: 25; Serjoe: 25
A21	Negative	Positive	Panama: 25; Icterohaemorrhagiae/CopM20: 25;
A25	Negative	Positive	Panama: 25
A26	Negative	Positive	Icterohaemorrhagiae/CopM20: 25; Australis: 25; Pyrogenes: 25; Ballum: 25; Canicola: 25; Icterohaemorrhagiae/CopL1130: 25; Icterohaemorrhagiae/Lal: 25; Pomona: 25
A28	Negative	Positive	Panama: 25; Serjoe: 25
A29	Negative	Positive	Celledoni: 100
A30	Negative	Positive	Panama: 25; Autumnalis: 25; Celledoni: 25; Ballum: 25; Pyrogenes: 25
A31	Negative	Positive	Panama: 25; Autumnalis: 25; Ballum: 25
A32	Negative	Positive	Panama: 25; Autumnalis: 25
A33	Negative	Positive	Panama: 25
A34	Negative	Positive	Panama: 25
A35	Negative	Positive	Panama: 25
A36	Positive	Positive	Autumnalis: 200
A37	Negative	Positive	Pomona: 25
A38	Negative	Positive	Autumnalis: 25; Ballum: 25
A40	Negative	Positive	Autumnalis: 100
A42	Negative	Positive	Panama: 25
A44	Positive	Negative	
A45	Negative	Positive	Icterohaemorrhagiae / CopM20: 50
A46	Positive	Negative	

**Table 2**  
Frequency of serogroups that present reaction at the MAT.

Serogroup	Relative frequency (%)	Absolute frequency
Panama	51.3	19
Icterohaemorrhagiae	16.3	6
Autumnalis	13.5	5
Grippyphosa	8.1	3
Australis	2.7	1
Serjoe	2.7	1
Celledoni	2.7	1
Pomona	2.7	1
TOTAL	100	37

show reactivity in MAT (Table 1).

#### 4. Discussion

Leptospirosis is among the most common zoonosis in the world (Costa et al., 2015), and Brazil has a significant incidence of this disease in humans (Santos et al., 2017). Although the role of reptiles in the disease cycle is unclear (Ebani, 2017; Paz et al., 2019), Feuer and Domash-Martinez (2011) reported a case of human leptospirosis after contact with an alligator carcass in Florida. Our study is the first one to identify *Leptospira* DNA from blood samples taken from wild *B. constrictor* snakes.

The *lipL32* and *secY* genes were amplified by PCR in 15.21% of the animals. Previous studies used different samples to detect *Leptospira*, such as kidney tissue in snakes, gastrointestinal lavage in chelonians, and blood in crocodylians. There is a report of the positive detection of 26.09% (6/23) of crocodylians using blood genomic DNA as sample (Paz et al., 2019). Our study amplified a gene exclusively found in pathogenic *Leptospira*, unlike Biscola et al. (2011), which amplified a gene that can be also found in non-pathogenic *Leptospira* and did not find PCR positive *B. constrictor* snakes. Additionally, it is important to point out that the animals in this study could not be euthanized to obtain genomic DNA from organs, since they belong to the native Brazilian fauna and must be returned to forests after clinical examination.

The MAT results revealed 80.43% (37/46) of reactive animals, corroborating with Rodrigues et al. (2016), which found a prevalence of 87.5% (56/64) in *Crotalus durissus collilineatus* snakes from Minas Gerais state, Brazil. However, Biscola et al. (2011) found a prevalence of 35.4% (52/147) in snakes of the genus *Crotallus*, *Bothrops*, *Boa*, and *Spilotes* considering titers  $\geq 100$  as positive, and none of the wild *B. constrictor* analyzed in this study was seroreactive. There are no studies that determine a well-established cutoff in reptiles, so it is recommended that initial researches in wild animal species use low ones (Rodrigues et al., 2016). This is the first study of *Leptospira* in wild *B.*

*constrictor* snakes, which showed a higher occurrence than Hyakutake et al. (1976), Biscola et al. (2011), and Lindner-Knific et al. (2013), due to all of them studying boas bred in captivity. It is believed that this high prevalence is associated with the habitat of these animals. There is a great availability of the small rodents that make up the snake's diet in the peri-urban regions, in which human waste is dumped as well as other poor sanitation conditions are present. Indeed, Costa et al. (2014) described that 63% of 84 urban, slum-dwelling Norway rats from Salvador city that were analyzed by immunofluorescence staining of kidney impressions were positive for *Leptospira* infection. Regarding the environment itself, it was already described that 86% of 70 soil samples collected from an urban slum community in Salvador city were contaminated by *Leptospira* as detected by a 16S rRNA qPCR (Schneider et al., 2018).

Two PCR positive snakes were negative at the MAT. This situation was also described by Oliveira et al. (2016). Fornazari (2017) highlights the value of PCR to characterize a reptile as a host and reinforces that being MAT reactive only indicates that this animal has been exposed to this pathogen. In humans, Ooteman et al. (2006) suggest that PCR can identify *Leptospira* in the blood even before the development of antibodies. This study's result, with two samples negative for MAT and positive for PCR, may reflect either a recent infection or a poor ability of certain serogroups to induce a significant humoral immune response in *B. constrictor*.

The Panama serogroup showed a higher positivity at MAT, and the same serogroup was found by Biscola et al. (2011) in captive *B. constrictors*. Hyakutake et al. (1976) observed in this same species a reaction only for the Andamana serogroup. When compared to similar works in other animals of the herpetofauna, it is observed that the serogroup Panama is not reported as the main current one (Hyakutake et al., 1976; Biscola et al., 2011; Lindner-Knific et al.,

2013; Oliveira et al., 2016; Paz et al., 2019). The low titers found for this serogroup may represent recent infection, declining titers from previous infection, or even chronic infections (Calle et al., 2001).

The serogroup Panama is not often found in human serological surveys, unlike the serogroup Icterohaemorrhagiae, which is considered one of the main causes of severe leptospirosis in humans in Brazil (Santos et al., 2017). This serogroup presented the second highest occurrence in this study and, according to Vieira et al. (2018), this serogroup predominates in rodents and carnivorous mammals from many biomes in Latin America. Grimm et al. (2015) found this serogroup to be the most frequent in turtles. Pereira & Andrade (1990) found that Panama serogroup represented 3.1% of the *Leptospira* positive cases found in 259 individuals from a slum area of Rio de Janeiro city, Brazil. It is noteworthy that urban and peri-urban rodents, normally preyed by boas, are the main hosts of this serogroup (Adler and De La PeñaMoctezuma, 2010), and a previous study on 142 *R. norvegicus* captured in the vicinity of households of severe leptospirosis cases identified during active hospital-based surveillance in Salvador city described that MAT highest titers were observed against the serogroups Icterohaemorrhagiae ( $n = 75$ ), Canicola ( $n = 1$ ), and Djasiman ( $n = 3$ ) (de Faria et al., 2008).

The Autumnalis serogroup appears with the third highest occurrence found, 13.51% (5/37), and with the highest titers found (400). This serogroup has been reported in testudines and was isolated from amphibians (Gravekamp et al., 1991; Oliveira et al., 2016). Castro et al. (2011) reported a high occurrence of this serogroup in domestic dogs and suggested that these animals may infect the environment.

The fact that the snakes studied did not present clinical signals, even the ones that were positive in PCR or MAT, can be considered as a factor that may increase the risk of infection in humans who manage these animals, in the case boas being further confirmed as possible transmitters of *Leptospira*. Pérez-Flores et al. (2017) described cases of *Leptospira*-infected people that were involved with crocodile handling and egg collection, suggesting that reptiles could play an important role in

the transmission of leptospirosis. The absence of clinical signals, according to Rodrigues (2016), makes it difficult to identify the host animals for this pathogen, and may be a likely facilitator of transmission to humans, other animals, and environmental contamination. This can represent an increased risk of transmission to professionals who work with free-range or captive animals, such as environmental guards, keepers, veterinarians, and biologists.

#### 5. Conclusion

Our results demonstrate the presence of anti-*Leptospira* spp antibodies and the first DNA detection record of *Leptospira interrogans* in wild *Boa constrictor*. Thus, these snakes must be further considered in the study of the leptospirosis transmission chain, mainly in peri-urban areas close to rainforest fragments.

#### Author statement

RD Portela, R Meyer, MH Pinna: Conceptualization, Funding acquisition, Writing - Reviewing and Editing. GM Rodamilans, MS Fonseca, CF Couto, LN Paz: Investigation, Methodology, Data curation. GM Rodamilans, MS Fonseca: Writing - Original draft. I Biondi, RM Lira-da-Silva: Resources, Supervision, Writing - Reviewing and Editing. RD Portela, MH Pinna: Project administration.

#### Author contributions

GMR, MSF, LNP, CCF - Investigation; IB, RMLDS - Data curation and formal analysis; GMR, CCF, LNP - writing original draft; RM - funding acquisition; MHP and RDP - conceptualization, formal analysis, writing review & editing.

## Funding

This work was funded by the Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão (FAPEX) with resources obtained by extension projects. GMR is a PhD Fellow from the Coordination of Superior Level Staff Development (CAPES). MSF is a Post-doctoral fellow from CAPES. RDP is a Technological Development fellow from the Brazilian National Council on Scientific and Technological Development (CNPq).

## Acknowledgments

The authors are thankful for Francisca Soares (LABIMUNO-UFBA) and Leane Gondim (SASE-UFBA) for technical assistance.

## References

- Adler, B., De La Peña-Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>.
- Ahmed, A., Engelberts, M.F.M., Boer, K.R., Ahmed, N., Hartskeerl, R.A., 2009. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE* 4, e7093 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.007093>.
- Almeida, D.S., Paz, L.N., de Oliveira, D.S., Silva, D.N., Ristow, P., Hamond, C., Costa, F., Portela, R.W., Estrela-Lima, A., Pinna, M.H., 2019. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. *PLoS One* 14, e0217391 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217391>.
- Biscola, N.P., Fornazari, F., Saad, E., Richini-Pereira, V.B., Campagner, M.V., Langoni, H., Barraviera, B., Ferreira Junior, R.S., 2011. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 806–811 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X201100090013>.
- Cabral, S.O., Freitas, I.S., Morlaes, V., Katzenberger, M., Calabuig, C., 2019. Potential seed dispersers: a new facet of the ecological role of *Boa constrictor constrictor* Linnaeus 1758. *Biota. Neotrop.* 19, e20180626 <https://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0626>.
- Calle, P.P., Rivas, J., Muñoz, M., Thorbjarnarson, J., Holmstrom, W., Kares, W.B., 2001. Infectious disease serologic survey in free-ranging Venezuelan anacondas (*Eunectes murinus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 32, 320–323 [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2001\)032\[0320:IDSSIF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2001)032[0320:IDSSIF]2.0.CO;2).
- Castro, J.R., Salaberry, S.R.S., Souza, M.A., Lima-Ribeiro, A.M.C., 2011. Sorovares de *Leptospira* spp. predominantes em exames sorológicos de cães e humanos no município de Uberlândia, estado de Minas Gerais. [Predominant *Leptospira* Spp. serovars in serological diagnosis of canines and humans in the city of Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 217–222 <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000300013>.
- Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003898 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- Costa, F., Porter, F.H., Rodrigues, G., Farias, H., de Faria, M.T., Wunder, E.A., Oskowicz, L.M., Kosov, M.Y., Reis, M.G., Ko, A.I., Childs, J.E., 2014. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 33–40. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1378>.
- de Faria, M.T., Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J., Hartskeerl, R.A., Pereira, M.M., Ko, A.I., Reis, M.G., 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 108, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.005>.
- Ebani, V.V., 2017. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: a mini review. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 723–728 <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.020>.
- Feuer, B., Domash-Martinez, T., 2011. Report of case: leptospirosis after exposure to alligator carcass. *Osteopat. Fam. Phys.* 3, 23–26 <https://doi.org/10.1016/j.osfp.2010.04.003>.
- Fornazari, F., 2017. Are reptiles reservoirs of leptospirosis? A brief discussion based on serological studies. *Ecohealth* 14, 203–204 <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1243-z>.
- Gottdenker, N.L., Streicker, D.G., Faust, C.L., Carroll, C.R., 2014. Anthropogenic land use change and infectious diseases: a review of the evidence. *Ecohealth* 11, 619–632 <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0941-z>.
- Gravelkamp, C., Korver, H., Montgomery, J., Eversard, C.O.R., Carrington, D., Ellis, W.A., Terpstra, W.J., 1991. Leptospirae isolated from toads and frogs on the island of Barbados. *Zentralbl. Bakteriol.* 275, 403–411 [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80308-7](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80308-7).
- Grimm, K., Mitchell, M.A., Thompson, D., Maddox, C., 2015. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Blanding's turtles (*Emydea blandingii*) from Dupage county, Illinois USA. *J. Herpetol. Med. Surg.* 25, 28–32 <http://dx.doi.org/10.5818/1529-9651-25.1.28>.
- Hassell, J.M., Begon, M., Ward, M.J., Fèvre, E.M., 2017. Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife-livestock-human interface. *Trends Ecol. Evol.* 32, 55–67 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>.
- Hyakutake, S., Biasi, P.D., Santa Rosa, C.A., Belluomini, H.E., 1976. Contribuição ao estudo epidemiológico das leptospiroses em serpentes do Brasil. [Contribution to the epidemiological study on leptospirosis in Brazilian snakes]. *Rev. Inst. Med. Trop.* 18, 10–16.
- Keating, F., Belden, L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C.D., Holt, R.D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K.E., Mitchell, C.E., Myers, S.S., Bogich, T., Ostfeld, R.S., 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468, 647–652 <https://doi.org/10.1038/nature09575>.
- Lindtner-Knific, R., Vergles-Rataj, A., Vlahovic, K., Zrimsek, P., Dovic, A., 2013. Prevalence of antibodies against *Leptospira* sp. in snakes, lizards and turtles in Slovenia. *Acta Vet. Scand.* 55, 65–69 <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-65>.
- Mitchell, M.A., 2011. Zoonotic diseases associated with reptiles and amphibians: an update. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 14, 439–456 <https://doi.org/10.1016/j.jcvex.2011.05.005>.
- Navega-Gonçalves, M.E.C., Porto, T., 2016. Conservação de serpentes nos biomas brasileiros. [Snake conservation in Brazilian biomes]. *Biotrop.* 30, 55–76.
- OIE, 2018. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines For Terrestrial Animals*. World Organization for Animal Health, Paris. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/FR/Health\\_standards/tahm/2.01.09\\_LEPTO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/FR/Health_standards/tahm/2.01.09_LEPTO.pdf).
- Oliveira, J.P., Kawanami, A.E., Silva, A.S.L., Chung, D.G., Werther, K., 2016. Detection of *Leptospira* spp. in wild Phrynosoma geoffroanus (Geoffrey's side-necked turtle) in urban environment. *Acta Trop.* 164, 165–168 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.019>.
- Ooteman, M.C., Vago, A.R., Koury, M.C., 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J. Microbiol. Methods.* 65, 247–257 <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2005.07.015>.
- Paz, L.N., Hamond, C., Dias, C.S., Curvelo, V.P., Medeiros, M.A., Oriá, A.P., Pinna, M.H., 2019. Detection of *Leptospira* spp. in captive broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Ecohealth* 16, 694–700 <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01452-0>.
- Pereira, M.M., Andrade, J., 1990. Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil - a serological and epidemiological study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 85, 47–52. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276199000100007>.
- Pérez-Flores, J., Charruau, P., Cedeño-Vázquez, R., Atliano, D., 2017. Evidence for wild crocodiles as a risk for human leptospirosis. *Mex. Ecohealth.* 14, 58–68 <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1196-7>.
- Pizzatto, L., Marques, O.A.V., Faccure, K., 2009. Food habits of Brazilian boid snakes: *Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Trop.* 30, 533–544 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.005>.
- Rodrigues, T.C.S., Santos, A.L.Q., Lima, A.M.C., Gomes, D.O., Brites, V.L.C., 2016. Anti-*Leptospira* spp. antibodies in *Crotalus durissus collilineatus* kept in captivity and its zoonotic relevance. *Acta Trop.* 158, 39–42 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.006>.
- Santos, I.O.C., Landi, M.F.A., Cruz, L.M., Bofill, M.L.R., dos Santos, D.E., Lima, E.M.M., Castro, M.B., 2017. Human leptospirosis in the federal district, Brazil, 2011–2015: eco-epidemiological characterization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Trop.* 50, 777–782 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0234-2017>.
- Schneider, A.G., Casanovas-Massana, A., Hacker, K.P., Wunder Jr., E.A., Begon, M., Reis, M.G., Childs, J.E., Costa, F., Lindow, J.C., Ko, A.I., 2018. Quantification of pathogenic *Leptospira* in the soils of a Brazilian urban slum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006415. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006415>.
- Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCausland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 247–255 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>.
- Vieira, A.S., Pinto, P.S., Lilienbaum, W., 2018. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 229–238 <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1429-y>.

## 9.2 ANEXO 02: 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 contatar 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
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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/ogen">www.mma.gov.br/ogen</a> .

#### 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

## 9.3 ANEXO 03: 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](mailto: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/BAMA 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

## 9.4 ANEXO 04: 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**