



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical

Mestrado e Doutorado

UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil

FABIANE ROCHA DE PAULA

ABORDAGEM INTEGRATIVA NA CARACTERIZAÇÃO DE *Hepatozoon*
spp. (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) EM *Helicops angulatus* E
Thamnodynastes lanei (SQUAMATA: COLUBRIDAE) DA AMAZÔNIA
ORIENTAL

MACAPÁ, AP

2021

FABIANE ROCHA DE PAULA

ABORDAGEM INTEGRATIVA NA CARACTERIZAÇÃO DE *Hepatozoon* spp.
(APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM *Helicops angulatus* E *Thamnodynastes lanei*
(SQUAMATA: COLUBRIDAE) DA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Lúcio André Viana Dias

MACAPÁ, AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Paula, Fabiane Rocha de.

Abordagem integrativa na caracterização de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: hepatozoidae) em *Helicops angulatus* e *Thamnodynastes lanei* (Squamata: colubridae) da Amazônia oriental. / Fabiane Rocha de Paula, orientador, Lúcio André Viana Dias. – Macapá, 2021.
68 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Cobra - Parasito. 2. Cobra - Amazônia. 3. Coccidia. 4. Caracterização molecular. 5. Morfologia. 6. Hemogregarinas I. Dias, Lúcio André Viana, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

597.96 P324a
CDD. 22 ed.

FABIANE ROCHA DE PAULA

ABORDAGEM INTEGRATIVA NA CARACTERIZAÇÃO DE *Hepatozoon* spp.
(APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) EM *Helicops angulatus* E *Thamnodynastes lanei*
(SQUAMATA: COLUBRIDAE) DA AMAZÔNIA ORIENTAL



Lúcio André Viana Dias

Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)



Lúcia Helena O'Dwyer de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (UNESP)



Francisco Carlos Ferreira Junior

Smithsonian Institution (SI)

Aprovada em 27 de Agosto de 2021, Macapá, AP, Brasil

Dedico esta dissertação aos meus amados pais por estarem comigo em todos os momentos importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor, por ter sido meu fiel companheiro de todas as horas. O Senhor me deu esse mestrado, abriu todos os caminhos para que eu chegasse até aqui. Além disso, foi minha morada, meu refúgio, meu caminho no deserto. Não há palavras para descrever o amor de Deus, ele é o puro amor.

Aos meus queridos pais Miguel e Selma, pelo apoio e compreensão, especialmente minha mãe, pelo cuidado, colo e amor. Grata também ao meu amado esposo, por me incentivar a nunca desistir e por cuidar de mim quando eu mesma esquecia.

Ao meu orientador Lúcio Viana, que acreditou em meu potencial. Muito obrigada por se dedicar a me ensinar os detalhes e por sua didática para me ajudar a entender. Você é um gênio, um excelente pesquisador, educador e humano.

À Amanda Picelli, que apesar de não ter sido minha coorientadora, fez o papel com maestria. Grata pela paciência, pelos ensinamentos, conselhos e orientação. Você é um exemplo a ser seguido e uma inspiração para mim.

Aos meus queridos irmãos de orientação: Jamille, Glau e Wagner. Vocês me ensinaram o que sabiam e me salvaram tantas vezes. Obrigada pela parceria e cumplicidade.

Ao meu grupo de mestrado: Glau, Yuri e Ezequiel. Vocês amenizaram qualquer sofrimento que encontramos no percurso do curso com boas risadas, obrigada por tudo pessoal.

À Universidade Federal do Amapá, por mais uma vez oportunizar acesso ao ensino e aprendizado. Grata ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical, por se dedicar em formar profissionais capacitados para a pesquisa e ensino.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Paula, Fabiane. Abordagem integrativa na caracterização de *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) em *Helicops angulatus* e *Thamnodynastes lanei* (Squamata: Colubridae) da Amazônia Oriental. Macapá, 2021. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Os parasitos do gênero *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) são comuns em serpentes e há mais de um século vem sendo descritos a partir desses hospedeiros. Até 2007, quando análises moleculares foram incorporadas à descrição, caracterizações morfológicas e morfométricas foram os principais métodos usados para a diferenciação e descrições das espécies de *Hepatozoon* de serpentes. Desde então, a taxonomia e a sistemática desses parasitos têm sido em grande parte realizada de forma integrativa, com a utilização combinada de dados morfológicos e moleculares, minimizando, assim, possíveis erros na identificação desses organismos. Apesar do aumento nos últimos anos na descrição de espécies de *Hepatozoon* de serpentes, a esmagadora maioria das espécies ainda permanece sem caracterização molecular. No Brasil, há apenas cinco espécies de *Hepatozoon* de serpentes que possuem dados moleculares. Na Amazônia brasileira, região de elevada riqueza de espécies de serpentes, não há nenhuma espécie de *Hepatozoon* nesses hospedeiros com informações genéticas associadas. Nesse contexto, a presente dissertação teve como objetivo investigar através de uma abordagem integrativa a presença de *Hepatozoon* nas serpentes *Thamnodynastes lanei* e *Helicops angulatus* da Amazônia Oriental. A dissertação está dividida em introdução geral, capítulo 1, capítulo 2 e conclusões. No capítulo 1 foi registrado o encontro de *Hepatozoon cevapii* em *T. lanei*, parasito descrito anteriormente em São Paulo na serpente *Crotalus durissus terrificus*. No segundo capítulo foi realizada a redescrição de *Hepatozoon carinicauda* em *H. angulatus*, o qual teve sua descrição original na serpente *Helicops carinicaudus* do Sudeste do Brasil. Por fim, os resultados obtidos forneceram pela primeira vez dados moleculares de *Hepatozoon* spp. de serpentes da região Amazônica, e ampliaram o conhecimento sobre a distribuição geográfica de *H. cevapii* e *H. carinicauda*.

Palavras-chave: 18S rRNA; Caracterização Molecular; Coccidia; Hemogregarinas; Morfologia; Serpentes Amazônicas.

ABSTRACT

Paula, Fabiane. Integrative approach in the characterization of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Helicops angulatus* and *Thamnodynastes lanei* (Squamata: Colubridae) from Eastern Amazon. Macapá, 2021. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Parasites of the *Hepatozoon* genus (Apicomplexa, Hepatozoidae) are common in snakes and have been described from these hosts for over a century. Until 2007, when molecular analyzes were incorporated into the description, morphological and morphometric characterizations were the main methods used for the differentiation and descriptions of *Hepatozoon* species from snakes. Since then, the taxonomy and systematics of these parasites has been largely carried out in an integrative manner, with the combined use of morphological and molecular data, thus minimizing possible errors in the identification of these organisms. Despite the increase in recent years in the description of *Hepatozoon* species of snakes, the overwhelming majority of species still remain without molecular characterization. In Brazil, there are only five *Hepatozoon* species of snakes that have molecular data. In the Brazilian Amazon, a region with a high richness of snake species, there is no *Hepatozoon* species in these hosts with associated genetic information. In this context, this dissertation aimed to investigate, through an integrative approach, the presence of *Hepatozoon* in *Thamnodynastes lanei* and *Helicops angulatus* snakes from Eastern Amazon. The dissertation is divided into general introduction, chapter 1, chapter 2 and conclusions. In chapter 1, the finding of *Hepatozoon cevapii* in *T. lanei*, a parasite previously described in São Paulo in the snake *Crotalus durissus terrificus*, was registered. In the second chapter, the redescription of *Hepatozoon carinicauda* in *H. angulatus* was performed, which had its original description in the snake *Helicops carinicaudus* from Southeastern Brazil. Finally, the results obtained provided for the first time molecular data on *Hepatozoon* spp. of snakes from the Amazon region, and increased knowledge about the geographic distribution of *H. cevapii* and *H. carinicauda*.

Keywords: 18S rRNA; Molecular Characterization; Coccidia; Hemogregarines; Morphology; Amazon Snakes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1.1. FILO APICOMPLEXA.....	12
1.1.1. TAXONOMIA E SISTEMÁTICA.....	12
1.1.2. GÊNERO <i>HEPATOZOOON</i> MILLER, 1908	13
1.1.3. CICLO DE VIDA DE <i>HEPATOZOOON</i>	15
1.1.4. <i>HEPATOZOOON</i> EM SERPENTES BRASILEIRAS	17
1.2 SERPENTES DA FAMÍLIA COLUBRIDAE.....	22
1.2.1. <i>HELICOPS ANGULATUS</i> E <i>THAMNODYNASTES LANEI</i>	23
1.3 JUSTIFICATIVA	25
2. HIPÓTESES	27
3. OBJETIVOS	28
3. 1. GERAL	28
3. 2. ESPECÍFICOS.....	28
4. REFERÊNCIAS	29
5. CAPÍTULO 1.....	40
<i>Hepatozoon cevapii</i> (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) IN THE <i>THAMNODYNASTES LANEI</i> SNAKE (COLUBRIDAE, TACHYMENINI) FROM THE EASTERN AMAZON, BRAZIL	40
6. CAPÍTULO 2.....	42
A FIFTY-YEARS OLD REDESCRIPTION: MOLECULAR AND MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF <i>Hepatozoon carinicauda</i> (PESSÔA AND CAVALHEIRO, 1969) IN THE BROWN-BANDED WATER SNAKE <i>Helicops angulatus</i> (LINNAEUS, 1758).....	42
7. CONCLUSÕES	68
7.1 COMENTÁRIOS FINAIS	68
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. FILO APICOMPLEXA

O Filo Apicomplexa (stricto sensu) Levine, 1970 é um grupo de parasitos unicelulares considerado monofilético quando levado em conta apenas hematozoários, coccídios, gregarinas e cryptosporidianos (Votýpka et al. 2017, Janouskovec et al. 2019), cujos ciclos de vida podem envolver um (monoxeno) ou mais hospedeiros (heteroxeno) (Smith 1996). Detém mais de 300 gêneros reconhecidos em pelo menos 60 famílias, totalizando mais de 6000 espécies descritas, constituindo, assim, um dos maiores componentes da biodiversidade mundial (Morrison 2009, Votýpka et al. 2017). Apesar disso e do aumento nos últimos anos das pesquisas, a biodiversidade do Filo Apicomplexa ainda é pouco conhecida, com estimativas de milhares de espécies não descritas (Morrison 2009, Pawlowski et al. 2012, Votýpka et al. 2017).

Uma sinapomorfia presente nos componentes desse filo é o complexo apical, um conjunto de estruturas que consiste em anéis polares, roptrias, micronemas, microtúbulos conóides e subpeliculares (Levine 1971). O complexo apical auxilia os parasitos nos processos de entrada e estabelecimento dentro da célula hospedeira, é o responsável pelo sucesso evolutivo do grupo (Votýpka et al. 2017). As organelas secretoras, roptrias e micronemas, e grânulos densos, que se localizam mais distante do complexo apical, se destacam na invasão celular. Pois, são responsáveis pela proteção do parasito contra a célula hospedeira e na formação do vacúolo parasitóforo, que é um compartimento derivado da invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira induzida pela fixação e invasão do parasito (Dubremetz et al. 1998, Clough e Frickel 2017, Votýpka et al. 2017). O vacúolo parasitóforo possibilita a multiplicação e diferenciação do parasito, permitindo a absorção de nutrientes da célula hospedeira (Clough e Frickel 2017, Matz et al. 2020).

Em relação aos hospedeiros, ocorrem de invertebrados até vertebrados mais complexos (Leander 2008). São parasitos comuns de animais silvestres (Daszak et al. 2000), com alguns gêneros (ex. *Hepatozoon* e *Plasmodium*) sendo extremamente diversificados em hospedeiros vertebrados, sobretudo entre os répteis (Duszynski 2021). Há estimativas de que provavelmente todos os vertebrados e a maioria dos invertebrados alberguem pelo menos uma espécie de Apicomplexa (Morrison 2009), e/ ou ainda que uma única espécie de hospedeiro possa estar infectada por uma dezena de espécies desses parasitos que infectam diferentes tecidos (Votýpka et al. 2017).

Devido ao seu hábito parasitário, muitas espécies do filo estão entre as mais conhecidas e estudadas por apresentarem elevada importância médica humana e veterinária (Morrison 2009). Dentre essas, se destacam algumas espécies de *Plasmodium* Marchiafava e Celli, 1885, causadoras da malária humana (WHO 2019), e *Toxoplasma gondii* (Nicollle e Manceaux, 1908), responsável pela toxoplasmose que acomete cerca de um terço da população humana mundial (Saadatnia e Golkar 2012). Além dessas, há os de importância veterinária que impactam diretamente indústria alimentícia por causarem mortes e/ou diminuição do ganho de peso em animais de produção, é o caso de espécies de *Eimeria* Schneider, 1875, que causam infecções em aves, coelhos e ruminantes, e *Babesia* e *Theileria* Bettencourt et al., 1907 agente etiológico da teileriose em animais da pecuária (Votýpka et al. 2017).

1.1.1. TAXONOMIA E SISTEMÁTICA

Na literatura há variação na classificação taxonômica de alguns grupos do Filo Apicomplexa (Votýpka et al. 2017, Adl et al. 2019). O presente trabalho optou pela classificação de Adl et al. (2019) que define Conoidasida e Aconoidasida como classes (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação do Filo Apicomplexa, baseado em Adl et al. (2019).

Filo **Apicomplexa** Levine, 1970 emend. Adl et al., 2005

Classe: **Conoidasida** Levine, 1988

Ordem: **Coccidia** Leuckart, 1879

Ordem: **Gregarinasina** Dufour, 1828

Ordem: **Blastogregarinea** Chatton e Villeneuve, 1936 emend. Simdvanov et al. 2018

Classe: **Aconoidasida** Mehlhorn, Peters e Haberkorn, 1980

Ordem: **Haemospororida** Danilewsky, 1885

Ordem: **Piropasmorida** Wenyon, 1926

Ordem: **Nephromycida** Cavalier-Smith, 1993 emend. Adl et al. 2019

1.1.1.1. ORDEM COCCIDIA LEUCKART, 1879

Essa ordem pertencente à classe Conoidasida, é considerada uma ordem muito importante para os estudos sobre o Filo Apicomplexa, por ser encontrada infectando todas as classes de vertebrados (Votýpka et al. 2017, Duszynski 2021). São parasitos que podem estar presentes no citoplasma ou núcleo da célula hospedeira, atingindo diferentes órgãos (Votýpka et al. 2017).

Está dividida entre duas subordens, Eimeriorina Léger, 1911 e Adeleorina Léger, 1911. Os principais representantes de Eimeriorina são os gêneros: *Caryospora* Léger, 1904; *Cyclospora* Schneider, 1881; *Eimeria*; *Goussia* Labbé, 1896; *Isospora* Schneider, 1881; *Lankesterella* Labbé, 1899; *Neospora* Dubey et al., 1988; *Sarcocystis* Lankester, 1882; e *Toxoplasma*. Para Adeleorina os principais gêneros são: *Adelina* Hesse, 1911; *Dactylosoma* Lebbé, 1889; *Haemogregarina* Danilewsky, 1885; *Haemolivia* Petit et al., 1990; *Hepatozoon* Miller, 1908; *Karyolyssus* Labbé, 1894; e *Klossia* Schneider, 1875 (Adl et al. 2012, Votýpka et al. 2017). Alguns integrantes de Adeleorina são classificados como hemogregarinas, como as famílias Haemogregarinidae (*Haemogregarina*), Hepatozoidae (*Hepatozoon*) e Karyolysidae (*Karyolyssus* e *Haemolivia*). As hemogregarinas provavelmente estão entre os hemoparasitos mais frequentes dos vertebrados, principalmente em répteis, as quais podem ser observadas parasitando eritrócitos e eventualmente leucócitos (Telford 2009).

1.1.2. GÊNERO *HEPATOZOON* MILLER, 1908

Dentre as hemogregarinas, *Hepatozoon* se destaca por ser o gênero mais diversificado e prevalente do grupo, em termos de espécies descritas, capaz de parasitar anfíbios, répteis, aves e mamíferos. No entanto, possui particular predominância em serpentes, as quais detêm a maioria das descrições do gênero (Smith 1996, Maia et al. 2016, Hrazdilová et al. 2021, Zechmeisterová et al. 2021).

O número de espécies de *Hepatozoon* para hospedeiros vertebrados foi catalogado pela última vez há mais de 20 anos por Smith (1996). Na época o gênero contava com 328 espécies descritas e dessas 37% (n = 121) descritas em serpentes. Até então as espécies eram

descritas por análises morfométrica e morfológica, principalmente, dos gamontes encontrados no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados (Sloboda et al. 2007). Os gamontes são formas parasitárias de *Hepatozoon* que infectam eritrócitos, que em geral são alongados e possuem núcleo localizado ao centro ou à margem do parasito (Smith 1996, Telford 2009, Votýpka et al. 2017). Assim, os gamontes eram analisados microscopicamente, desenhados e ou fotografados para comparações com outros gamontes previamente descritos, quanto ao aspecto do núcleo, deformações causadas na célula hospedeira, tamanho de parasito e da célula hospedeira (comprimento, largura e área) (Telford 2009).

Os estudos mais antigos consideravam que *Hepatozoon* apresentava alta especificidade, assim, os parasitos relatados em uma determinada espécie de hospedeiro poderiam ser considerados como espécies novas, independentemente de terem sido observados em outros hospedeiros (Smith 1996, Sloboda et al. 2007). O advento de técnicas moleculares nos últimos 15 anos na descrição desses parasitos em serpentes revolucionou a taxonomia do grupo (Sloboda et al. 2007). Uma vez que a morfologia pode ser limitada, principalmente por necessitar dos estágios de vida e das características do parasito que podem ser indistinguíveis de um para outro (Harris et al. 2011; Perkins et al. 2011). No entanto, a caracterização molecular também possui algumas desvantagens. Dependendo da escolha do marcador molecular, alguns agrupamentos de espécies podem ser ou não sustentados, e gerar estimativas errôneas de árvores genéticas mesmo que suportadas (Perkins et al. 2011). Assim, a taxonomia com o uso combinado de informações morfológicas e moleculares fornece uma identificação mais robusta para as espécies de *Hepatozoon* (Perkins et al. 2011).

Com o avanço da biologia molecular e suas ferramentas, o estudo genético desses parasitos começou a ser incorporado nos trabalhos de taxonomia, inicialmente através do emprego do gene ribossomal 18S (18S rRNA) como marcador molecular (Sloboda et al. 2007). Desde então, dezenas de espécies *Hepatozoon* foram descritas a partir de taxonomia integrativa com o uso de técnicas de microscopia e moleculares, onde as descrições de espécies que infectam serpentes ainda se sobressaem (Maia et al. 2016, Hrazdilová et al. 2021 Zechmeisterová et al. 2021).

O 18S rRNA continua a ser o marcador mais usado nas análises filogenéticas das hemogregarinas (Hrazdilová et al. 2021) e se mostra eficaz na distinção entre espécies de *Hepatozoon* (Üngari et al. 2018, 2021). No entanto, recentemente, uma grande discussão formou-se sobre o uso de outros marcadores moleculares, principalmente os mitocondriais, de forma a obter respostas mais claras sobre as relações evolutivas entre as hemogregarinas, sobretudo para aqueles táxons que, como *Hepatozoon*, não são monofiléticos (Abdel-Baki et

al. 2014, Maia et al. 2016, Cook et al. 2018, Gutierrez-Liberato et al. 2021, Harris et al. 2019, Hrazdilová et al. 2021). A ocorrência de parafiletismo de *Hepatozoon*, de fato, tem gerado uma busca pela estabilidade taxonômica do gênero. Tal fato, se reflete na proposta de um novo gênero por Karadjian et al. (2015), o “*Bartazoon*”, para hospedeiros não-carnívoros de *Hepatozoon* (répteis, anfíbios, morcegos, roedores e marsupiais), mas foi desconsiderado pela ausência de dados genéticos da espécie tipo *Hepatozoon muris* (Miller, 1908) e por ser instável dependendo da técnica de análise dos dados utilizada (Maia et al. 2016, Hrazdilová et al. 2021). Dessa forma, há um consenso científico em continuar a classificar como *Hepatozoon* os organismos que apresentam as características morfológicas do grupo e que estejam posicionados em um dos dois principais clados do táxon, divididos entre hospedeiros carnívoros e não-carnívoros (Maia et al. 2016, Hrazdilová et al. 2021).

1.1.3. CICLO DE VIDA DE *HEPATOZOON*

As espécies de *Hepatozoon* apresentam ciclo de vida heteroxeno, caracterizado pela participação de invertebrados hematófagos como vetores e hospedeiros definitivos, e de um ou mais vertebrados como hospedeiros intermediários. Para espécies de *Hepatozoon* que usam serpentes como hospedeiras intermediárias, a maioria dos estudos com ciclo de vida indicam mosquitos como vetores e ratos, sapos, lagartos ou outras cobras como hospedeiros paratênicos (Smith 1996, Votýpka et al. 2017). Além disso, há a possibilidade de transmissão vertical, quando o filhote é infectado pela mãe (Kauffman et al. 2017).

O ciclo de vida ontogenético, característico dos Apicomplexa, compreende as fases: merogonia (replicação assexuada) com divisão por fissão múltipla resultando em merozoítos; gametogonia (replicação sexuada) com processo de produção de gametas que culmina com a formação do zigoto; e esporogonia (replicação assexuada) resultando no estágio esporozoíto (Smith 1996) (Figura 1).

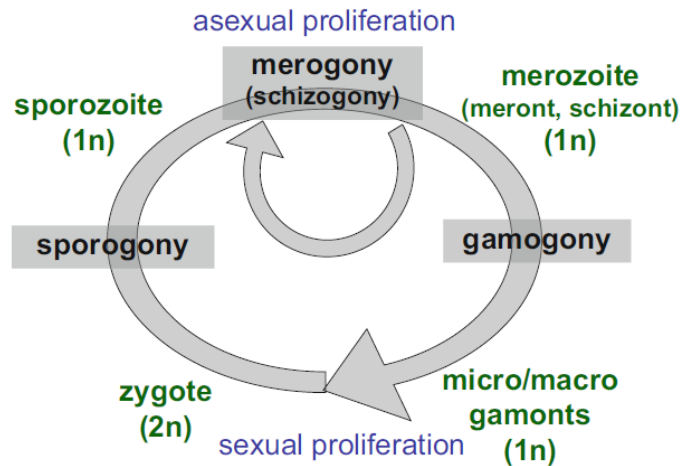


Figura 1 – Esquema sobre as fases replicativas do ciclo de vida de um Apicomplexa. Adaptado de Votýpka et al. (2017).

Em serpentes, quando os gamontes (células que se dividem em gametas) intraeritrocitários de *Hepatozoon* são ingeridos por artrópodes hematófagos (Fonseca et. al 2020), mediante hematofagia (Figura 2a), os seus macrogamontes e microgamontes invadem a parede intestinal do mosquito para chegar até a sua hemocele (Figura 2b) e no corpo adiposo, se associam em sizígia (ocorrendo após a gametogênese). Um dos microgametas (2 ou 4) formado pela divisão do microgamonte, fertiliza o macrogameta (Figura 2c). Essa união resulta no oocisto (Figura 2d) que se expande até ter centenas de esporocistos contendo inúmeros esporozoítos (Figura 2e, f) —componente característico do ciclo em invertebrados e que serão ingeridos por hospedeiros paratênicos: sapos, lagartos, ratos ou outros (Votýpka et al. 2017), até peixes podem ser possíveis, uma vez que experimentalmente foi observado para *Hepatozoon* de répteis aquáticos (Pereira et. al 2014) (Figura 2g). Uma vez no intestino delgado dos mesmos, os esporozoítos chegam aos vasos sanguíneos e podem daí alcançar inúmeros órgãos, sobre tudo o fígado, onde se diferenciam, formando cistos com 2 cistozoítos, estágio dormente (Figura 2h). As serpentes predam artrópodes infectados com oocistos ou hospedeiros paratênicos infectados com cistozoítos que são liberados no intestino da serpente (Figura 2ij). Na sequência ocorre merogonia, macromerontes contendo macromerozoítos formam-se e pela corrente sanguínea infectam as suas vísceras, fígado, pulmão ou outros órgãos (Figura 2k). Novamente ocorre merogonia, dessa vez formando micromerontes com micromerozoítos (Figura 2m), os quais são liberados na corrente sanguínea e infectam eritrócitos, transformando-se em gamontes que, por sua vez, serão ingeridos por mosquitos (Figura 2n) (Lee et al. 1985, Smith 1996).

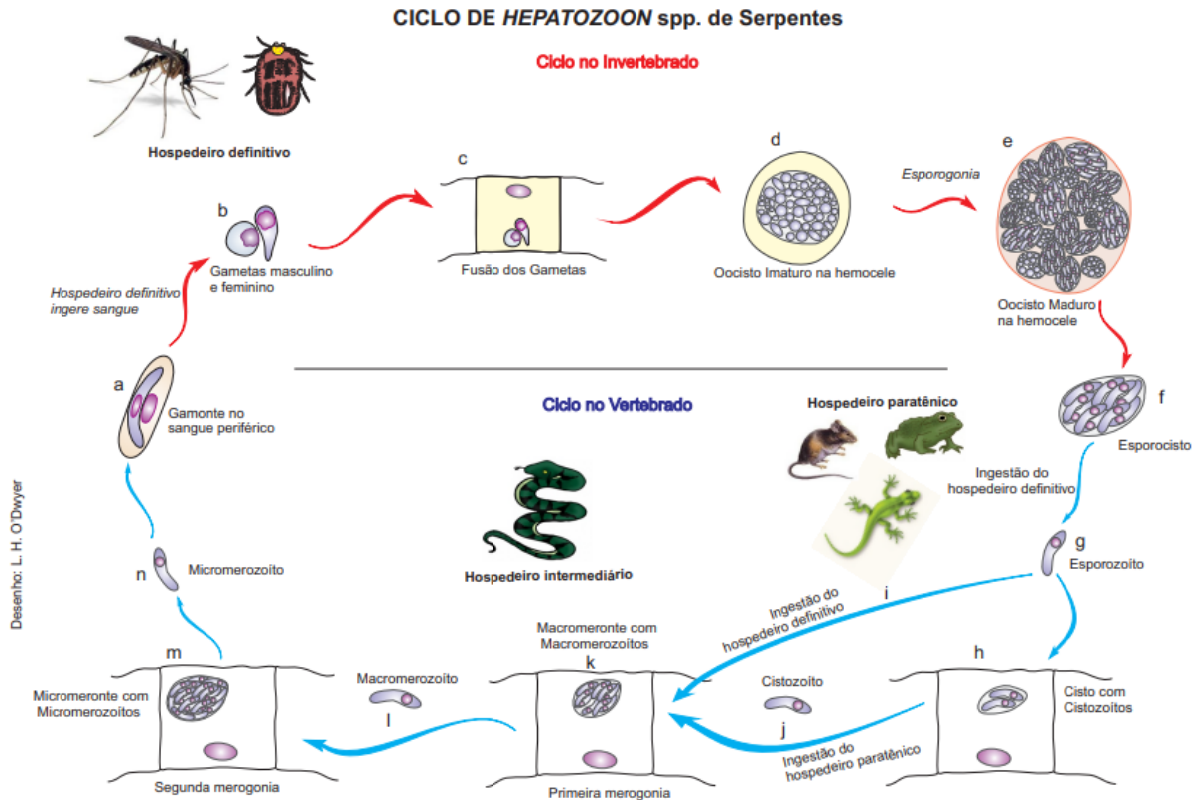


Figura 2 – Diagrama do ciclo de vida de *Hepatozoon* spp. em serpentes. (a) Gamontes em eritrócitos são ingeridos pelo vetor. Os micro e macrogamontes atravessam a parede intestinal e na hemocele penetram em células adiposas onde formam os (b) gametas masculino e feminino. (c) Fusão dos gametas. (d) Formação de oocisto imaturo na hemocele do vetor. (e) Ocorre a esporogonia com a formação de oocistos maduros contendo esporocistos (f) com esporozoítos (g) dentro. (h) Um hospedeiro paratênico (roedor, anfíbio, lagarto) ingere o vetor com a liberação de esporozoítos que penetram nas células formando cistos com cistozoítos e células de diferentes órgãos. O hospedeiro intermediário se infecta ingerindo o vetor contendo os oocistos (i) ou ingerindo o hospedeiro paratênico contendo os cistozoítos (j). (k) Esporozoítos ou cistozoítos, liberados no intestino da serpente, atravessam a parede intestinal e penetram em células de diferentes órgãos, formando macromerontes com macromerozoítos. (l) Os macromerozoítos liberados penetram em outras células formando (m) micromerontes com micromerozoítos. (n) Micromerozoítos liberados penetram nos eritrócitos formando os (a) gamontes.

1.1.4. *HEPATOZOON* EM SERPENTES BRASILEIRAS

Aproximadamente 35 espécies descritas de *Hepatozoon* foram associadas com mais de 30 espécies de serpentes brasileiras, distribuídas entre as famílias Colubridae Oppel, 1811,

Boidae (Gray, 1825) e Viperidae Opperl, 1811, oriundas principalmente da região sudeste do Brasil (Tabela 2). No entanto, até o momento, dentre essas espécies apenas cinco foram acessadas molecularmente (O'Dwyer et al. 2013, Borges-Nojosa et al. 2017, Úngari et al. 2018, Úngari et al. 2021).

A primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* de serpentes brasileiras ocorreu em 2013 e resultou nas descrições de *Hepatozoon cevapii* O'Dwyer et al. 2013, *Hepatozoon cuestensis* O'Dwyer et al. 2013 e *Hepatozoon masardii* O'Dwyer et al. 2013, a partir da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) (O'Dwyer et al. 2013). Posteriormente, houve a descrição de *Hepatozoon musa* Borges-Nojosa et al. 2017 em *Phylodrias nattereri* (Steindachner, 1870) (Borges-Nojosa et al. 2017), e mais recentemente *Hepatozoon quagliattus* Úngari et al. 2021 em *Dipsas mikanii* (Schlegel, 1837) (Úngari et al. 2021).

Com relação às serpentes da Amazônia brasileira, existem poucas espécies de *Hepatozoon* descritas, onde não há qualquer informação molecular associada e poucos dados até mesmo sobre a morfologia e morfometria desses parasitos (Pessoa et al. 1970a, Paperna e Lainson 2003, 2004). Pessoa et al. (1970a) descreveram a merogonia de *Hepatozoon luhei* (Sambon, 1909) nas serpentes *Corallus caninus* (Linnaeus, 1758) e *Corallus hortulanus* (Linnaeus, 1758), provenientes do Estado do Amapá; e esporogonia nos mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 que eram mantidos em laboratório. Paperna e Lainson (2003) identificaram *Hepatozoon terzii* (Sambon e Siligmann 1907) em *Boa constrictor* Linnaeus, 1758 no Estado do Pará, mas sem fornecer dados morfológicos do parasito. Um ano depois, os mesmos autores descreveram, experimentalmente, o ciclo de vida de *H. terzii* envolvendo a serpente *B. constrictor*, o hospedeiro definitivo experimental, o mosquito *C. quinquefasciatus*, e como hospedeiro paratênico o lagarto *Tropidurus torquatus* (Wied-Neuwied, 1820). Em um estudo mais recente também no Estado do Pará, serpentes *B. constrictor* foram identificadas com *Hepatozoon* sp., mas sem qualquer caracterização do parasito (Luz et al. 2012).

Tabela 2 – Lista de espécies de *Hepatozoon* que infectam serpentes brasileiras.

Família/espécie de serpente	<i>Hepatozoon</i> sp.	Localidade	Referência
Boidae			
<i>Boa constrictor</i>	<i>H. juxtannuclearis</i>	Brasil	Carini (1947); Pessôa (1967a)
	<i>H. terzii</i>	Botucatu-SP; Pará	Moço et al. 2002; Paperna e Lainson (2003; 2004)
<i>Corallus caninus</i>	<i>H. luhei</i>	Amapá	Pessôa et al. (1970a)
<i>Corallus hortulanus</i>	<i>H. luhei</i>	Santos e Juquiá - SP; Amapá	Pessôa et al. (1970a)
<i>Corallus</i> spp.	<i>H. corallus</i>	Santos - SP	Pessôa e Cavalheiro (1970)
<i>Epicrates crassus</i>	<i>H. cenchridis</i>	Brasil	Pessôa e Cavalheiro (1969a)
	<i>H. musa</i>	Uberlândia - MG	Úngari et al. (2018)
Colubridae			
<i>Chironius bicarinatus</i>	<i>H. bicarinati</i>	Brasil	Pessôa e Cavalheiro (1969a)
<i>Chironius flavolineatus</i>	<i>H. chironiusi</i>	Ponta Grossa - PR	Pessôa (1967b)
<i>Chironius laevicollis</i>	<i>H. laevicollis</i>	Mogi das Cruzes - SP	Pessôa (1967c)
<i>Dipsas mikanii</i>	<i>H. quagliattus</i>	Britânia - GO	Úngari et al. (2021)
<i>Dryadophis bifossatus</i>	<i>H. drymobii</i>	Brasil	Marullaz (1912); Pessôa (1967d)
<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	<i>H. colubri</i>	São Paulo - SP	Pessôa (1967c)
<i>Helicops angulatus</i>	<i>H. carinicauda</i>	Macapá - AP	Este estudo
<i>Helicops carinicaudus</i>	<i>H. carinicauda</i>	Votuporanga - SP	Pessôa e Cavalheiro (1969b)
<i>Helicops modestus</i>	<i>H. modesta</i>	Jundiá - SP	Pessôa e Cavalheiro (1969a)
<i>Hydrodynastes gigas</i>	<i>H. migonei</i>	Mato Grosso; Adamantina - SP; Botucatu - SP	Pessôa et al. (1970); Moço et al. (2002)

Cont. Tabela 2

Família/espécie de serpente	<i>Hepatozoon</i> sp.	Localidade	Referência
Colubridae			
<i>Hydrodynastes gigas</i>	<i>H. cyclagrassi</i>	Mato Grosso; Adamantina -SP; Botucatu - SP	Arantes (1934); Pessôa et al. (1970b); Moço et al. (2002)
	<i>H. gigas</i>	Mato Grosso	Pessôa e Cavalheiro (1970)
<i>Liophis miliaris</i>	<i>H. miliaris</i>	São Paulo	Pessôa (1968) / Pessôa e Cavalheiro (1969c)
<i>Leimadophis poecilogyrus</i>	<i>H. leimadophis</i>	Água Branca - ES	Pessôa (1967b)
	<i>H. poecilogyrus</i>	Mato Grosso	Pessôa (1967b)
<i>Philodryas aestiva</i>	<i>H. butatanensis</i>	Brasil	Pessôa (1928)
	<i>H. philodriasi</i>	Brasil	Pessôa e Cavalheiro (1969a)
<i>Philodryas nattereri</i>	<i>H. musa</i>	Upanema - RN	Borges-Nojosa et al. (2017)
	<i>H. philodriasi</i>	São Paulo - SP	Carini (1910); Pessôa (1967a)
<i>Philodryas patogoniensis</i>	<i>H. philodriasi</i>	São Paulo; Botucatu - SP	Carini (1910); Pessôa (1967a); Moço et al. (2002)
<i>Pseudoboa nigra</i>	<i>H. pseudoboae</i>	São Paulo - SP	Pessôa (1967a)
<i>Spilotes pullatus</i>	<i>H. pullatus</i>	Mato Grosso	Pessôa (1968)
<i>Thamnodynastes lanei</i>	<i>H. cevapii</i>	Macapá - AP	Este estudo
<i>Thamnodynastes pallidus</i>	<i>H. pallida</i>	Juiz de Fora - MG	Pessôa et al. (1971a)
<i>Thamnodynastes strigatus</i>	<i>H. strigatus</i>	São Paulo	Pessôa (1967a) / Pessôa et al. (1970c)
<i>Xenodon merremii</i>	<i>H. arantesi</i>	Andradina - SP	Arantes (1931) / Pessôa (1967b)
Viperidae			
<i>Bothrops alternatus</i>	<i>H. roueli</i>	São Paulo-SP	Phisalix e Laveran (1913); Pessôa et al. (1972)

Cont. Tabela 2

Família/espécie de serpente	Hepatozoon sp.	Localidade	Referência
Viperidae			
<i>Bothrops jararacussu</i>	<i>H. jararacussu</i>	Brasil	Pessôa (1968)
<i>Bothrops jararaca</i>	<i>H. plimмери</i>	São Paulo	Pessôa (1967c); De Biasi et al. (1989)
<i>Bothrops moojeni</i>	<i>H. plimмери</i>	Brasil	Pessôa et al. (1971b)
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	<i>H. crotali</i>	Remanso - BA	Pessôa (1967e)
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	<i>H. romani</i>	Brasília - DF	Pessôa (1967e)
	<i>H. capsulata</i>	Brasília - DF	Pessôa (1967e)
<i>Crotalus durissus</i>	<i>H. cuestasensis</i>	Uberlândia - MG	Úngari et al. (2018)
	<i>H. cevapii</i>	Botucatu - SP	O'Dwyer et al. (2013)
	<i>H. musa</i>	Uberlândia - MG	Úngari et al. (2018)
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	<i>H. romani</i>	São Paulo; Mato Grosso	Pessôa (1967e)
	<i>H. massardii</i>	Botucatu - SP	O'Dwyer et al. (2013)
	<i>H. capsulata</i>	São Paulo	Pessôa (1967e)
	<i>H. cuestasensis</i>	Botucatu - SP	O'Dwyer et al. (2013)

1.2 SERPENTES DA FAMÍLIA COLUBRIDAE

Colubridae é a maior família de serpentes do mundo, onde das mais de 3879 espécies de serpentes conhecidas, pelo menos 2031 são colubrídeos (Uetz et al. 2021). Os membros dessa família possuem uma ampla variedade de características morfológicas dentro de cada subfamília, variando em tamanho, formas, cores, escamações e comportamentos (Amr e Disi 2011). Podem ser terrestres, aquáticos, arbóreos ou fossoriais, além de possuírem hábitos alimentares muito diversificados. Podem apresentar dentição áglifa ou opistóglifa, razão pela qual algumas espécies podem inocular veneno, apesar de ainda serem tratadas como não venenosas em parte da literatura (Amr e Disi 2011, Fraga et al. 2013). A subfamília Dipsadinae destaca-se por muitas de suas espécies possuírem a dentição opistóglifa e serem relatadas em episódios de acidentes envenenando humanos, apresentando toxicidade leve ou alta. É o caso das serpentes *Phylodrias* Wagler, 1830, *Helicops* Wagler, 1830 e *Thamnodynastes* Wagler, 1830 (Rocha et al. 2006, Estrella et al. 2011, Peichoto et al. 2012, Junqueira-de-Azevedo et al 2016, Araújo et al. 2018).

Colubridae é considerada um agrupamento não natural de espécies de serpentes devido as divergências observadas nas reconstruções filogenéticas do grupo (Zaher et al. 2009, Pyron et al. 2013). Na definição mais recente, Colubridae possui cerca de sete subfamílias, Natricinae, Calamariinae, Grayiinae, Pseudoxenodontinae, Sibynophiinae, Dipsadinae e Colubrinae (Pyron et al. 2013). Dipsadinae (817 espécies) e Colubrinae (756 espécies) são as subfamílias mais numerosas e as únicas com representantes ocorrendo em território brasileiro e na Amazônia (Fraga et al. 2013, Costa e Bernils 2018, Uetz et al. 2021). Foram registradas aproximadamente 306 espécies de Dipsadinae no Brasil, dessas 50 espécies podem ser encontradas no Amapá. Enquanto que para Colubrinae há 39 espécies descritas em todo território nacional, das quais 19 estão presentes no Amapá (Costa e Bernils 2018). Dipsadinae e Colubrinae possuem morfologias e aspectos ecológicos muito diversificadas entre si e dentro da própria subfamília (Fraga et al. 2013). Além disso, as duas subfamílias apresentam notório distanciamento filogenético, observado nas extremidades do clado dos colubrídeos (Uetz et al. 2021).

Entre as serpentes registradas como hospedeiras de *Hepatozoon* no Brasil, os colubrídeos também se destacam, com 21 espécies de hepatozoídeos em 22 espécies de serpentes desta família (Tabela 2). Dentre essas encontram-se dois gêneros de Dipsidinae: *Helicops*, hospedeira de *Hepatozoon modesta* Pessôa and Cavalheiro, 1969 e *Hepatozoon carinicauda* Pessôa and Cavalheiro, 1969; e *Thamnodynastes*, com *Hepatozoon strigatus*

Pessoa, 1967 e *Hepatozoon pallida* Pessôa et al. 1971. Contudo, como registros de *Hepatozoon* nessas serpentes ocorreram há mais de cinquenta anos, consequentemente, esses parasitos não possuem caracterização molecular e nem dados morfológicos tão detalhados como os que temos atualmente nas descrições de espécies (Pessôa 1967a, Pessôa e Cavalheiro 1969ab, Pessôa et al. 1971).

1.2.1. *HELICOPS ANGULATUS* E *THAMNODYNASTES LANEI*

Helicops é um gênero que compreende 19 espécies de serpentes amplamente distribuídas na América do Sul (Uetz et al. 2021). São serpentes estritamente aquáticas, de hábitos noturnos e de pequeno porte (Fraga et al. 2013). No Brasil, 15 espécies são relatadas, das quais metade são endêmicas do país (Schoneberg e Kohler 2021). No Amapá há o relato de cinco espécies do gênero: *Helicops hagmanni* Roux, 1910, *Helicops leopardinus* (Schlegel, 1837), *Helicops polylepis* Gunther, 1861, *Helicops trivittatus* (Grey, 1849) e *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758) (Costa e Bérnils 2018).

No caso de *H. angulatus* (Figura 3), essas serpentes são conhecidas por representarem um complexo de espécies crípticas (Murphy et al. 2020), com registros no Brasil nos biomas Amazônicos, floresta seca de Chiquitano, Cerrado, Caatinga e porção norte da Mata Atlântica (Nogueira et al. 2019). As serpentes fêmeas da espécie podem alcançar cerca de 1 m de comprimento, os machos são alguns centímetros menores (Fraga et al. 2013, Freitas 2014). Possuem dieta composta principalmente por peixes e anuros (Aguiar e Di-Bernado 2004, Ávila et al. 2006, Carvalho et al. 2017). Morfologicamente *H. angulatus* se destingue das demais espécies do gênero pela coloração das manchas ventrais, seu número de fileiras e pela cor dos losangos dorsais (Murphy et al. 2020). A coloração do dorso é formada por manchas marrom-escuras e marrom-claras, as manchas do ventre possuem faixas pretas que intercalam com cores avermelhadas em jovens ou bege em adultos (Fraga et al. 2013). No entanto, a coloração pode variar entre os espécimes de diferentes regiões geográficas (Murphy et al. 2020).

Os modos reprodutivos em *H. angulatus* podem ser vivíparos ou ovíparos, variando conforme localização geográfica dos espécimes (Braz et al. 2016). Um modo reprodutivo singular entre as serpentes, por essa razão a espécie é muito importante em estudos sobre compreensão da evolução da reprodução das serpentes. No entanto, a crescente destruição e poluição de ambientes aquáticos ameaça a sobrevivência da espécie (Murphy et al. 2020).



Figura 3 – Serpente *Helicops angulatus*. Fonte: Freitas (2014).

Thamnodynastes é um gênero composto por 21 espécies de serpentes relativamente pequenas, vivíparas e opistóglifas, que ocorrem na América do Sul (Uetz et al. 2021). No Brasil, são registradas 12 espécies e dessas apenas *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758) e *Thamnodynastes lanei* Bailey et al. 2005 já foram reportadas no Amapá (Costa e Bérnils 2018).

Thamnodynastes lanei (Figura 4) são serpentes noturnas que ocupam ambientes de vegetação de arbustos e gramas grossas, frequentemente associadas a áreas inundadas sazonalmente ou ao longo de grandes cursos d'água (Bailey et al. 2005). A dieta segue o padrão de outras espécies do seu gênero, composta por rãs, lagartos, pequenos mamíferos e eventualmente peixes (Bernarde et al. 2000; Bortolanza-Filho et al. 2019). A reprodução destas serpentes é vivipara, assim como nas demais espécies do gênero (Bellini et al. 2014).

A diferenciação de *T. lanei* pode ser observada pela análise das seguintes características: presença de dorsais esquilhadas; número de fileiras da escala dorsal; números de faixas ventrais longitudinais; comprimento máximo da abertura do focinho; e comprimento da cauda (Zaher 2021). São serpentes com listras ventrais geralmente muito pálidas, e que alcançam o tamanho de 65 centímetros (Bailey et al. 2005).



Figura 4 – Serpente *Thamnodynastes lanei*. Fonte: Uetz et al. (2021).

1.3 JUSTIFICATIVA

A investigação de *Hepatozoon* em serpentes é primordial para o entendimento taxonômico do gênero, no contexto da relação entre suas espécies e as relações filogenéticas (Maia et al. 2016). Além disso, quanto mais espécimes de *Hepatozoon* de serpentes forem investigadas, estudos de filogeografia poderão ser realizados, revelando a relação geográfica que possa existir entre parasito e hospedeiro (Zechmeisterová et al. 2021).

A Amazônia brasileira, embora concentre a maior diversidade de espécies de serpentes do Brasil (Costa e Bérnils 2018), possui relativamente menos espécies descritas de *Hepatozoon* de serpentes do que a região sudeste, um contraste provavelmente associado aos poucos exames realizados na região. Além disso, a última caracterização de *Hepatozoon* de serpentes da região ocorreu em 2004, através de análise morfológica e morfométrica (Paperna e Lainson, 2004). Portanto, este estudo tem como objetivo investigar de forma integrativa, usando dados morfológicos e moleculares, a ocorrência dos parasitos *Hepatozoon* em hospedeiros colubrídeos, *T. lanei* e *H. angulatus*, da região da Amazônia Oriental, Brasil. Contribuindo, assim, para ampliar o conhecimento taxonômico e sobre a distribuição

geográfica de *Hepatozoon* de serpentes, contemplando a Amazônia brasileira com as primeiras sequências de *Hepatozoon*.

2. HIPÓTESES

H1: As espécies de *Hepatozoon* das serpentes *Thamnodynastes lanei* diferem dos parasitos de *Helicops angulatus*.

H2: *Hepatozoon* spp. de hospedeiros aquáticos, assim como *Hepatozoon* spp. de *Helicops angulatus*, são monofiléticos.

H3: As espécies de *Hepatozoon* de *Thamnodynastes lanei* e *Helicops angulatus* posicionam-se filogeneticamente agrupados as demais sequências de *Hepatozoon* de hospedeiros da América do Sul.

3. OBJETIVOS

3. 1. GERAL

Investigar, através de uma abordagem integrativa, a presença de *Hepatozoon* em duas espécies de colubrídeos, *Thamnodynastes lanei* e *Helicops angulatus* da Amazônia Oriental.

3. 2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar taxonomicamente, usando ferramentas moleculares e de microscopia de luz, as espécies de *Hepatozoon* que parasitam as serpentes *Thamnodynastes lanei* e *Helicops angulatus*.
- Determinar as relações filogenéticas de *Hepatozoon* spp. encontrados nas serpentes *Thamnodynastes lanei* e *Helicops angulatus* com as outras linhagens do parasito.

4. REFERÊNCIAS

- Abdel-Baki, A. A., S. Al-Quraishy, and J. Zhang. 2014. Redescription of *Haemogregarina garnhami* (Apicomplexa: Adeleorina) from the blood of *Psammophis schokari* (Serpentes: Colubridae) as *Hepatozoon garnhami* n. comb. based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Acta Parasitologica* 59: 294–300.
- Adl, S. M., D. Bass, C. E. Lane, J. Lukeš, C. L. Schoch, A. Smirnov, ... and Q. Zhang. 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of eukaryotic microbiology* 66:4–119.
- Aguiar, L. F. S., and M. Di-Bernardo. 2004. Diet and feeding behavior of *Helicops infrataeniatus* (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 39:7–14.
- Amr, Z. S., and A. M. Disi. 2011. Systematics, distribution and ecology of the snakes of Jordan. *Vertebrate Zoology* 61:179–266.
- Araújo, P. F. D., W. M. D. Silva, R. C. D. França, and F. G. R. França. 2018. A case of envenomation by neotropical Opisthoglyphous snake *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Dipsadinae: Tachymenini) in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 60:38.
- Arantes, J. B. 1931. Estudos parasitológicos. II. *Haemogregarina butantanensis*, sp.n., parasita da boipeva, *Ophis merremii* Wagler, 1824. *Memorias do Instituto Butantan* 6:239–241.
- Arantes, J. V. 1934. *Haemogregarina cyclagrasii* n.sp. parasita da serpente *Cyclagras giga* (Duméril e Briçon, 1854). *Revista de Biologia e Higiene* 5: 9.
- Ávila, R. W., V. L. Ferreira, and J. A. Arruda. 2006. Natural history of the South American water snake *Helicops leopardinus* (Colubridae: Hydropsini) in the Pantanal, central Brazil. *Journal of Herpetology* 40:274–279.

- Bailey, J. R., R. A. Thomas, and N. J. Jr. Silva. 2005. A revision of the South American snake genus *Thamnodynastes* Wagler, 1830 (Serpentes, Colubridae, Tachymenini): I. Two new species of *Thamnodynastes* from Central Brazil and adjacent areas, with a redefinition of and neotype designation for *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758). *Phyllomedusa* 4:83–101.
- Bellini, G. P., A. R. Giraudó, and V. Arzamendia. 2014. Comparative ecology of three species of *Thamnodynastes* (Serpentes, Dipsadidae) in subtropical-temperate South America. *The Herpetological Journal* 24:87–96.
- Bernarde, P. S., J. C. Moura-Leite, R. A. Machado, and M. N. C. Kokobum. 2000. Diet of the colubrid snake, *Thamnodynastes strigatus* (Günther, 1858) from Paraná State, Brazil, with field notes on anuran predation. *Revista Brasileira de Biologia* 60:695–699.
- Bortolanza-Filho, D., R. Lourenço-de-Moraes, M. Otanil, G. F. Lemos, and C. H. Zawadzki. 2019. New records of the dipsadid snake *Thamnodynastes strigatus* (Günther, 1858) preying on the characid fish *Astyanax bockmanni* Vari & Castro, 2007 in the Atlantic Forest of Southern Brazil. *Herpetology Notes* 12:613–615.
- Borges-Nojosa, D. M., M. J. Borges-Leite, J. P. Maia, D. Zanchi-Silva, B. R. Da Rocha, and D. J. Harris. 2017. A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adelerina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. *Systematic Parasitology* 94:65–72.
- Braz, H. B., R. R. Scartozzoni, and S. M. Almeida-Santos. 2016. Reproductive modes of the South American water snakes: a study system for the evolution of viviparity in squamate reptiles. *Zoologischer Anzeiger* 263:33–44.
- Carini, A. 1910. Sobre uma hemogregarina da *Philodrias schotti* Schleg. *Revista Médica de São Paulo* 23:339–340.
- Carini, A. 1947. Contribuição ao estudo das hemogregarinas de serpentes da família boideos.

- Arquivos de Biologia 31:61–63.
- Carvalho, T. C., L. F. De Assis Montag, and M. C. Dos Santos-Costa. 2017. Diet composition and foraging habitat use by three species of water snakes, *Helicops* Wagler 1830 (Serpentes: Dipsadidae) in eastern Brazilian Amazonia. *Journal Herpetology* 51:215–222.
- Clough, B., and E. M. Frickel. 2017. The toxoplasma parasitophorous vacuole: an evolving host-parasite frontier. *Trends in Parasitology* 33:473–488.
- Cook, C. A., E. C. Netherlands, N. J. Smit, and J. Van As. 2018. Two new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa; Hepatozoidae) parasitising species of *Philothamnus* (Ophidia: Colubridae) from South Africa. *Folia Parasitologica* 65:004.
- Costa, H. C., and R. S. Bérnils. 2018. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira* 7:11–57.
- Daszak, P., A. A. Cunningham, and A. D. Hyatt. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443–449.
- De Biasi, P. R. B. Cardoso Jr, and S. M. A. Santos. 1989. Presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) – Coccidia, Haemogregarinidae – em exemplar de *Bothrops jararaca* (Wied, 1984) – Serpentes, Viperidae, Crotalinae – mantido em cativeiro. *Memorias do Instituto Butantan* 55:117–121.
- Dubremetz, J. F., N. Garcia-Réguet, V. Conseil, and M. N. Fourmaux. 1998. Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International journal for parasitology* 28:1007–1013.
- Duszynski, D. W. 2021. Biodiversity of the Coccidia (Apicomplexa: Conoidasida) in vertebrates: what we know, what we do not know, and what needs to be done. *Folia Parasitologica*, 68: 1–18.
- Estrella, A., E. E. Sánchez, J. A. Galán, W. A. Tao, B. Guerrero, L. F. Navarrete, and A. Rodríguez-Acosta. 2011. Characterization of toxins from the broad-banded water snake

- Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758): isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. *Archives of toxicology* 85: 305–313.
- Fraga, R., A. P. Lima, A. N. C. Prudente, and W. E. Magnusson. 2013. Guia de Cobras da região de Manaus- Amazonia Central. INPA, Brasil.
- Freitas, M. A. 2014. Squamate reptiles of the Atlantic Forest of northern Bahia, Brazil. *Check List* 10:1020–1030.
- Fonseca, M. S., T. C. Bahiense, A. A. B. Silva, V. C. Onofrio, T. D. Barral, B. M. P. Souza, R. M. Lira-da-Silva, I. Biondi, R. Meyer, R. W. Portela. 2020. Ticks and associated pathogens from rescued wild animals in rainforest fragments of northeastern Brazil. *Frontiers Veterinary Science* 7:177.
- Gutiérrez-Liberato, G. A., I. A. Lotta-Arévalo, C. C. Rodríguez-Almonacid, M. Vargas-Ramírez, and N. E. Matta . 2021. Molecular and morphological description of the first *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) species infecting a neotropical turtle, with an approach to its phylogenetic relationships. *Parasitology* 148:747–759.
- Harris, D. J., J. P. Maia, and A. Perera. 2011. Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology* 97:106–111.
- Harris, D. J., J. Santos, K. M. Rampedi, A. Halajian, and R. Xavier. 2019. Genetic diversity of *Hepatozoon* (Apicomplexa) from domestic cats in South Africa, with a global reassessment of *Hepatozoon felis* diversity. *Journal of the South African Veterinary Association* 90:1–6.
- Hrazdilová, K., B. Cervená, C. Blanvillain, P. Foronda, and D. Modrý. 2021. Quest for the type species of the genus *Hepatozoon* – phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. *Systematics and Biodiversity* 1–10.

- Janouskovec, J., G. G. Paskerova, T. S. Miroljubova, K. V. Mikhailov, T. Birley, V. V. Aleoshin, and T. G. Simdyanov. 2019. Apicomplexan-like parasites are polyphyletic and widely but selectively dependent on cryptic plastid organelles. *Elife* 8:e49662.
- Junqueira-de-Azevedo, I. L., P. F. Campos, A. T. Ching, and S. P. Mackessy. 2016. Colubrid venom composition: an-omics perspective. *Toxins* 8:230.
- Karadjian, G., J. M. Chavatte, and I. Landau. 2015. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* ng, reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite* 22:31.
- Kauffman, K. L., A. Sparkman, A. M. Bronikowski, and M. G. Palacios. 2017. Vertical transmission of *Hepatozoon* in the garter snake *Thamnophis elegans*. *Journal of Wildlife diseases* 53:121–125.
- Leander, B. S. 2008. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation?. *Trends in Parasitology* 24:60–67.
- Lee, J. J., S. H. Hutner, and E. C. Bovee. 1985. An illustrated guide to the protozoa. Society of protozoologists. Lawrence. Kansas.
- Levine, N. D. 1971. Uniform terminology for the Protozoa Subphylum Apicomplexa. *The Journal of Protozoology* 18:352–355.
- Luz, M. A., A. M. C. Meneses, C. C. G. de Moraes, L. dos S. Seixas, D. J. da S. Lima, L. A. A. dos S. Ruffeil, P. H. G. de Castro, and A. M. Costa. 2012. Determinação de hemogregarina em *Boa constrictor constrictor* mantidos em cativeiro. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32:781–785.
- Maia, J. P., S. Carranza, and D. J. Harris. 2016. Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: are more data needed? *Journal of Parasitology* 102:549–552.
- Marullaz, M. 1912. Sur une hémogregarine de *Drymobius bifossatus*. *Société de Biologie* 73:518–520.

- Matz, J. M., J. R. Beck, and M. J. Blackman. 2020. The parasitophorous vacuole of the blood-stage malaria parasite. *Nature Reviews Microbiology* 18: 379–391.
- Moço, T. C., L. H. O’Dwyer, F. C. Vilela, T. H. Barrella, and R. J. Da Silva. 2002. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Memórias do Institut Oswaldo Cruz* 97:1169–1176
- Morrison, D. A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology* 25:375–382.
- Murphy, J. C., A. Muñoz-Mérida, R.J. Auguste, O. Lasso-Alcala, G. A. Rivas, and M. J. Jowers. 2020. Evidence for cryptic diversity in the Neotropical water snake, *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758) (Dipsadidae, Hydropsini), with comments on its ecology, facultative reproductive mode, and conservation. *Amphibian and Reptile Conservation* 14:138–155.
- Nogueira, C. C., A. J. S. Argôlo, V. Arzamendia , J. A. Azevedo, F. E. Barbo, . . .and M. Martins. 2019. Atlas of Brazilian Snakes: Verified point-locality maps to mitigate the Wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. *South American Journal of Herpetology* 14:1–274.
- O’Dwyer, L. H., T. C. Moço, K. dos Santos Paduan, C. Spenassatto, R. J. da Silva, and P. E. M. Ribolla. 2013. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Experimental Parasitology* 135:200–207.
- Paperna, I., and R. Lainson. 2003. Ultrastructural studies on the sporogony of *Hepatozoon* spp. in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 fed on infected *Caiman crocodilus* and *Boa constrictor* from northern Brazil. *Parasitology* 127:147–154.
- Paperna, I., and R. Lainson. 2004. *Hepatozoon cf. terzii* (Sambon & Seligman, 1907) infection in the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brasil: transmission to the

- mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. *Parasite* 11:175–181.
- Pawlowski, J., S. Audic, S. Adl, D. Bass, L. Belbahri, C. Berney, ... and C. De Vargas. 2012. CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS biology* 10:11.
- Peichoto, M. E., F. L. Tavares, M. L. Santoro, and S. P. Mackessy. 2012. Venom proteomes of South and North American opisthoglyphous (Colubridae and Dipsadidae) snake species: a preliminary approach to understanding their biological roles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 7:361–369.
- Pereira, G. R., P. Soares, M. Q. Gomes, L. A. Viana, P. P. De Abreu Manso, M. P. Machado, F. Paiva, and R. Lourenço-de-Oliveira. 2014. Are fish paratenic natural hosts of the caiman haemoparasite *Hepatozoon caimani*?. *Parasitology research* 11:39–45.
- Pessôa, S. B. 1928. Contribuição ao estudo dos Hemoparasitos dos Ophidios. III. Nota – *Haemogregarina butantanensis* nov. sp. parasita do *Philodrias aestivus*. *Boletim do Instituto de Hygiene de São Paulo* 35: 56–61.
- Pessôa, S. B. 1967a. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras II: Hemogregarinas de algumas espécies de serpentes das famílias Colubridae e Boidae. *Revista Brasileira de Biologia* 27:49–56.
- Pessôa, S. B. 1967b. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. I: Hemogregarinas de algumas espécies de serpentes da famílias colubridae. *Revista Brasileira de Biologia* 27:33–46.
- Pessôa, S. B. 1967c. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. III: Novas observações sobre hemogregarinas de serpentes das famílias colubridae e crotalidae. *Revista Brasileira de Biologia* 27:159–164.

- Pessôa, S. B. 1967d. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras IV: Hemogregarina da "*Dryadophis bifossatus bifossatus*" (Raddi). *Revista Brasileira de Biologia* 27:333–335.
- Pessôa, S. B. 1967e. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras V: Hemogregarinas da cascavel. *Revista Brasileira de Biologia* 27:381–384.
- Pessôa, S. B. 1968. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. VI. *Revista Brasileira de Biologia* 28:71–76.
- Pessôa, S. B., and J. Cavalheiro. 1969a. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras – VII. *Revista Brasileira de Biologia* 29:351–354.
- Pessôa, S. B., and J. Cavalheiro. 1969b. Notas sobre hemogregarinas de serpentes Brasileiras. IX. Sobre a hemogregarina da *Helicops carinicauda* (Wied). *Revista Goiana de Medicina* 15:161–168.
- Pessôa, S. B., and J. Cavalheiro. 1969c. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. VIII – Sobre a evolução da "*Haemogregarina miliaris*" na sanguessuga "*Haementeria lutzii*". *Revista Brasileira de Biologia* 29:451–458.
- Pessôa, S. B., and J. Cavalheiro. 1970. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. X. Espécies novas parasitas da *Hydrodynastes gigas* (D e G) e da *Corallus hortulanus* (L). *Revista Brasileira de Biologia* 30:351–554.
- Pessôa, S. B., J. Cavalheiro, and D. M. Souza. 1970a. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XII–hemogregarinas de serpentes do gênero *Corallus*. *Arquivos do Instituto Biológico* 37:205–211.
- Pessôa, S. B., L. Sacchetta, and J. Cavalheiro. 1970b. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras X- Hemogregarinas da *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. *Revista Latino Americana de Microbiologia* 12:197–200.

- Pessôa, S. B., J. Cavalheiro, and D. M. Souza. 1970c. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIII – Evolução esporogônica de Hemogregarina da *Thamnodynastes strigatus* (Colubridae). Arquivos do Instituto Biológico 37:213–217.
- Pessôa, S. B., L. Sacchetta, and J. Cavalheiro. 1971a. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XV. Sobre uma nova espécie do gênero *Haemogregarina* (S.S.) parasitade *Thamnodynastes pallidus nattereri* (Thumberg) e sua evolução em mosquitos. Rev Lat Amer Microbiol 13:29–32.
- Pessôa, S. B., H. E. Belluomini, and D. M. Souza. 1971b. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras XIV – Esporogonia da hemogregarina da *Bothrops moojeni* Hoge, 1965 no *Culex* (*Culex*) *dolosus* (L. Arribálzaga, 1891). Arquivos do Instituto Biológico 38:253–258.
- Pessôa, S. B., P. De Biasi, and D. M. Souza. 1972. Esporulação no *Culex dolosus* (L. Arribálzaga, 1891), do *Hepatozoon roulei* (Phisalix & Laveran, 1913), parasita da *Bothrops alternatus* (D. & B., 1854), transfundido com o sangue na *Bothrops moojeni* Hoge, 1965. Memórias do Instituto Butantan 36:241–245.
- Perkins, S. L., E. S. Martinsen, and B. G. Falk. 2011. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. Parasitology 138:1664–1674.
- Phisalix, M., and A. Larevan. 1913. Sur une hémogrégarine nouvelle de *Lachesis alternates*. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 6: 330-333.
- Pyron, R. A., F. T. Burbrink, and J. J. Wiens. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. BMC Evolutionary Biology 13:93.
- Rocha, M. M. T., D. Paixão-Cavalcante, D. V. Tambourgi, and M. F. D. Furtado. 2006. Duvernoy's gland secretion of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis*

- (Colubridae): neutralization of local and systemic effects by commercial bothropic antivenom (*Bothrops* genus). *Toxicon* 47:95–103.
- Saadatnia, G., and M. Golkar. 2012. A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 44: 805–814.
- Schoneberg, Y., and G. Kohler. 2021. Distribution and identification of the species in the genus *Helicops* Wagler, 1830 (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae). Arpha Preprints.
- Sloboda, M., M. Kamler, J. Bulantová, J. Votýpka, and D. Modrý. 2007. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology* 93:1189–1198.
- Smith, T. G. 1996. The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology* 82:565.
- Telford, S. R. Jr. 2009. Hemoparasites of the Reptilia: Color atlas and text. CRC Press.
- Uetz, P., P. Freed, R. Aguilar, and J. Hosek. 2021. The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org>, acessado em 01 de julho de 2021.
- Úngari, L. P., A. L. Santos, L. H. O’Dwyer, M. R. Da Silva, T. C. Santos, M. J. Da Cunha, and M. C. Cury. 2018. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. *Parasitology Research* 117:3857–3865.
- Úngari, L. P., E. C. Netherlands, E. P. De Alcantara, E. Emmerich, and R. J. Da Silva. 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*: 1–10.

- Votýpka, J., D. Modrý, M. Oborník, J. Šlapeta, and J. Lukeš. 2017. Apicomplexa. In: Archibald J M, Simpson GB, Slamovits CH (Eds.) Handbook of the Protists. Boston, EUA, pp 1–58.
- WHO–World Health Organization. 2019. World malaria report 2019. World Health Organization, Geneva. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>, acessado em 12 de fevereiro de 2021.
- Zaher, H., F. G. Grazziotton, J. A. Cadle, R. W. Murphy, J. C. Moura-leite, and S. L. Bonatto. 2009. Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulsos de Zoologia* 49: 115–153.
- Zaher, H. 2021. A new species of *Thamnodynastes* Wagler, 1830 from western Amazonia, with notes on morphology for members of the *Thamnodynastes pallidus* group (Serpentes, Dipsadidae, Trachymenini). *Zootaxa*, 4952:235–256.
- Zechmeisterová, K., H. Javanbakht, J. Kvicerová, and P. Siroký. 2021. Against growing synonymy: Identification pitfalls of *Hepatozoon* and *Schellackia* demonstrated on North Iranian reptiles. *European Journal of Protistology* 125780.

5. CAPÍTULO 1

***Hepatozoon cevapii* (APICOMPLEXA: HEPATIZOÍDAE) IN THE
THAMNODYNASTES LANEI SNAKE (COLUBRÍDAE, TACHYMENINI) FROM
THE EASTERN AMAZON, BRAZIL**

Artigo publicado no periódico "Parasitology Research"

Pág 01-07

doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-072118-4>



Hepatozoon cevapii (Apicomplexa: Hepatozoidae) in the *Thamnodynastes lanei* snake (Colubridae, Tachymenini) from the Eastern Amazon, Brazil

Fabiane Rocha de Paula¹ · Amanda Maria Picelli² · Maria Regina Lucas da Silva³ · Jamille Karina Coelho Correa¹ · Lúcio André Viana^{1,3}

Received: 21 February 2021 / Accepted: 9 June 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

The aim of the present study was to verify the occurrence of hemogregarines in the colubrid snake *Thamnodynastes lanei* from the eastern Amazon region of Brazil. Intraerythrocytic gamonts with mean dimensions of $14.8 \pm 1.8 \times 4.0 \pm 0.7 \mu\text{m}$ and encapsulated gamonts with mean dimensions of $15.3 \pm 1.1 \times 4.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ were observed. Through morphological and molecular data based on the partial 18S rDNA gene, the parasite was identified as *Hepatozoon cevapii*, originally described in the viperid snake *Crotalus durissus terrificus* from the southeast region of Brazil. Thus, the findings of the present study extend the geographic range of *H. cevapii* and provide novel *Hepatozoon*–snake associations.

Keywords Hemoparasites · Reptiles · Molecular characterization, · Brazilian snakes

Introduction

Hemoparasites of the *Hepatozoon* genus (Miller, 1908) (Apicomplexa, Hepatozoidae) are relatively common in wild animals, and occur in different classes of vertebrates, from frogs to mammals (Smith 1996). Hepatozoids have heteroxenic cycles, involving a vertebrate host for the asexual replicative phase (merogony) and an invertebrate host (definitive) for the sexual reproduction phases and a new asexual cycle (gametogony and sporogony) (Telford 2009). The genus is the most abundant among hemogregarines, with more than

300 described species, and is the most common hemoparasite of the phylum Apicomplexa in snakes (Smith 1996; Úngari et al. 2018).

The genus *Thamnodynastes* Wagler, 1830 (Squamata, Colubridae) in Brazil is composed of 12 species of relatively small viviparous and opisthoglyphous colubrids (Bailey et al. 2005; Costa and Bérnils 2018). The species *Thamnodynastes lanei* Bailey et al. 2005 inhabits environments with grass and shrub type vegetation, marked by seasonal floods, or along water courses (Bailey et al. 2005). It has a nocturnal behavior and a diet similar to other species of this genus, comprising frogs, lizards, small mammals, and even fish (Bernarde et al. 2000; Bortolanza-Filho et al. 2019). It is widely distributed in South America, and in Brazil occurs in the cerrado, pantanal, and Amazon rainforest biomes (Nogueira et al. 2019).

In relation to infection by hepatozoids, there are only two records for the genus *Thamnodynastes* and *Hepatozoon pallida* (Pessôa et al. 1971) described in *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758) and *Hepatozoon strigatus* (Pessôa 1967) in *Thamnodynastes strigatus* (Gunther, 1858). In the present study, during the search for hemoparasites in snakes from the Eastern Amazon region, we recorded the presence of *Hepatozoon cevapii* O'Dwyer et al. 2013 in *Thamnodynastes lanei* Bailey et al. 2005, through the integrated use of genetic and morphological data.

Section Editor: Daniel K Howe

✉ Lúcio André Viana
lucviana74@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação Em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal Do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brazil

² Programa de Pós-Graduação Em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Amazonas, Manaus, AM, Brazil

³ Laboratório de Estudos Morfofisiológicos E Parasitários, Departamento de Ciências Biológicas E da Saúde, Universidade Federal Do Amapá (UNIFAP), Macapá, AP, Brazil

6. CAPÍTULO 2

A FIFTY-YEARS OLD REDESCRIPTION: MOLECULAR AND MORPHOMETRIC CHARACTERIZATION OF *Hepatozoon carinicauda* (PESSÔA AND CAVALHEIRO, 1969) IN THE BROWN-BANDED WATER SNAKE *Helicops angulatus* (LINNAEUS, 1758)

Artigo a ser submetido após a defesa ao periódico “Parasitology Research”

A fifty-years old redescription: molecular and morphometric characterization of *Hepatozoon carinicauda* (Pessôa and Cavalheiro, 1969) in the brown-banded water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758)

**Fabiane Rocha de Paula^{1,2} · Amanda Maria Picelli^{3,4} · Lívia Perles⁵ · Marcos Rogério André⁵ ·
Lúcio André Viana^{1,2}**

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá, AP, Brazil

²Laboratório de Estudos Morfofisiológicos e Parasitários, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá, AP, Brazil

³Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

⁵Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil

Corresponding author: Lúcio André Viana

e-mail: lucviana74@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0932-0479>

Abstract

The combined use of molecular and microscopic techniques has become an increasingly common and efficient practice for taxonomic and evolutionary understanding of single-celled parasites such as hemogregarines. Based on this integrative approach, we performed the characterization of *Hepatoozon* found in *Helicops angulatus* snakes from the Eastern Amazonia, Brazil. The gamonts observed caused cell hypertrophy, they were extremely elongated and, in some cases, piriform (mean dimensions: $25.3 \pm 1.9 \times 8.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$). These morphological features correspond to *Hepatozoon carinicauda* described fifty years ago in the snake *Helicops carinicaudus* in Southeast Brazil. Phylogenetic and genetic divergence analyses, performed with the sequence obtained by amplification of a 590 bp fragment of the 18 S rRNA gene, revealed that *Hepatozoon* in *H. angulatus* was different from the other lineages retrieved from Genbank and was clustered singly in both the phylogenetic tree and the haplotype network. The integration of these data allowed the identification of *H. carinicauda* in a new aquatic host and increased the knowledge of its geographical distribution. Therefore, our study included the first redescription of a *Hepatozoon* species in a snake from the Brazilian Amazonia.

Keywords: 18S rRNA · Hemogregarines · Molecular description · Taxonomy · Neotropical snakes

Introduction

Hemogregarines of the genus *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa, Hepatozoidae) comprise a ubiquitous group of intraerythrocytic parasites remarkably diverse among snakes (Smith 1996; Úngari et al. 2018). For a long time, the species nomination in this taxon was based on classical taxonomic methods, using morphological and morphometric data (Morrison 2009). However, such features alone do not provide a robust diagnosis for single-celled organisms like *Hepatozoon*, whose paucity of morphological traits make them especially prone to cryptic species (Perkins et al. 2011; Zechmeisterová et al. 2021). In this regard, the use of molecular markers, mainly the 18S ribosomal nuclear gene (Hrazdilová et al. 2021), was a decisive milestone for the taxonomy of these parasites, allowing access to genetic diversity and a better understanding of their phylogenetic relationships (Harris et al. 2011; O'Dwyer et al. 2013; Hrazdilová et al. 2021).

Descriptions of *Hepatozoon* in snakes have been reported in the literature for more than a century (Smith 1996), yet genetic data for this group are restricted to the last 15 years (Sloboda et al. 2007). In Brazil, even with the high taxonomic richness recorded (ca. 40 spp.) in snakes (Pessôa et al. 1974; Smith 1996; Úngari et al. 2018; 2021), only five species had sequences available so far: *Hepatozoon cevapii* O'Dwyer et al. 2013 reported in *Crotalus durissus* Linnaeus, 1758 (O'Dwyer et al. 2013) and *Thamnodynastes lanei* Bailey et al. 2005 (De Paula

et al. 2021); *Hepatozoon cuestensis* O'Dwyer et al. 2013 and *Hepatozoon massardii* O'Dwyer et al. 2013 described in *C. durissus* (O'Dwyer et al. 2013; Úngari et al. 2018); *Hepatozoon musa* Borges-Nojosa et al. 2017 from *Philodryas nattereri* (Steindachner, 1870) (Borges-Nojosa et al. 2017), *C. durissus* and *Epicrates crassus* Cope, 1862 (Úngari et al. 2018); and *Hepatozoon quagliattus* Úngari et al. 2021 in *Dipsas mikanii* (Schlegel, 1837) (Úngari et al. 2021).

Helicops Wagler, 1830 (Colubridae, Dipsadinae) is a genus of Neotropical snakes widely distributed in South America and comprising 19 described species, of which 15 can be found in Brazil and some are endemic to this country (Costa and Bérnils 2018; Nogueira et al. 2019; Schoneberg and Kohler 2021). These snakes are strictly aquatic, with nocturnal habits and feed mainly on fish and anurans (Aguilar and Di-Bernardo 2004; Ávila et al. 2006; Carvalho et al. 2017). They can be viviparous or oviparous, with the exception of *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758), which has both reproductive modes (Braz et al. 2016). Regarding the occurrence of hemoparasites, there are two species of hepatozoids reported in these snakes (Pessôa and Cavalheiro 1969ab): *Hepatozoon modesta* Pessôa and Cavalheiro, 1969 from *Helicops modestus* Gunther, 1861 and *Hepatozoon carinicauda* Pessôa and Cavalheiro, 1969 in *Helicops carinicaudus* (Wied-Neuwied, 1824).

Therefore, the present study aimed to investigate the presence of hemoparasites in the brown-banded water snake *H. angulatus*, and from the use of an integrative taxonomy approach (morphology, morphometry and molecular data) it was possible to rediscover and redescribe *H. carinicauda*, a species named more than fifty years ago.

Material and Methods

Blood sampling and parasite morphological identification

We collected, via venipuncture of the tail (Sykes and Klaphake 2008), blood samples from three individuals of *H. angulatus*, manually captured in two flooding areas in the municipality of Macapá, Amapá State, Brazil (0°01'04.29" S, 51°05'11.17" W; 0°00'40.7" N, 51°05'49.5" W) (Fig. 1). A portion of this blood was used to make blood smears, which were fixed with absolute methanol for 3 min and stained with Giemsa 10% for 30 min, and the rest of the sample was preserved in 96% ethanol (Hull and Camin 1960; Telford et al. 2001). The slides were examined under a light microscope at $\times 400$ and $\times 1000$ magnification and the parasite forms were recorded with a 5.1 MP digital camera attached to the biological microscope DI – 136T. The images and measurements of the parasites were processed using Image View® software. Morphometric characterization was

given in micrometers (μm) and variables such as length, width and area of the parasite and erythrocytes were presented as mean, range and standard deviation. Parasitemia was estimated by counting the number of parasites visualized in 2000 erythrocytes, in 20 fields of 100 examined erythrocytes (Godfrey et al. 1987).

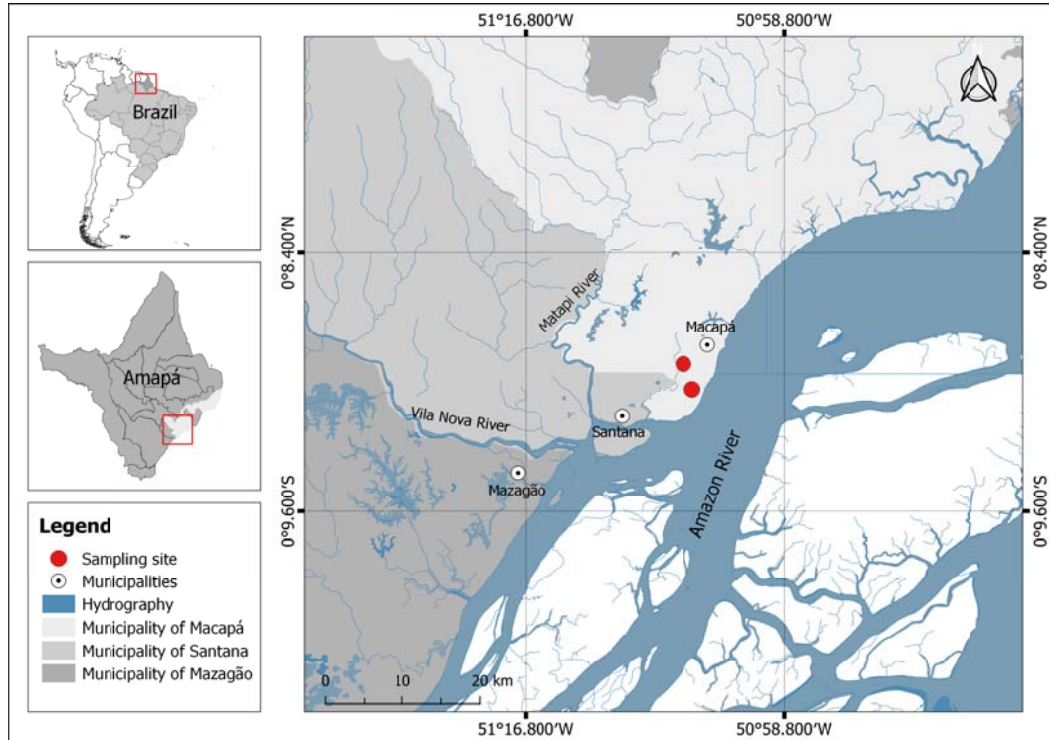


Fig. 1 Map of the study area containing the location of the analyzed samples, indicated by red circles.

DNA extraction, amplification and sequencing

Total DNA was extracted from a sample using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA), according to the manufacturer's instructions. The detection of the parasite DNA by PCR (polymerase chain reaction) was performed using the Hep300 and Hep900 primers, which amplified a fragment of 590 base pairs (bp) of the 18S rRNA gene for sequencing and phylogenetic analysis (Ujvari et al. 2004). The PCR consisted of a pre-PCR step at 94 °C for 3 min, followed by 45 cycles of 94 °C for 45 s, one cycle at 56 °C for 1 min, an extension at 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplicon was purified following the manufacturer's protocol using Wizard® SV Gel and the PCR Clean-Up System. PCR products were sequenced using the BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Sanger et al. 1977).

Phylogenetic analyses

The amplified sequence was edited and the consensus sequence was built using the BioEdit software v7.2.5 (Hall 1999). The identity, query coverage and E-values were assessed by BLASTn tool (using default parameters), available in the NCBI GenBank database (Altschul et al. 1990). The obtained sequence was aligned with other sequences retrieved from GenBank using MAFFT software, version 7 (Kato et al. 2019). Sequences used for phylogenetic inferences were selected from BLAST results and other studies performed in Brazil and other countries (Supplementary Information). First, the model “best of fit” was selected by the program jModelTest2 (version 2.1.6) on 11 XSEDE19, under the Akaike Information Criterion (AIC) (Darriba et al. 2012). Maximum likelihood (ML) tree inference was performed with IQ-TREE software (Trifinopoulos et al. 2016). The phylogenetic tree edition and rooting (outgroup) were performed using the TreeGraph 2.0 beta software.

Genetic diversity of *Hepatozoon* spp.

Nineteen sequences were retrieved from GenBank (MN833641, MF435047, MF435048, KX880079, MF497763, MF497764, MF497765, MF497766, MF497767, KC342524, MF497769, MF497770, KC342526, MW241134, MW241135, KC342525, MF322538, MF322539, MW591599) and aligned with MAFFT software (version 7) (Kato et al. 2019), producing an alignment of 461 bp, were used to evaluate the genetic diversity of 18S rRNA gene from *Hepatozoon* spp. detected in the snake from the present study and in reptiles from previous studies performed in Brazil (O’Dwyer et al. 2013, Borges-Nojosa et al. 2017; Bouer et al. 2017; Úngari et al. 2018; Picelli et al. 2020; Úngari et al. 2021). The nucleotide diversity (Pi), haplotype diversity (Hd), number of haplotypes (h), total number of mutations (Eta) and the average number of nucleotide differences (k), using DnaSP v5 software (Librado and Rozas, 2009) were calculated. Additionally, a haplotype network was constructed using Median Joining Network parameters (Bandelt et al. 1999) using PopArt software (<http://popart.otago.ac.nz>). Also, an even-distance matrix among sequences detected in reptiles in Brazil was estimated using the Mega-X software version 10.1.8 (Kumar et al. 2018).

Results

All three *H. angulatus* snakes were positive for *Hepatozoon* parasites, with an average parasitemia of 7 / 2,000 erythrocytes in the blood (0.37%; \pm 4.51), ranging from 3 to 12 parasites among the specimens. Gamonts (Fig. 2a-f) seen in the peripheral blood of the three snakes had extremely wide and elongated bodies, which induced deformities in the host cells, and presented large eccentric nuclei. These characteristics agreed with the

H. carinicauda, a species previously described in the snake *H. carinicaudus* (Pessôa and Cavalheiro 1969b). Details of morphometric and morphological traits are shown in the Table 1 and at species redescription section below.

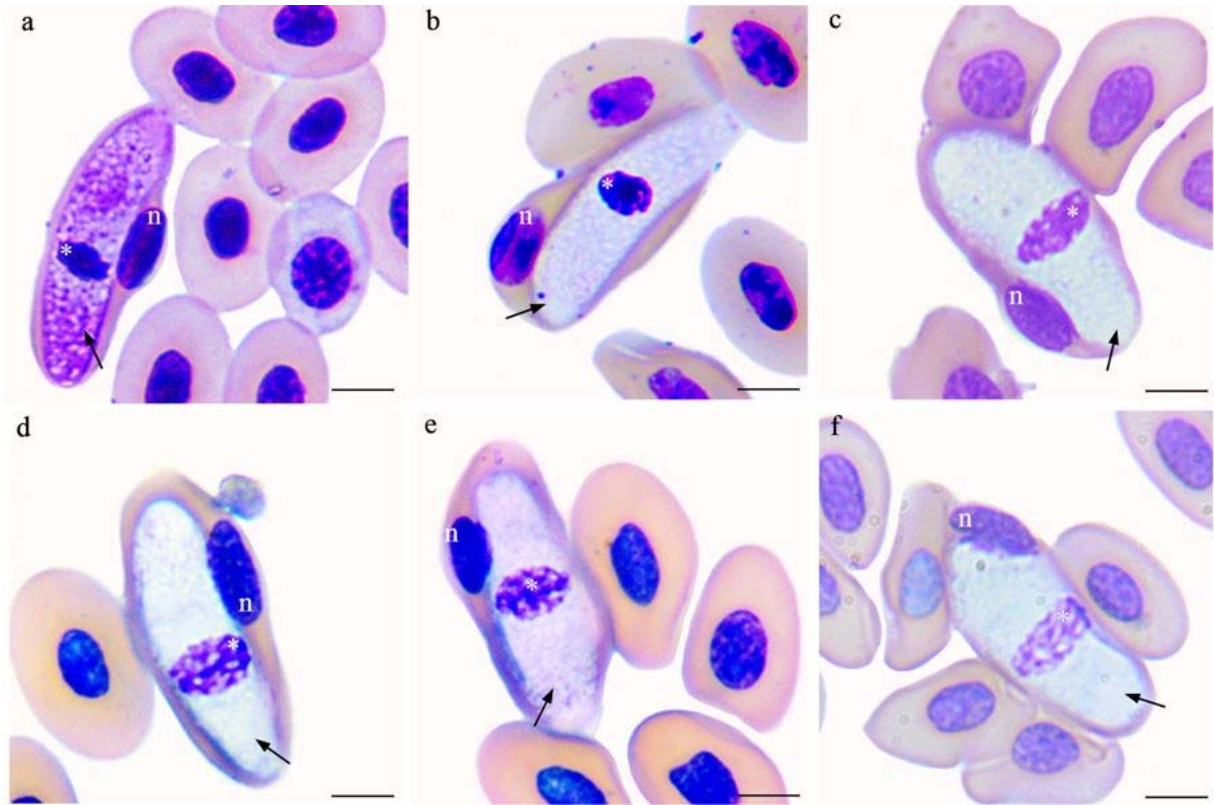


Fig. 2 Gamonts of *Hepatozoon carinicauda* infecting erythrocytes of the aquatic snakes *Helicops angulatus* from Eastern Amazonia, Brazil (a-f). Arrows indicate parasites; asterisks (*) indicate gamont nuclei; and “n” indicates host cell nucleus. Micrographs are from Giemsa-stained thin blood films. Scale bar = 10 μ m.

Table 1. Morphometry of the *Hepatozoon carinicauda* gamonts and their host cells detected in *Helicops angulatus* snakes from the Eastern Amazon, Brazil. Measurements are presented as mean \pm standard deviation (SD) followed by the range (maximum and minimum values).

Characteristics	N	Length (μm)	Width (μm)	Area (μm^2)
Gamont	48	25.32 \pm 1.85 (29.41–21.54)	8.62 \pm 1.27 (11.79–6.84)	174.14 \pm 17.20 (227.99–144.33)
Gamont nucleus	48	5.23 \pm 1.61 (12.04–3.33)	6.89 \pm 1.24 (9.77–4.54)	30.21 \pm 14.19 (84.4–14.95)
Infected erythrocyte	48	27.28 \pm 1.98 (32.4–22.63)	11.81 \pm 1.63 (16.05–8.97)	250.78 \pm 34.21 (357.3–202.11)
Infected erythrocyte nucleus	48	8.33 \pm 0.94 (10.2–6.25)	3.86 \pm 1.04 (7.66–2.78)	24.59 \pm 4.25 (36.58–18.68)
Uninfected erythrocyte	30	16.92 \pm 0.94 (18.77–14.64)	10.54 \pm 0.99 (12.07–8.85)	142.07 \pm 15.21 (169.49–113.89)
Uninfected erythrocyte nucleus	30	6.91 \pm 0.54 (7.87–5.99)	4.36 \pm 0.38 (5.31–3.68)	24.61 \pm 2.67 (31.8–19.32)

The obtained 18S rRNA sequence detected in *H. angulatus* showed 100% of query coverage, 98.47% of identity and 0.0 of E-value with *Hepatozoon* sp. detected in *Amblyomma fimbriatum* Koch, 1844 from *Varanus panoptes* Storr, 1980, sampled in Australia (EU430234; Vilcins et al. 2009) and 98.14% of identity with *Hepatozoon ophisauri* (Tartakovskii, 1913) from Iran detected in the lizard *Pseudopus apodus* (Pallas, 1775) (MN723845; Zechmeisterová et al. 2021); also, the sequence showed 99% of query coverage, 98.63% of identity and 0.0 of E.value with *Hepatozoon* sp. detected in *Amblyomma varanense* (Supino, 1897) from a King cobra, *Ophiophagus hannah* (Cantor, 1836), from Thailand (JQ670908; Sumrandee et al. 2015).

Phylogenetic analysis of a 615 pb alignment based on the ML method using GTR evolutionary model (Fig. 3) presented 87% of bootstrap in tree and showed that newly generated sequence formed one new branch, inserted into a large clade composed by *Hepatozoon* lineages isolated in herpetofauna and mites from South America. Sequences previously detected in snakes (*H. cevapii*, *H. massardii*, *H. musa* and *H. cuestasensis*) from Brazil were inserted (O'Dwyer et al. 2013; Borges-Nojosa et al. 2017). *H. cevapii* and *H. massardii* were positioned in a different clade (Fig. 3). The sequences of *H. cuestasensis* and *H. musa* shared the same ancestor with the sequence detected in the present study (Fig. 3). Furthermore, sequences of *Hepatozoon* sp. (EU430234) and *H. ophisauri* (MN723845) that presented >98% of identity with our sequence were also clustered in another clades.



Fig. 3 Phylogenetic tree based on an alignment of 615 bp fragment of *Hepatozoon* spp. 18S rRNA sequences, using ML method and GTR evolutionary model. Numbers at nodes correspond to bootstrap. Accession numbers are indicated in the sequences. Sequence of *Hepatozoon carinicauda* detected in the present study is highlighted in bold red.

The distance matrix showed that the divergence (p -value) between the *Hepatozoon* 18S rRNA sequences obtained here and in reptiles from previous studies carried out in Brazil, varied from 1.86 to 6.5% (Table 2). The sequence of *Hepatozoon ameivae* (Carini and Rudolph, 1912) obtained from the lizard *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758) (Picelli et al. 2020) was the closest one with a distance of 1.86% (Table 2). Among the *Hepatozoon* sequences obtained from snakes in Brazil, the closest were *H. musa* that presented divergence from 1.88% to 2.2%, followed by *H. cuestensis*, with divergence from 2.1% to 2.3%, *H. massardii*, with a distance of 2.5%, and *H. cevapii* that presented divergence from 2.3% to 2.7% of distance (Table 2). The sequences of *H. quagliattus* were the most distant at all, with a genetic distance of 6.2% to 6.7% (Table 2).

Table 2. Divergence scores among the different *Hepatozoon* spp. detected in reptiles from Brazil. The pairwise distance matrix was estimated using the Mega-X software version 10.1.8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 <i>H. carinicauda</i> (MT561455)																				
2 <i>H. ameivae</i> (MN833641)	0,0186																			
3 <i>H. musa</i> (MF497763)	0,0198	0,0108																		
4 <i>H. musa</i> (MF497764)	0,0203	0,0111	0,0000																	
5 <i>H. musa</i> (MF497767)	0,0200	0,0109	0,0000	0,0000																
6 <i>H. musa</i> (MF497765)	0,0196	0,0107	0,0000	0,0000	0,0000															
7 <i>H. musa</i> (MF497766)	0,0188	0,0113	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000														
8 <i>H. cuestensis</i> (MF497769)	0,0230	0,0142	0,0073	0,0075	0,0073	0,0072	0,0056													
9 <i>H. cuestensis</i> (MF497770)	0,0236	0,0145	0,0074	0,0075	0,0074	0,0073	0,0056	0,0000												
10 <i>H. cuetensis</i> (KC342524)	0,0217	0,0138	0,0062	0,0063	0,0062	0,0061	0,0061	0,0000	0,0000											
11 <i>H. caimani</i> (MF435048)	0,0204	0,0255	0,0234	0,0240	0,0236	0,0232	0,0245	0,0266	0,0273	0,0277										
12 <i>H. musa</i> (KX880079)	0,0220	0,0128	0,0019	0,0019	0,0019	0,0019	0,0020	0,0096	0,097	0,0087	0,0257									
13 <i>H. massardi</i> (KC342526)	0,0257	0,0316	0,0331	0,0337	0,0330	0,0323	0,0325	0,0298	0,0303	0,0296	0,0297	0,0369								
14 <i>H. cevapii</i> (KC342525)	0,0237	0,0296	0,0310	0,0316	0,0309	0,0303	0,0305	0,0278	0,0283	0,0277	0,0277	0,0347	0,0020							
15 <i>H. cevapi</i> (MW241134)	0,0272	0,0306	0,0324	0,0333	0,0327	0,0321	0,0320	0,0319	0,0327	0,0277	0,0290	0,0350	0,0020	0,0000						
16 <i>H. cevapi</i> (MW241135)	0,0271	0,0305	0,0324	0,0333	0,0327	0,0321	0,0320	0,0319	0,0327	0,0277	0,0289	0,0349	0,0020	0,0000	0,0000					
17 <i>H. caimani</i> (MF322538)	0,0288	0,0342	0,0309	0,0296	0,0290	0,0288	0,0246	0,0273	0,0276	0,0286	0,0072	0,0341	0,0307	0,0286	0,0378	0,0378				
18 <i>H. caimani</i> (MF435047)	0,0347	0,0347	0,0360	0,0370	0,0364	0,0357	0,0321	0,0392	0,0401	0,0360	0,0225	0,0390	0,0400	0,0380	0,0399	0,0399	0,0306			
19 <i>H. quagliattus</i> (MW591599)	0,0627	0,0610	0,0629	0,0647	0,0635	0,0642	0,0678	0,0674	0,0691	0,0632	0,0628	0,0661	0,0692	0,0672	0,0646	0,0644	0,0719	0,0745		
20 <i>H. quagliattus</i> (MW591556)	0,0654	0,0636	0,0643	0,0654	0,0642	0,0649	0,0678	0,0675	0,0691	0,0632	0,0655	0,0691	0,0692	0,0672	0,0671	0,0671	0,0656	0,0768	0,0000	

The analysis of nucleotide polymorphisms of the 18S rRNA sequences isolated in reptiles in Brazil revealed 10 different haplotypes (Fig. 4), with 54 variable sites, with a diversity of haplotypes (H_d) = 0.9 and nucleotide diversity (P_i) = 0.02724. As a result, most *Hepatozoon* species of Brazilian reptiles were represented with individual haplotypes, with the exception of the species *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) and *H. musa*, both of which had two haplotypes. Nucleotide sequence genealogy shows the sequence of *H. carinicauda* originated from median vectors, which represent hypothetical haplotypes generated by the software to connect the other haplotypes, but not contemplated in the present study. The comparison between *H. carinicauda* with its closest sequence, *H. ameivae*, demonstrates the presence of three median vectors and ten mutational events between them. These results corroborate with the phylogenetic tree and five groups were found: i.) one comprising *H. cuestensis*, *H. musa* and *H. ameivae*; ii.) another group composed by *H. carinicauda*; iii.) the third one composed by *H. massardii* and *H. cevapii*; iv.) the fourth composed by *H. quagliattus*; and v.) the fifth composed of haplotypes of *H. caimani* (Fig. 4).

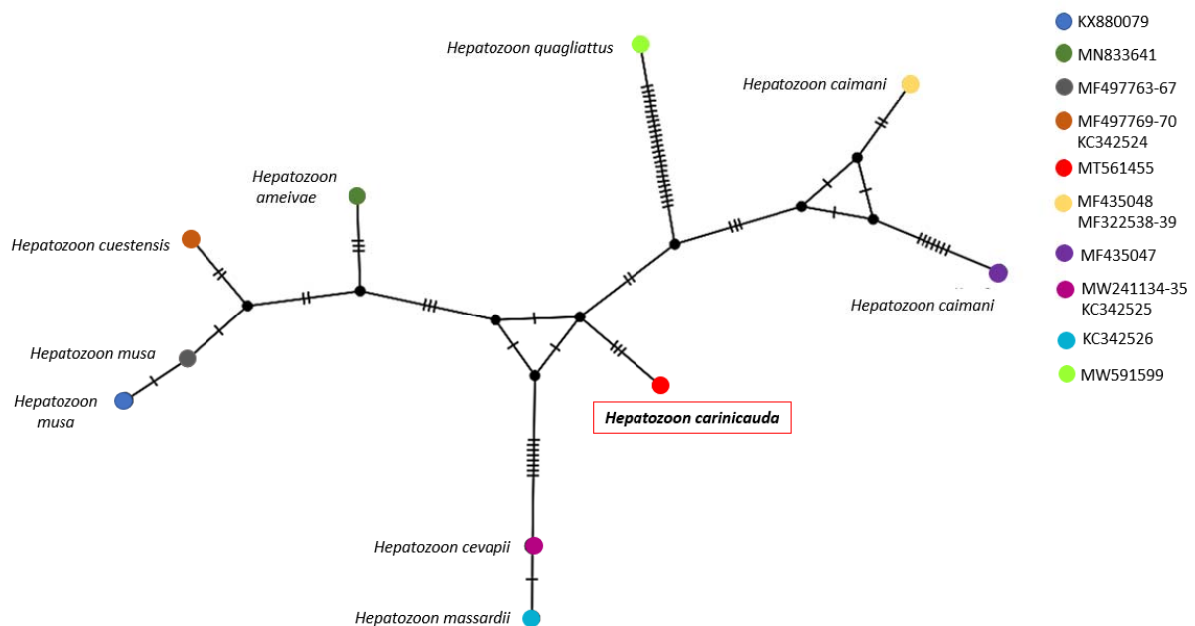


Fig. 4 Median Joining Network of 18S rRNA *Hepatozoon* sequences (461 pb) detected in snakes from Brazil in the present work and in previous studies. While the lines between haplotypes represent mutational steps, the black circles indicate median vectors (hypothetical haplotypes generated by the software to connect all the haplotypes).

Phylogenetic position and genetic divergence showed that the novel sequence obtained in this study is a distinct species of *Hepatozoon*. Therefore, based on these data, the morphological and morphometric similarities, and congeneric host (*Helicops*) we consider that the parasite found here belongs to the formerly described species *H. carinicauda*.

Taxonomic summary

Species redescription

Phylum Apicomplexa Levine 1970

Class Coccidia Leuckart 1879

Order Eucoccidiorida Léger and Duboscq, 1910

Suborder Adeleorina Léger 1911

Family Hepatozoidae Wenyon, 1926

Genus *Hepatozoon* Miller, 1908

***Hepatozoon carinicauda* (Pessôa and Cavalheiro, 1969)**

Type host: *Helicops carinicaudus* (Wied-Neuwied, 1824) (Serpentes: Colubridae), Wied's Keelback, Cobra-D'água-Preta.

Other hosts: *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758) (Serpentes: Colubridae), Brown-banded water snake, Surucucurana – current study.

Vector: Unknown.

Type locality: Votuporanga, São Paulo State, Brazil (Pessôa and Cavalheiro 1969b).

Other localities: Urban flooding area (0°01'04.29" S, 51°05'11.17" W; 0°00'40.7" N, 51°05'49.5" W), municipality of Macapá, State of Amapá, Brazil (present study).

Prevalence: One of one *Helicops carinicaudus* (Pessôa and Cavalheiro 1969b); and all three specimens of *Helicops angulatus* (this study).

Site of infection: Gamonts in blood erythrocytes (see Pessôa and Cavalheiro 1969b; current study); meronts observed in liver, intestine and lungs (Pessôa and Cavalheiro 1969b).

Parasitemia (this study): Mean of 7 parasites /2.000 blood erythrocytes (0.37%; \pm 4.51), ranging from 3 to 12 parasites.

Type material: Six blood slides (hapantotypes) from *Helicops angulatus* were deposited at the Institute for Scientific and Technological Research of the State of Amapá (IEPA), Amapá, AP, Brazil (n° IEPA0001, IEPA0002, IEPA0003, IEPA0004, IEPA0005, IEPA0006).

DNA sequences: The 18S ribosomal gene sequence (590 bp) was deposited in GenBank® (accession number MT561455).

Redescription

This hemogregarine was described by Pessôa and Cavalheiro (1969b) in the colubrid snake *H. carinicaudus*, in the Southeast Brazil. In the original description, large gamonts were reported infecting erythrocytes and meronts with an abundant number of merozoites in the liver, intestine and lung smears. Those authors also made an attempt of vectorial incrimination and recorded the development of sporulated oocysts in the body cavity of the leech *Haementeria lutzi* Pinto, 1920. Herein, intraerythrocytic gamonts were the forms investigated of *H. carinicauda* in the peripheral blood of a new vertebrate host, the brown-banded water snake *H. angulatus* from Eastern Amazonia, Brazil (Fig. 2a-f).

Gamonts (Fig. 2a-f; Table 1) Extremely elongated, slightly curved and sometimes pyriform; both ends rounded; basophilic cytoplasm with granules; and parasitophorous vacuole is not evident. Wide and elliptical nucleus; eccentric and slightly oriented towards to one end; its position is usually marked by the enlargement of the parasite's body; and with condensed dark stained chromatin filaments or with more dispersed chromatin. Body dimensions: $25.3 \pm 1.9 \times 8.6 \pm 1.3 \mu\text{m}$; and area $174.1 \pm 17.2 \mu\text{m}^2$. Nucleus dimensions: $5.2 \pm 1.6 \times 6.9 \pm 1.2 \mu\text{m}$; and area $30.2 \pm 14.1 \mu\text{m}^2$. Cytopathological effects caused by parasites on their host cells were remarkable when compared with non-parasitized erythrocytes. Infected erythrocytes were hypertrophied ($27.3 \pm 2.0 \mu\text{m}$ vs $16.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$) with gamonts occupying almost the entire area ($250.8 \pm 34.2 \mu\text{m}^2$) of these cells. Parasitized erythrocyte nucleus was flattened and displaced laterally to the host cell margin ($8.3 \pm 0.9 \times 3.9 \pm 1.0 \mu\text{m}$ vs $6.9 \pm 0.5 \times 4.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$ [Table 1]), which was generally irregular (Fig. 2e-f).

Remarks: *Hepatozoon carinicauda* gamonts observed in the blood of *H. angulatus* were slightly smaller than those described in their type host, *H. carinicaudus* (Pessôa and Cavalheiro 1969b) ($29.4\text{--}21.5 \times 11.8\text{--}6.8 \mu\text{m}$ vs. $30\text{--}23 \times 13\text{--}5 \mu\text{m}$, respectively). When compared to *H. modesta* (Pessôa and Cavalheiro 1969a), another species described in *Helicops* snakes, *H. carinicauda* has larger dimensions ($15\text{--}13 \times 3\text{--}2 \mu\text{m}$ vs. $29.4\text{--}21.5 \times 11.8\text{--}6.8 \mu\text{m}$, respectively). Moreover, unlike *H. carinicauda*, the morphology of *H. modesta* has nothing unique, being considered a "hepatozoic" type –a former term used for parasites that did not deform or displace the host cell

nucleus (Pessôa and Cavalheiro 1969a). Morphometric and morphological differences can also be evidenced among *H. carinicauda* and phylogenetically close hemogregarines species that infected lizard and snakes, such as *H. ameivae*, *H. cuestensis* and *H. musa*. Gamonts of *H. ameivae*, in addition to being smaller ($14.28 \times 4.50 \mu\text{m}$), possess the outstanding feature of overlapping the host cell nucleus (Picelli et al. 2020), a trait that is not observed in *H. carinicauda*. *Hepatozoon cuestensis* forms have arched ends, uniform cytoplasm, and also smaller sizes ($17.07 \times 3.6 \mu\text{m}$) (O'Dwyer et al. 2013). At last, *H. musa* has both curved ends and with bodies, although elongated ($18.9 \times 3.8 \mu\text{m}$), smaller than *H. carinicauda* (Borges-Nojosa et al. 2017).

Discussion

Taken together, our genetic, morphological and morphometric data allowed us to redescribe *H. carinicauda* in a new snake host, *H. angulatus*, as well as placing this parasite species in a current phylogenetic context. This was possible mainly because *H. carinicauda* has very distinct and unique morphological and morphometric characteristics (i.e., large dimensions that considerably deform erythrocytes). Likewise, other studies that employed integrative taxonomy started from this same assumption, as was the case of *H. ameivae* in the lizard *A. ameiva*, whose gamonts overlap the host cell nucleus (Picelli et al. 2020). As well as the redescription of *H. ophisauri* in the lizard *P. apodus*, which has unusual pink inclusions, and *Hepatozoon colubri* (Borner, 1901) in the snake *Zamenis longissimus* (Laurenti, 1768), which presents a degeneration zone in the cytoplasm and connection to the nucleus of the host cell (Zechmeisterová et al. 2021).

Hepatozoon carinicauda was first observed fifty-two years ago infecting another *Helicops* snake, the Wied's Keelback *H. carinicaudus*. This host species and *H. angulatus* shared the main ecological features associated with this snake genus, which consist of inhabiting freshwater environments, having nocturnal habits and feeding mainly on fish and frogs (Aguilar and Di-Bernardo 2004; Ávila et al. 2006; Carvalho et al. 2017). Nevertheless, in addition to having specific differentiations, these species exhibit distinct geographic distribution patterns. Although there is no data on the sympatric occurrence of these host species, the distribution of both species suggests an area of sympatry in the State of Bahia, northeastern Brazil (Freitas 2003; Costa and Bérnils 2018). In fact, studies have shown that *H. carinicaudus* is endemic to the coastal Atlantic Forest at low elevations, restricted to the southeastern and southern regions of the country (Yuki and Lema 2005; Nogueira et al. 2019). On the other hand, *H. angulatus* represents a cryptic species complex and most widespread in northern South America (Nogueira et al. 2019; Murphy et al. 2020), with records in the Brazilian biomes of Amazonia, Chiquitano dry forest, Cerrado, Caatinga, and northern portion of the Atlantic Forest (Nogueira et al. 2019;

Murphy et al. 2020). Generally, the sharing of parasites by different host species can be explained by the common sense that among the hemogregarines there is a low specificity to the vertebrate host (Maia et al. 2012; De Paula et al 2021). However, we cannot fully assume that this is the circumstance here, because the evolutionary and ecological history of the hosts. The presence of *H. carinicauda* in these snakes would be through a vector and/or intermediate host that are related to both, given the similarity of the ecological niche used by them (Poulin and Morand 2004; Morand 2015). It is also noteworthy since these snakes are congeneric hosts it is possible that the parasite was inherited by these species through the common ancestor during the speciation process (Poulin and Morand 2004; Hay et al. 2020). In this sense, it would be interesting to investigate other *Helicops* species as well as other aquatic snake taxa to test these hypotheses.

With respect to morphological aspects, we observed that *H. carinicauda* gamonts found in *H. angulatus*, even a little smaller, remain within the species dimensions (Pessôa and Cavalheiro 1969b). In the original description, Pessôa and Cavalheiro (1969b) performed gamonts measurements twice, with an interval of one month between them, and noticed a size increase in the parasitic forms. Nonetheless, Telford (2009) calculated measures for *H. carinicauda* from the original description photos, and showed that larger parasites, found during the second smears examination, had smaller dimensions ($26\text{--}25 \times 13\text{--}10 \mu\text{m}$) than those presented by Pessôa and Cavalheiro (1969b). From this perspective, despite considering that both measures were consistent with each other, this author concluded that the original measures of *H. carinicauda* were unsuitable. Truly, as in other old hemoprotozoans descriptions, not all traits in *H. carinicauda* and host cells were evaluated, with some discrepancies between the first and second measurements (Pessôa and Cavalheiro 1969b). For example, the parasite nuclei were considered solely in the first analysis, whereas the infected erythrocytes were assessed only in the second exam, where just the length was recorded. Therefore, we believe that probably these methodological inconsistencies might have led the morphological differences between our study and the Pessôa and Cavalheiro (1969b).

To our knowledge, this is the first molecular characterization of a hemogregarine species isolated from a *Helicops* snake. It is worth mentioning that *Hepatozoon* sp. DNA has been recently detected in a tick (*Amblyomma rotundatum* Koch, 1844) collected from a *H. carinicauda* snake (Fonseca et al. 2020). However, in this study the infection in the snake was not confirmed and it was not clear whether the tick can act as a vector of *Hepatozoon* for this aquatic snake host. Furthermore, as the authors did not perform the morphological characterization or molecular sequencing, it was not possible to compare this parasite with the *H. carinicauda* found here. Furthermore, it is important to emphasize that available molecular data for *Hepatozoon* infecting

snakes is scarce in all Amazonia countries. So far, there is only one molecular characterization in the entire region, *H. cevapii* in *T. lanei* (De Paula et al. 2021) a parasite previously described in *C. durissus* in Southeastern Brazil. (O'Dwyer et al. 2013).

The use of the nuclear marker 18S rRNA is very popular, almost exclusively, in phylogenetic analyses of hemogregarines (Hrazdilová et al. 2021) and, in fact, has proven useful for molecular screening of *Hepatozoon* and species descriptions in snakes (O'Dwyer et al. 2013; Borges-Nojosa et al. 2017; Úngari et al. 2018; 2021), including our study. Yet, in recent years a discussion has been gaining momentum: the need for the improvement and employment of other genetic markers capable of responding more clearly to the phylogenetic relationships of the group (Abdel-Baki et al. 2014; Maia et al. 2016; Cook et al. 2018; Gutierrez-Liberato et al. 2021; Hrazdilová et al. 2021). In the recent differentiation of *Hepatozoon catesbiana* (Stebbins, 1903), *Hepatozoon clamatae* (Stebbins, 1905) and a third *Hepatozoon* genotype infecting frogs, the 18S rRNA marker showed low molecular divergence, and was noted to be inadequate for differentiation of these species (Léveillé et al. 2021). Hrazdilová et al. (2021) argue that the solution to this taxonomic puzzle of historical roots requires combinations of nuclear and mitochondrial markers. This approach may resolve deeper issues that permeate the phylogenetic position of *Hepatozoon* lineages vis-à-vis other hemogregarines, such as the problematic proposal of a new genus ('*Bartazoon*') for hepatozoids of non-carnivorous vertebrates (reptiles, amphibians, bats, rodents and marsupials) (Karadjian et al. 2015; Maia et al. 2016; Hrazdilová et al. 2021).

Overall, the phylogeny recovered in our study maintained the known paraphyletic pattern for *Hepatozoon* (Maia et al. 2012; Karadjian et al. 2015), where sequences obtained from amphibians, reptiles, rodents and mites tend to fall within the same major clade (Zechmeisterová et al. 2021). In this respect, probably due to the amount of sequences analyzed here, our phylogeny reveals clearer relationships regarding the positioning of *Hepatozoon* lineages in the herpetofauna, resulting in three well-structured clades. Furthermore, the phylogenetic relationships in our study were quite similar to those obtained by Úngari et al. (2021) and Zechmeisterová et al. (2021), but diverged with the positioning of some lineages in the study from Gutierrez-Liberato et al. (2021). In this case, we find in our phylogenetic tree that *Hepatozoon simidi* Gutierrez-Liberato et al. 2021 is most closely related to *H. massardii* and *H. cevapii*, two sequences that were absent in the analyses performed by Gutierrez-Liberato et al. (2021).

On the phylogenetic positioning of *H. carinicauda*, this new lineage appears as a sister taxon to a clade composed of *Hepatozoon* sequences from anurans, lizards, snakes and a thrombiculid mite, from different locations in South America. Interestingly, *H. carinicauda* was placed isolated and distant from the other

sequences obtained in aquatic hosts. *Hepatozoon sipedon* Smith et al. 1994 from the aquatic snake *Nerodia sipedon* (Linnaeus, 1758) (JN181157; Barta et al. 2012) and *H. simidi* from the Colombian wood turtle, *Rhinoclemmys melanosterna* (Gray, 1861), (MT754271; Gutierrez-Liberato et al. 2021) possess closer proximity and are inserted into a large clade. Haplotypes of *H. caimani* (MF435048-MF322539; Bouer et al. 2017) from caimans are clustered in another clade, distantly related to other aquatic hemogregarine lineages, including *H. carinicauda*. Therefore, *Hepatozoon* lineages isolated from hosts associated with aquatic environments are paraphyletic, with at least three evolutionary origins.

It is assumed that for *Hepatozoon*, as for many other groups of heteroxenous parasites (Votýpka et al. 2017), their evolutionary history can be better told through their vectors (Barta et al. 2012), and probably the uniqueness position of *H. carinicauda* position in the phylogeny may be a reflection of this relationship. Unfortunately, there is still no confirmation about the vectors of *H. carinicauda*. Pessôa and Cavalheiro (1969b) carried out an experimental transmission of *H. carinicauda* to leeches *H. lutzii*, by hematophagy on an infected *H. carinicaudus* snake, and after 40 days they observed the formation of sporulated oocysts. However, as the authors did not provide information whether snakes and/or possible paratenic hosts were fed leeches containing developed oocysts and later examined for infection, it is not possible to conclude whether these invertebrates are vectors. Furthermore, to date there is no proof that leeches can be involved in the transmission of *Hepatozoon* (Telford 2009). Indeed, for these hemoparasites in aquatic vertebrates the recognized vectors are mosquitoes, such as: *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 and *Culex territans* Walker, 1856 which can transmit *H. sipedon* to *Lithobates pipiens* (Schreber, 1782), a paratenic host subsequently preyed upon by *N. sipedon* (Smith et al. 1994); *Culex fatigans* Wiedemann, 1828, in which complete sporogony of *H. caimani* was observed after hematophagy in infected caiman (Lainson et al. 2003); and there is also the report of *Culex* mosquitoes belonging to the subgenus *Melanoconion*, mainly *Culex theobaldi* (Lutz, 1904) as natural vectors for *H. caimani* (Viana et al. 2010). Thus, we emphasize the importance of conducting studies with vectors, especially in the natural environment, to explore the relationship that may exist between *Hepatozoon* from terrestrial and aquatic hosts, as well as to elucidate the life cycles of these parasites, a research field that remains underexplored.

The evolutionary relationships obtained at the phylogenetic tree and haplotype network were similar. The isolation trend of *H. carinicauda* is repeated and the haplotypes from reptiles remains evenly distributed as they are in the clades of the phylogenetic tree, an organization pattern already observed in haplotypes of distinct *Hepatozoon* species, such as wild cat *Felis silvestris* (Schreber, 1775) and domestic cats from South Africa (Hodžić et al. 2017; Harris et al. 2019). In the network, *H. carinicauda* haplotype is located in a center position,

which suggests that it is ancestral haplotype than the more external ones (that represent species that diverged more recently) (Flanley et al. 2018). However, as the relationships in the network have only recently been studied, these can be unstable and change as more sequences are incorporated. Furthermore, many mutational events are visualized throughout the network, enabling the visualization of five haplogroups. The presence of median vectors indicate that they are *Hepatozoon* species that have not been sampled yet, so more reptilian hepatozoid sequences need to be analyzed in haplotype networks to better understand the relationships among these group.

In sum, our study presented the first redescription, with addition of molecular data, of a *Hepatozoon* species that infects snakes in the Brazilian Amazonia. We also provide the first genetic record of hemogregarines in neotropical aquatic snakes and expand the knowledge on geographic distribution of *H. carinicauda* in the Brazilian territory. Furthermore, our phylogenetic results showed that sequences isolated from aquatic hosts are not monophyletic, which may indicate a lower evolutionary relationship of these parasites with the environment used by their vertebrate hosts. Finally, we emphasize the need for more studies, mainly those involving vector aspects, since there is still a large gap in knowledge about the taxonomy, natural history and evolution of parasites in wild hosts, especially in the Amazonia.

Acknowledgements We are grateful to Brazilian CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the Masters Scholarship to FPR; to Postgraduate Development Program (PDPG - Amazônia Legal / CAPES) and to One Health Project in Areas of Urban and Peri-Urban Streams from Porto Velho (SUIg_PVH / UNIR / CAPES) for the Postdoctoral Fellowship to AMP; FAPESP (Process#2019/15150-4) for PhD Fellowship to LP; to Adriane C. Ramires for editing the figures. We are also thankful to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for the Productivity Grant conceived to MRA (CNPq Process #302420/2017-7).

Funding information This study was financed in part by CAPES (Finance Code 001), and was also supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Universal 429.132/2016-6 to LAV).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in this study involving animals were approved by the ethics committee on animal use from UNIFAP (protocol number 02/2020), and snakes sampling and access to the genetic data were authorised by the Brazilian Ministry of the Environment (SISBIO number 74153 and SISGEN AB23235, respectively).

References

- Abdel-Baki AA, Al-Quraishy S, Zhang J (2014) Redescription of *Haemogregarina garnhami* (Apicomplexa: Adeleorina) from the blood of *Psammophis schokari* (Serpentes: Colubridae) as *Hepatozoon garnhami* n. comb. based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Acta Parasitol* 59: 294–300. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0241-3>
- Aguiar LFS, Di-Bernardo M (2004) Diet and feeding behavior of *Helicops infrataeniatus* (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) in southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ* 39:7–14. <https://doi.org/1080/01650520412331270927>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Ávila RW, Ferreira VL, Arruda JA (2006) Natural history of the South American water snake *Helicops leopardinus* (Colubridae: Hydropsini) in the Pantanal, central Brazil. *J Herpetol* 40:274–279. <https://doi.org/10.1670/113-05N.1>
- Bandelt H, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS, Smith TG (2012) Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rRNA sequences. *J Eukaryot Microbiol* 59:171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x>
- Borges-Nojosa DM, Borges-Leite MJ, Maia JP, Zanchi-Silva D, da Rocha BR, Harris DJ (2017) A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) 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>
- Bouer A, André MR, Gonçalves LR, Luzzi MDC, Oliveira JPD, Rodrigues AC, Varani AM, Miranda VFO, Perles L, Werther K, Machado RZ (2017) *Hepatozoon caimani* in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia

- Alligatoridae) from North Pantanal, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 26:352–358. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017041>
- Braz HB, Scartozzoni RR, Almeida-Santos SM (2016) Reproductive modes of the South American water snakes: a study system for the evolution of viviparity in squamate reptiles. *Zool Anz* 263:33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2016.04.003>
- Carvalho TC, De Assis Montag LF, Dos Santos-Costa MC (2017). Diet composition and foraging habitat use by three species of water snakes, *Helicops* Wagler 1830 (Serpentes: Dipsadidae) in eastern Brazilian Amazonia. *J Herpetol* 51:215–222. <https://doi.org/10.1670/15-161>
- Costa HC, Bérnils RS (2018) Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. *Herpetol Bras* 7:11–57.
- Cook CA, Netherlands EC, Smit NJ, Van As J (2018) Two new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa; Hepatozoidae) parasitising species of *Philothamnus* (Ophidia: Colubridae) from South Africa. *Folia Parasitol* 65:004. <https://doi.org/10.14411/fp.2018.004>
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De Paula FR, Picelli AM, Da Silva MRL, Correa JKC, Viana LA (2021) *Hepatozoon cevapii* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in the *Thamnodynastes lanei* snake (Colubridae, Tachymenini) from the Eastern Amazon, Brazil. *Parasitol Res*. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07218-4>
- Flanley CM, Ramalho-Ortigao M, Coutinho-Abreu IV, Mukbel R, Hanafi HA, El-Hossary SS et al (2018) Population genetics analysis of *Phlebotomus papatasi* sand flies from Egypt and Jordan based on mitochondrial cytochrome b haplotypes. *Parasit Vectors* 11:214. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2785-9>
- Fonseca MS, Bahiense TC, Silva AAB, Onofrio VC, Barral TD, Souza BMP, Lira-da-Silva RM, Biondi I, Meyer R, Portela RW (2020) Ticks and associated pathogens from rescued wild animals in rainforest fragments of northeastern Brazil. *Front Vet Sci* 7:177. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00177>
- Freitas MA (2003) Serpentes brasileiras. Lauro de Freitas. Malha de Sapo Publicações e Consultoria Ambiental
- Godfrey RD Jr, Fedynich AM, Pence DB (1987) Quantification of haematozoa in blood smears. *J Wildlife Dis* 23:558–565. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.4.558>
- Gutiérrez-Liberato GA, Lotta-Arévalo IA, Rodríguez-Almonacid CC, Vargas-Ramírez M, Matta NE (2021) Molecular and morphological description of the first *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) species

- infecting a neotropical turtle, with an approach to its phylogenetic relationships. *Parasitol* 148:747–759. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000184>
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Ac Symp Series* 41:95–98. <https://doi.org/10.1021/bk-1999-0734.ch008>
- Hay ME, Poulin R, Jorge F (2020) Macroevolutionary dynamics of parasite diversification: A reality check. *J Evol Biol* 33:1758–1769. <https://doi.org/10.1111/jeb.13714>
- Harris DJ, Maia JP, Perera A (2011) Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *J Parasitol* 97:106–111. <https://doi.org/10.1645/GE-2470.1>
- Harris DJ, Santos J, Rampedi KM, Halajian A, Xavier R (2019) Genetic diversity of *Hepatozoon* (Apicomplexa) from domestic cats in South Africa, with a global reassessment of *Hepatozoon felis* diversity. *J S Afr Vet Assoc* 90:1–6. <https://doi.org/10.4102/jsava.v90i0.1747>
- Hodzic A, Alic A, Prasovic S, Otranto D, Baneth G, Duscher GG (2017) *Hepatozoon silvestris* sp. nov.: morphological and molecular characterization of a new species of *Hepatozoon* (Adeleorina: Hepatozoidae) from the European wild cat (*Felis silvestris silvestris*). *Parasitol* 144:650–661. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002316>
- Hrazdilová K, Cervená B, Blanvillain C, Foronda P, Modrý D (2021) Quest for the type species of the genus *Hepatozoon* – phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. *Syst Biodivers* 1–10. <https://doi.org/10.1080/14772000.2021.1903616>
- Hull RW, Camin JH (1960) Haemogregarines in snakes: the incidence and identity of the erythrocytic stages. *J Parasitol* 46:515–523. <https://doi.org/10.2307/3275151>
- Karadjian G, Chavatte JM, Landau I (2015) Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* ng, reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite* 22:31. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015031>
- Katoh k, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service:multiple sequence alignment, interactive, sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* 1: 7.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547–1549.
- Lainson R, Paperna I, Naiff RD (2003) Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. *Mem Inst Osw Cruz* 98:103–113. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000100014>

- Léveillé AN, Zeldenrust EG, Barta JR (2021) Multilocus genotyping of sympatric *Hepatozoon* species infecting the blood of Ontario ranid frogs reinforces species differentiation and identifies an unnamed *Hepatozoon* species. *J Parasitol* 107:246–261. <https://doi.org/10.1645/20-18>
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Maia JP, Carranza S, Harris DJ (2016) Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: are more data needed?. *J Parasitol* 102:549–552. <https://doi.org/10.1645/15-930>
- Maia JP, Perera A, Harris DJ (2012) Molecular survey and microscopic examination of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) in lacertid lizards from the western Mediterranean. *Folia Parasit*, 59:241–248. <https://doi.org/10.14411/fp.2012.033>
- Morand S (2015) (macro-) Evolutionary ecology of parasite diversity: From determinants of parasite species richness to host diversification. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 4:80–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.01.001>
- Morrison DA (2009). Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol* 25:375–382. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>
- Murphy JC, Muñoz-Mérida A, Auguste RJ, Lasso-Alcala O, Rivas GA, Jowers MJ (2020) Evidence for cryptic diversity in the Neotropical water snake, *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758) (Dipsadidae, Hydropsini), with comments on its ecology, facultative reproductive mode, and conservation. *Amphib Reptile Conse* 14:138–155
- Nogueira CC, Argôlo AJS, Arzamendia V, Azevedo JA, Barbo FE et al (2019) Atlas of Brazilian Snakes: Verified point-locality maps to mitigate the Wallacean shortfall in a megadiverse snake fauna. *South Am J Herpetol* 14:1–274. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-19-00120.1>
- O'Dwyer LH, Moço TC, Paduan KS, Spenassatto C, Silva RJ, Ribolla PEM (2013) Descriptions 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>
- Perkins SL, Martinsen ES, Falk BG (2011) Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitol* 138:1664–1674. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000679>
- Pessôa SB, Cavalheiro J (1969a). Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras – VII. *Rev Brasil Biol* 29:351–354.

- Pessoa SB, Cavalheiro J (1969b). Notas sobre hemogregarinas de serpentes Brasileiras. IX. Sobre a hemogregarina da *Helicops carinicauda* (Wied). Rev Goiana Méd 15:161–168.
- Pessoa SB, De Biasi P, Puerto G (1974). Nota sobre a frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. Mem Inst Butantan 38: 69–118.
- Picelli AM, Da Silva MRL, Ramires AC, Da Silva TRR, Pessoa FAC, Viana LA, Kaefer IL (2020) Redescription of *Hepatozoon ameivae* (Carini and Rudolph, 1912) from the lizard *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758). Parasitol Res 119:2659–2666. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06760-x>
- Poulin R, Morand S (2004) Parasite biodiversity. Smithsonian Institution Press, Washington
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci 74:5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schoneberg Y, Kohler G (2021) Distribution and identification of the species in the genus *Helicops* Wagler, 1830 (Serpentes, Colubridae, Xenodontinae). Arpha Preprints. <https://doi.org/10.3897/arphapreprints.e67869>
- Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D (2007) A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. J Parasitol 93:1189–1198. <https://doi.org/10.1645/GE-1200R.1>
- Smith TG, Desser SS, Martin DS (1994) The development of *Hepatozoon sipedon* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the northern leopard frog (*Rana pipiens*). Parasitol Res 80:559–568. <https://doi.org/10.1007/BF00933003>
- Smith TG (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J Parasitol 82:565–585. <https://doi.org/10.2307/3283781>
- Sykes IVJM, Klaphake E (2008) Reptile hematology. Vet Clin Exot Animl 11:481–500. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.005>
- Sumrandee C, Baimai V, Trinachartvanit W, Ahantarig A (2015) *Hepatozoon* and *Theileria* species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand. Ticks Tick-Borne Dis 6:309–315. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.02.003>
- Telford SR Jr, Wozniak EJ, Butler JF (2001) Haemogregarine specificity in two communities of Florida snakes, with descriptions of six new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) and a possible species of

Haemogregarina (Apicomplexa: Haemogregarinidae). J Parasitol 87:890–905.
[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0890:HSITCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0890:HSITCO]2.0.CO;2)

Telford SR Jr (2009) Hemoparasites of the Reptilia: color atlas and text. CRC Press, Boca Raton

Trifinopoulos J, Nguyen LT, Von Haeseler A, Minh BQ (2016) W-IQ-TREE: a fast-online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucl Acids Res 44:232–235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>

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 LP, Santos AL, O’Dwyer LH, Da Silva MR, Santos TC, Da Cunha MJ, Cury MC (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 LP, Netherlands EC, De Alcantara EP, Emmerich E, Da Silva RJ (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 Parasitol: 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s11686-021-00355-x>

Viana LA, Soares P, Paiva F, Lourenço-de-Oliveira R (2010) Caiman-biting mosquitoes and the natural vectors of *Hepatozoon caimani* in Brazil. J Med Entomol 47:670–676. <https://doi.org/10.1093/jmedent/47.4.670>

Vilcins IME, Ujvari B, Old JM, Deane E (2009) Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern Territory Australia. J Parasitol 95:434–442.

Votýpka J, Modrý D, Oborník M, Slapeta J, Lukes J (2017) Apicomplexa. In: Archibald JM, Simpson GB, Slamovits CH (Eds.) Handbook of the Protists. Boston, EUA, pp 1–58.

Yuki RN, Lema T (2005) Análise comparativa entre as cobras d’água meridionais (*Helicops carinicaudus* (wied, 1825) e *Helicops infrataeniatus* Jan, 1865), com a descrição do crânio e hemipênis (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae). Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS Ser Zool 18:85–128

Zechmeisterová K, Javanbakht H, Kvicerová J, Siroký P (2021) Against growing synonymy: Identification pitfalls of *Hepatozoon* and *Schellackia* demonstrated on North Iranian reptiles. Eur J Protistol 125780.
<https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125780>

7. CONCLUSÕES

H1: As espécies de *Hepatozoon* das serpentes *Thamnodynastes lanei* diferem dos parasitos de *Helicops angulatus*.

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que as serpentes *T. lanei* e *H. angulatus* abrigavam diferentes espécies do parasito, *Hepatozoon cevapii* e *Hepatozoon carinicauda* respectivamente. Assim, ampliando a distribuição geográfica das espécies *H. cevapii* e *H. carinicauda* descritas anteriormente em serpentes da região sudeste. *Hepatozoon cevapii* que tem sua descrição a partir do viperídeo *Crotalus durissus terrificus*, é registrada no colubrídeo *T. lanei*. *Hepatozoon carinicauda*, descrita há mais de cinquenta anos na serpente *H. carinicaudus*, é redescrita a partir de taxonomia integrativa na serpente de mesmo gênero *H. angulatus*.

H2: *Hepatozoon* spp. de hospedeiros aquáticos, assim como *Hepatozoon* spp. de *Helicops angulatus*, são monofiléticos.

A monofilia de espécies de *Hepatozoon* de hospedeiros aquáticos não é confirmada. Assim, como também não é observada nenhuma relação filogenética próxima do parasito de *H. angulatus* com outras espécies de hospedeiros aquáticos.

H3: As espécies de *Hepatozoon* de *Thamnodynastes lanei* e *Helicops angulatus* posicionam-se filogeneticamente agrupados as demais sequências de *Hepatozoon* de hospedeiros da América do Sul.

O posicionamento filogenético dos parasitos do presente trabalho com as demais sequências de hospedeiros da América do Sul é confirmada apenas para o parasito de *H. angulatus*, uma vez que o parasito de *T. lanei* se posiciona em um clado que também abriga sequências da África do Sul.

7.1 COMENTÁRIOS FINAIS

Por fim, os resultados encontrados também revelam que a área de estudo tem grande potencial para trabalhos com detecção de *Hepatozoon*, dado que duas espécies do parasito foram detectadas em uma amostragem pequena de dois hospedeiros provenientes de região com perturbações antrópicas. Assim, trabalhos futuros são esperados para que o conhecimento de *Hepatozoon* de serpentes seja aperfeiçoado, principalmente os da região Amazônica.

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP**

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 28 de dezembro de 2020, o parecer referente ao protocolo no. **002/2020** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **“ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO”** coordenado por **Lúcio André Viana Dias**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 28 December 2020, the final decision about the Protocol **002/2020** and certify that the research project entitled **“ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO”** coordinated by **Lúcio André Viana Dias**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 28 de dezembro de 2020

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74153-1	Data da Emissão: 04/03/2020 18:20:49	Data da Revalidação*: 04/03/2021
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: Fabiane Rocha de Paula	CPF: 023.954.152-94
Título do Projeto: ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Defesa final	01/2021	02/2021
2	Finalização de dissertação	12/2020	01/2021
3	Submissão de artigo	10/2020	11/2020
4	Análise molecular	09/2020	10/2020
5	Descrição Morfológica e morfométrica	08/2020	09/2020
6	Análise de dados	06/2020	08/2020
7	Coleta de amostras biológicas de serpentes, anfíbios e mosquitos	03/2020	06/2020
8	Realização dos experimentos	03/2020	06/2020
9	Coleta dos animais	03/2020	05/2021

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	SAMUEL CARVALHO VIDAL	Colaborador	790.755.842-53	Brasileira
2	Wagner Amanajás Cardoso	Colaborador	617.464.602-53	Brasileira
3	JAMILLE KARINA COELHO CORREA	Colaborador	848.851.902-82	Brasileira
4	Pedro Hugo Esteves da Silva	Colaborador	552.257.642-15	Brasileira

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

Código de autenticação: 0741530120200304

Página 1/6

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74153-1	Data da Emissão: 04/03/2020 18:20:49	Data da Revalidação*: 04/03/2021
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: Fabiane Rocha de Paula	CPF: 023.954.152-94
Título do Projeto: ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Observações e ressalvas

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

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

Código de autenticação: 0741530120200304

Página 2/6

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74153-1	Data da Emissão: 04/03/2020 18:20:49	Data da Revalidação*: 04/03/2021
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: Fabiane Rocha de Paula	CPF: 023.954.152-94
Título do Projeto: ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Outras ressalvas

1	AS ARMADILHAS TIPO 'PITFALL' DEVEM SER VISTORIADAS AO MENOS DUAS VEZES AO DIA, POSSUIR APARATOS PARA EVITAR A INSOLAÇÃO E FUIROS PARA PERMITIR A DRENAGEM DE ÁGUA EVITANDO AFOGAMENTO, BEM COMO PERMANECEREM INATIVAS DURANTE OS INTERVALOS DE AMOSTRAGEM E DEVERÃO SER RETIRADAS AO TÉRMINO DA PESQUISA. DEVE-SE ASSEGURAR QUE INDIVÍDUOS CAPTURADOS PERTENCENTES À TAXA NÃO CONTEMPLADO NA AUTORIZAÇÃO, SEJAM SOLTOS EM BOM ESTADO DE SAÚDE.	RAN Goiânia-GO
---	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Calçoene	Calçoene-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
2	Macapá	Macapá-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
3	Ferreira Gomes	Ferreira Gomes-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
4	Santana	Santana-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
5	Serra do Navio	Serra do Navio-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
6	Tartarugalzinho	Tartarugalzinho-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
7	Vitória do Jari	Vitória do Jari-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
8	Cutias	Cutias-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
9	Oiapoque	Oiapoque-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
10	Pedra Branca do Amapari	Pedra Branca do Amapari-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
11	Porto Grande	Porto Grande-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
12	Amapá	Amapá-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
13	Itaubal	Itaubal-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
14	Laranjal do Jari	Laranjal do Jari-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal
15	Mazagão	Mazagão-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
16	Pracuúba	Pracuúba-AP	Amazônia	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Fora de UC Federal
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74153-1	Data da Emissão: 04/03/2020 18:20:49	Data da Revalidação*: 04/03/2021
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: Fabiane Rocha de Paula	CPF: 023.954.152-94
Título do Projeto: ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Captura de animais silvestres in situ	Anura	-
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Anura	50
3	Captura de animais silvestres in situ	Viperidae	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Viperidae	-
5	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Viperidae	3
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dipsadidae	-
7	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Dipsadidae	3
8	Captura de animais silvestres in situ	Dipsadidae	-
9	Captura de animais silvestres in situ	Boidae	-
10	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Boidae	-
11	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Boidae	3
12	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Culex	1000
13	Captura de animais silvestres in situ	Hirudinoidea	-
14	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hirudinoidea	100
15	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Elapidae	-
16	Captura de animais silvestres in situ	Elapidae	-
17	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Elapidae	3
18	Captura de animais silvestres in situ	Ixodida	-
19	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Ixodida	100
20	Captura de animais silvestres in situ	Colubridae	-
21	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Colubridae	-
22	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Colubridae	3

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas(fragmento de tecidos/ órgão)
2	Amostras biológicas (Répteis)	Fragmento de tecido/órgão, Fezes, Sangue
3	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(CONCHA DE METAL)
4	Método de captura/coleta (Insetos)	Armadilha luminosa
5	Método de captura/coleta (Invertebrados)	Captura manual
6	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual

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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74153-1	Data da Emissão: 04/03/2020 18:20:49	Data da Revalidação*: 04/03/2021
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: Fabiane Rocha de Paula	CPF: 023.954.152-94
Título do Projeto: ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
7	Método de captura/coleta (Répteis)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta (BUSCA ATIVA, ARMADILHA DE MINNOW), Armadilha de queda pit fall

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	BPI BIOTECNOLOGIA, PESQUISA E INOVACAO LTDA	Laboratório
2	Fundação Universidade Federal do Amapá	Laboratório

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 74153-1	Data da Emissão: 04/03/2020 18:20:49	Data da Revalidação*: 04/03/2021
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: Fabiane Rocha de Paula	CPF: 023.954.152-94
Título do Projeto: ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 0741530120200304



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 AB23235

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: **AB23235**
Usuário: **Unifap**
CPF/CNPJ: **34.868.257/0001-81**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Hepatozoon Hepatozoon spp.

Título da Atividade: **ESTUDOS SOBRE PARASITOS DO GÊNERO HEPATOZOON (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) EM SERPENTES DA AMAZÔNIA ORIENTAL: TAXONOMIA E INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO.**

Equipe

Fabiane Rocha de Paula	Unifap
Amanda Maria Picelli	Universidade Federal do Amazonas
Lívia Perles	Unesp FCAV
Lúcio André Viana Dias	Universidade Federal do Amapá

Data do Cadastro: **29/10/2020 18:16:41**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:38** de **12/08/2021**.



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