



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEPATÓZOON DETECTADOS EM
CANÍDEOS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NO DISTRITO FEDERAL**

THAIS DE OLIVEIRA FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEPATÓZOON DETECTADOS EM
CANÍDEOS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NO DISTRITO FEDERAL**

THAIS DE OLIVEIRA FERNANDES

ORIENTADORA: PROF. DRA. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PLUBLICAÇÃO 255/22

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2022**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEPATOOZON DETECTADOS EM
CANÍDEOS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NO DISTRITO FEDERAL**

THAIS DE OLIVEIRA FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADA POR:

**GIANE REGINA PALUDO, Doutora (UNB)
(ORIENTADORA)**

**ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE, Doutor (UNESP)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**MARCIO BOTELHO DE CASTRO, Doutor (UNB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 09 de JUNHO de 2022

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERNANDES, T. O. **Caracterização molecular de *Hepatozoon* detectados em canídeos domésticos e silvestres no Distrito Federal**

Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 59 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDES, T. O. Caracterização molecular de <i>Hepatozoon</i> detectados. em canídeos domésticos e silvestres no Distrito Federal Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília 2022 59 p.
--

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Giane Regina Paludo. Pela confiança, paciência, orientação e ao direcionamento para uma carreira profissional.

À toda a minha família, principalmente meus pais Janete e Agnaldo, por sempre apoiar e nunca deixar desistir dos meus objetivos.

Aos meus amigos da vida toda que me apoiam em todos os momentos não importando a distância, Fabiene, Daiane, Anderson, Ana Clara, George, Emilli e Maira.

Aos amigos que fiz em Brasília que me ajudaram durante todos esses anos desde a residência Talita, Luma, Adriana, Izabelle, Janaina, Matheus, Marina, Thais Sermoud, Sandy, Ana Paula e George.

Aos residentes e funcionários do laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UnB e do Hospital Veterinário pela paciência e auxílio em todo o experimento entre outros trabalhos.

À Universidade de Brasília (Unb), assim como o Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais pela oportunidade de academicamente executar esse projeto, expandir conhecimento e transmitir a informação a população.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos Específicos	14
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Agente	15
3.2 Distribuição	16
3.3 Hospedeiros	16
3.3.1 Hospedeiros Vertebrados	16
3.3.2 Hospedeiros Invertebrados	17
3.4 Ciclo	17
3.5 Patogenia	19
3.6 Sinais clínicos	20
3.7 Diagnóstico	21
3.7.1 Análises Moleculares	21
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2	30
1.0 INTRODUÇÃO	33
2.0 MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Amostras	34
2.2 Análises	34
2.2.1. Avaliação Hematológica	34
2.2.2 Ensaios Moleculares	34
3.0 RESULTADOS	40
3.1. Avaliação Clínica e Laboratorial	40
3.2. Amplificações por PCR	40
3.3 Análise de sequências por BLASTn	41
3.4. Análises Filogenéticas	43
4.0 DISCUSSÃO	50
5.0 CONCLUSÃO	55
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

Hepatozoon spp. é um protozoário que infecta uma variedade de carnívoros domésticos e selvagens. Devido à dificuldade de obter maiores fragmentos do agente, informações a respeito da caracterização molecular são imprescindíveis para compreender qual espécie do gênero está presente no país. Foram testadas amostras de sangue total de cães domésticos e silvestres com suspeita de hemoparasitoses ou suspeita prévia para *Hepatozoon* spp. Inicialmente foi realizada uma triagem das amostras para o gênero *Hepatozoon* spp., onde 22 amostras foram positivas e submetidas a caracterização molecular usando ensaios convencionais de PCR com outros quatro conjuntos de oligonucleotídeos do gene 18S rDNA. Cinco amostras positivas em todos os conjuntos foram submetidas ao sequenciamento e após trimagem e análise de qualidade geraram sequências do gene 18S rDNA de *Hepatozoon canis*. Posteriormente, foi obtida uma árvore filogenética, com cerca de 1.300 nucleotídeos por amplicon, por análise bayesiana utilizando fragmentos parciais do gene 18S rDNA de 58 isolados de *H. canis*. Para construção das redes de haplótipos, foram utilizadas 68 sequências oriundas tanto do banco de dados GenBank como do presente estudo. Três das sequências obtidas se caracterizam como os maiores fragmentos de isolados brasileiros já detectados em *Canis lupus familiaris*. Na árvore filogenética, as três sequências de cães domésticos (ID-3, ID-4 e ID-5) e uma sequência de raposinha-do-campo, um canídeo silvestre (ID-2) se agruparam no mesmo clado que reúne os outros isolados de *H. canis*. Esses três isolados de cão doméstico do Distrito Federal não formaram um grupo monofilético, mas se mostraram mais próximos filogeneticamente, além disso, encontram-se em uma posição mais basal em relação às outras sequências de *H. canis*. O isolado da raposinha-do-campo mostrou-se, filogeneticamente mais distante dos outros três isolados de cães domésticos identificados no presente estudo. As duas redes construídas, uma avaliando filogeograficamente os isolados e outra correlacionando os seus hospedeiros, mostraram a existência de 10 haplótipos no Brasil, dentre eles, o haplótipo H10, o segundo maior haplótipo brasileiro identificado, que apresenta nove isolados sendo três deles as sequências de cães domésticos deste estudo. A sequência do canídeo silvestre (raposinha-do-campo), agrupou-se no haplótipo H5, juntamente com mais duas sequências, tendo como hospedeiros desses isolados as espécies *Tapirus terrestris* e *Lycalopex vetulus*. A análise bayesiana revelou a existência mais provável de dois grupos genéticos no Brasil de *H. canis*, com a indicação de fluxo gênico desse agente no país.

PALAVRAS CHAVES: 1. Hepatozoon 2. Caracterização Molecular 3. Canídeos Domésticos 4. Canídeos Silvestres

ABSTRACT

Hepatozoon spp. is a protozoan that infects a variety of domestic and wild carnivores. Due to the difficulty of obtaining larger fragments of the agent, information about molecular characterization is essential to understand which species of the genus is present in the country. Whole blood samples from domestic and wild dogs with suspected hemoparasitosis or previous suspicion for *Hepatozoon* spp. Initially, samples were screened for the genus *Hepatozoon* spp., where 22 samples were positive and subjected to molecular characterization using conventional PCR assays with four other sets of oligonucleotides from the 18S rDNA gene. Five positive samples in all sets were submitted to sequencing and after trimming and quality analysis generated sequences of the 18S rDNA gene from *Hepatozoon canis*. Subsequently, a phylogenetic tree was obtained, with approximately 1,300 nucleotides per amplicon, by Bayesian analysis using partial fragments of the 18S rDNA gene from 58 *H. canis* isolates. To construct the haplotype networks, 68 sequences from both the GenBank database and the present study were used. Three of the sequences obtained are characterized as the largest fragments of Brazilian isolates ever detected in *Canis lupus familiaris*. In the phylogenetic tree, the three sequences from domestic dogs (ID-3, ID-4 and ID-5) and one sequence from a foxtail, a wild canid (ID-2) were grouped in the same clade that brings together the others. isolates of *H. canis*. These three isolates of domestic dogs from the Federal District did not form a monophyletic group, but they were phylogenetically closer, in addition, they are in a more basal position in relation to the other sequences of *H. canis*. The isolated fox-do-camp was phylogenetically more distant from the other three isolates from domestic dogs identified in the present study. The two networks built, one phylogeographically evaluating the isolates and the other correlating their hosts, showed the existence of 10 haplotypes in Brazil, among them, the H10 haplotype, the second largest identified Brazilian haplotype, which presents nine isolates, three of them being the sequences of domestic dogs in this study. The sequence of the wild canid (fox-do-field) was grouped in the H5 haplotype, together with two more sequences, having as hosts of these isolates the species *Tapirus terrestris* and *Lycalopex vetulus*. The Bayesian analysis revealed the most probable existence of two genetic groups of *H. canis* in Brazil, indicating the gene flow of this agent in the country.

KEYWORDS: 1. Hepatozoon 2. Molecular Characterization 3. Domestic Canids 4. Wild Canids

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – Ciclo biológico da espécie de *Hepatozoon canis* em canídeos domésticos 18

Capítulo 2

Figura 1. Representação esquemática do gene 18S rDNA completo e oligonucleotídeos..... 36

Figura 2 – A) Gametócito de *Hepatozoon* em monócito canídeo doméstico. B) Gametócito de *Hepatozoon* em monócito de canídeo silvestre..... 40

Figura 3 - Árvore Filogenética de gene 18S rDNA de quatro sequências obtidas no estudo..... 45

Figura 4 – Rede de haplótipos de isolados de *H. canis* no Brasil e outros de países.46

Figura 5 – Rede de haplótipos representando hospedeiros de isolados de *H. canis* no Brasil..... 47

Figura 6 – Análise bayesiana de estrutura populacional de *Hepatozoon canis* no Brasil..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos para análise molecular do gene 18S rDNA	35
Tabela 2 - Regiões do gene 18S para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados.	37
Tabela 3 - Resultado das PCR realizadas para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados que amplificaram regiões do gene 18S rDNA em canídeos silvestres e domésticos no Distrito Federal e entorno.	41
Tabela 4 - Valores de identidade apresentados da análise de BLATn dos isolados testados.	42
Tabela 5- Matriz de identidade dos isolados ID-3, ID-4, ID-5 (identificação de cães domésticos) e ID-2 (identificação de cão silvestre) do Distrito Federal.....	43
Tabela 6 - Identificação de haplótipos e números de acesso das sequências correspondentes com destaque nos estados e hospedeiros dos isolados brasileiros e de outros países.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius de Temperatura

μL – Microlitros

μMol – Micromol

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

cPCR – Reação de Polimerase em Cadeia convencional

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Trifosfato de Desoxirribonucleosideos

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acéico

GAPDH – Gliceraldeido-3-fosfato-desidrogenasemM-Milimo

nPCR – Reação em cadeia polimerase *nested*

pb – Pares de Base

qPCR – Reação de Polimerase em tempo real

VCM – Volume Corpuscular

VG – Volume Globular



CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.0 INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses apresentam distribuição mundial, e estão entre as doenças com grande importância clínica, por ser umas das principais causas de morbidade e mortalidade nos animais. São descritas em uma variedade de hospedeiros mamíferos, principalmente em canídeos domésticos, o que merece destaque considerando o aumento da população de animais de estimação nos últimos anos (AGUIAR et al., 2014; BERNDT et al., 2019; FISHER et al., 2020; GIANNELLI et al., 2017a; PAIZ et al., 2016). Podem ser ocasionadas por um agente isolado ou por co-infecção. Entre os agentes causadores estão *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. e *Hepatozoon* spp. (DÍAZ-SÁNCHEZ et al., 2021; HRAZDILOVÁ et al., 2021; MODRÝ et al., 2017; OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009).

A maioria das doenças causadas por hemoparasitas e/ou hemoprotozoários apresentam como principal vetor biológico *Rhipicephalus sanguineus* pela ampla distribuição pelo mundo e ser adaptável as alterações ambientais. Além disso, é responsável pela grande capacidade vetorial de agentes etiológicos. Outras espécies responsáveis por ocasionar hemoparasitoses são *Amblyomma ovale* e *Amblyomma maculatum*, ambos são vetores biológicos do *Hepatozoon* spp. (BANETH; SAMISH; SHKAP, 2007; CAPONI et al., 2020; FORLANO et al., 2005; GIANNELLI et al., 2017b; LEVI et al., 2018).

A hepatozoonose é uma doença hemoprotozoária enzoótica causada por várias espécies de *Hepatozoon* spp., e acomete numerosos carnívoros domésticos e selvagens. O agente pode causar infecções subclínicas, ou induzir uma doença leve ou causar doença grave e fatal. Por ser considerada uma enfermidade subdiagnosticada devido a semelhança dos sinais clínicos com a outras hemoparasitoses, a ausência da confirmação laboratorial pode ocasionar a omissão de um diagnóstico diferencial para o agente (BANETH et al., 2001; GUADARRAMA et al., 2020; LEVI et al., 2018; SUSAN E. SHAW, MICHAEL J. DAY, 2001)..

As espécies *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* são as mais descritas em canídeos pelo mundo (BANETH et al., 2001; EVANS, 1988; GONEN et al., 2004; MATHEW et al., 2000). Canídeos selvagens são considerados reservatórios para uma variedade de parasitas e podem servir como sentinela para doenças transmitidas por vetores emergentes, entretanto, existem poucas informações sobre a distribuição e impactos dos parasitas na vida selvagem. Assim, é de extrema importância a identificação de espécies de *Hepatozoon* presentes nesses animais para auxiliar na conservação e possíveis interferências em animais domésticos (AGUIRRE, 2009; MAIA et al., 2014b; TOMÉ et al., 2014).

2.0 OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotipicamente os isolados de *Hepatozoon* spp. em carnívoros domésticos e selvagens naturalmente infectados procedentes no Centro Oeste.

2.1 Objetivos Específicos

- Identificar através da técnica de reação em cadeia polimerase convencional a espécie de *Hepatozoon* spp. que acometem os animais do Distrito Federal
- Realizar análise filogenética de isolados de *Hepatozoon* spp.
- Realizar rede de haplótipos de isolados de *Hepatozoon* spp.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agente

No século XIX, *Hepatozoon* spp. foi classificado como da Família *Haemogregarinidae*, mas posteriormente alterado para *Hepatozoidae*. A alteração baseou-se no método de transmissão dos esporozoítos. O gênero da família *Haemogregarinidae* produzem esporozoítos livres transmitidos ao hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo de um carrapato, enquanto os esporozoítos de *Hepatozoon* spp. desenvolvem-se dentro de esporocistos e são transmitidos através da ingestão do hospedeiro vertebrado. Espécies de *Hepatozoon* pertencem ao subfilo Apicomplexa que apresentam características em comum com outros gêneros de protozoários como *Plasmodium* spp., *Toxoplasma* spp. e *Babesia* spp. Estes são parasitas obrigatórios, desenvolvem-se intracelularmente e possuem uma estrutura chamada complexo apical, que facilita a invasão e fixação do parasita nas células do hospedeiro (BANETH; SHKAP, 2003; MATHEW et al., 2000).

O gênero de apicomplexos *Hepatozoon* possuem mais 300 espécies, descrito como parafilético com divisão em vários gêneros distintos e podem infectar uma variedade de vertebrados. Apesar da grande variedade de hospedeiros nos ciclos de vida desses protozoários, todas as espécies compartilham biologia semelhante e uma via de transmissão única: a ingestão de esporozoítos infectivos (BARTA et al., 2012; KARADJIAN; CHAVATTE; LANDAU, 2015; OTRANTO et al., 2011; SMITH; DESSER, 1997).

Existem uma variedade de descrições na literatura da espécie de *Hepatozoon canis* em cães domésticos pelo mundo (Bouattour et al 2021; Spolidorio et al 2009; Rubini et al 2008; Guoa et al 2020) assim como de canídeos silvestres como *Vulpes vulpes* (raposa-vermelha) (GABRIELLI et al., 2010; ORKUN; NALBANTOĞLU, 2018), *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) (ALENCAR; KOHAYAGAWA; SANTARÉM, 1997)) e *Pseudalopex gymnocercus* (raposa-dos-pampas) (CRIADO-FORNELIO et al., 2006), *Canis aureus* (chacais dourados) (MITKOVA et al., 2017), *Canis mesomelas* (chacais-de-dorso-preto) (PENZHORN et al., 2018), *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) (VIANA et al., 2010). A espécie *Hepatozoon americanum* encontradas em canídeos domésticos e silvestres como os coiotes (*Canis latrans*) (PANCIERA et al., 2001; RAZMI et al., 2018).

3.2 Distribuição

Hepatozoon spp. possui distribuição mundial com relatos na África, Ásia, Europa, América do Sul e América do Norte. A distribuição da doença pelo mundo pode estar relacionada aos vetores biológicos, serem encontrados em diversas como regiões tropicais, subtropicais e temperadas (GABRIELLI et al., 2010; LI et al., 2008; MAIA et al., 2014a; MATJILA et al., 2008; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001; OTRANTO et al., 2011; VEZZANI; SCODELLARO; EIRAS, 2017).

A epidemiologia da hepatozoonose em animais selvagens e domésticos no Brasil demanda esclarecimentos. Estudos sobre a infecção de cães e de caracterização genética da espécie *H. canis* ou genótipos revelaram o agente etiológico da doença no país em alguns estados como São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (FORLANO et al., 2005; PALUDO et al., 2005; PEREZ; RUBINI; O'DWYER, 2004; SPOLIDORIO et al., 2009). Os genótipos relacionados a infecção por *H. americanum* detectaram presença do agente em canídeos silvestres como o cachorro-do-mato (MERINO et al., 2006; VIANA et al., 2010), felinos (ANDRÉ et al., 2015), cães domésticos (GOMES et al., 2016), quatis (*Nasua nasua*), jaguatirica (*Leopardus pardalis* (DE SOUSA et al., 2017).

3.3 Hospedeiros e Vetores

3.3.1 Hospedeiros Vertebrados

Hepatozoon spp. apresenta descrição em uma variedade de hospedeiros vertebrados. Nos cães, duas espécies são descritas *Hepatozoon canis*, com relatos em todo o mundo e *Hepatozoon americanum* encontrado na América do Norte (BANETH et al., 2001; GONEN et al., 2004; HODŽIĆ et al., 2015; NAJM et al., 2014).

As infecções por *H. canis* em cães domésticos podem variar de subclínicas a graves. A gravidade da infecção pelo agente se deve a carga parasitária no hospedeiro. Os animais manifestam como sinais clínicos letargia extrema, caquexia e anemia (Modry et al 2017; Baneth 2011). Enquanto, *Hepatozoon americanum* desenvolve doença grave, que afeta o sistema músculo esquelético e cardíaco. A doença é caracterizada por dor muscular induzida por miosite, claudicação severa e atrofia muscular. Os gametócitos nessa espécie raramente são identificados em esfregaços de sangue devido à baixa circulação de parasitemia.(GIANNITTI et al., 2012; SPOLIDORIO et al., 2009).

3.3.2 Vetores Biológicos

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é a espécie de ixodídeo mais difundida no mundo. Essa espécie de artrópode pode ser encontrada em ambiente urbano, áreas rurais assim como habitats de savanas ou florestas além de ser o principal artrópode encontrado nos cães domésticos e selvagens. A importância desta espécie se deve principalmente em seu papel como vetor de vários patógenos, incluindo bactérias e protozoários, como *Ehrlichia* spp. e *Hepatozoon* spp, respectivamente (FISHER et al., 2020; LEVI et al., 2018; OTRANTO; DANTAS-TORRES; BREITSCHWERDT, 2009).

Rhipicephalus sanguineus e *Amblyomma maculatum* são vetores mais comuns descritos na literatura, para a infecção por *Hepatozoon canis* e *Hepatozoon americanum* respectivamente, porém existem indícios de que outros carrapatos possam estar envolvidos (BANETH; SHKAP, 2003; DA SILVA et al., 2017; FISHER et al., 2020; GIANNELLI et al., 2017b; GONEN et al., 2004; PANCIERA et al., 2001). Estudos indicam a presença de oocistos de *H. canis* na hemocele de *Amblyomma ovale*, *Rhipicephalus microplus* e *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis flava*, *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, entretanto a competência vetorial dessas espécies ainda é desconhecida (AKTAS et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; FISHER et al., 2020; FORLANO et al., 2005; NAJM et al., 2014).

Existem estudos que indicam que nas áreas rurais ou suburbanas os canídeos podem ser infectados por outras espécies de carrapatos além dos conhecidos normalmente, espécies do gênero *Amblyomma* podem ser possíveis vetores biológicos da doença devido ao compartilhamento de ambiente entre hospedeiros domésticos e silvestres (DE SOUSA et al., 2017; FORLANO et al., 2005; MARCELO, 2001; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001).

3.4 Ciclo

O ciclo de vida do protozoário é heteróximo e se torna completo dentro de quatro semanas no caso do *H. canis* e cinco semanas no *H. americanum* (BANETH et al., 2001; PANCIERA et al., 1999). O hospedeiro vertebrado após a ingestão de um artrópode hematófago torna-se infectado, contudo, a infecção pode ser adquirida por transmissão intrauterina ou por predação (Figura 1). Após a ingestão de um invertebrado infectado, os esporozoítos liberados de esporocistos dentro de oocistos entram na circulação e migram para vários órgãos onde sofrem merogonia, no caso do *H. canis*, enquanto no *H. americanum* esses esporozoítos migram para a musculatura esquelética ou cardíaca. Quando os merozoítos são liberados de merontes

maduros na corrente sanguínea, estes entram nas células sanguíneas e se transformam em gamontes que nesse estágio, serão ingeridos por um vetor hematófago (HODŽIĆ et al., 2017; MAIA et al., 2014b; MODRÝ et al., 2017; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001; SMITH, 1996). A produção de macromerozoítos dão origem a novas formas esquizogônicas, e micromerozoítos originam os gametócitos circulantes. O desenvolvimento seguinte ocorre na parede intestinal do hospedeiro definitivo, onde os gamontes presentes nas células sanguíneas realizam gametogênese formando os micro e macrogametas que ao se fundir na hemocele do artrópode hematófago se torna oocisto, este após maturação apresenta esporocistos contendo esporozoítos fase que, após ingestão do artrópode esporulado pelo hospedeiro intermediário, o ciclo recomeça (BANETH; SHKAP, 2003; SMITH, 1996).

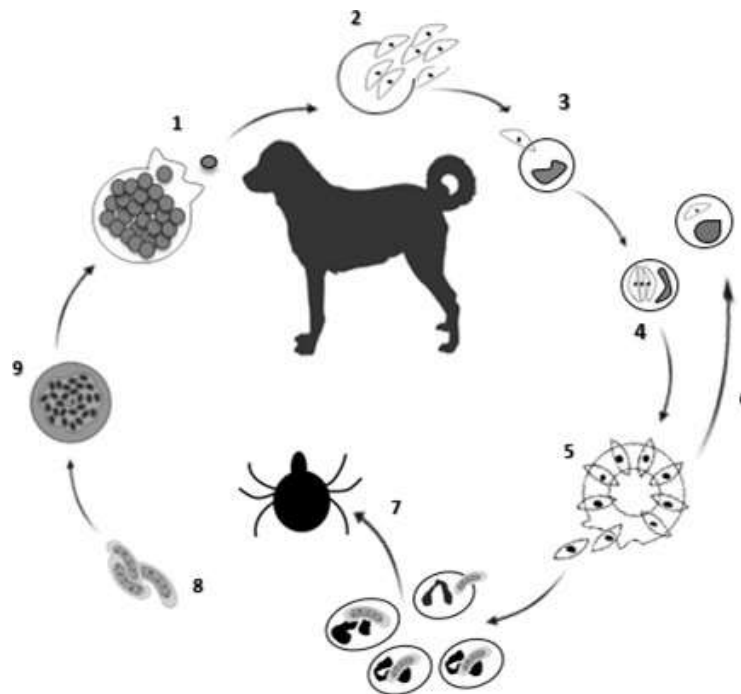


Figura 1 – Ciclo biológico da espécie de *Hepatozoon canis* em canídeos domésticos. (1) Cão ingere um carrapato infectado; (2) após ingestão esporozoítos são liberados no trato gastrointestinal e penetram na parede intestinal; (3) infectam monócitos e macrófagos, que transferem os esporozoítos para outros órgãos; (4) merontes, são desenvolvidos nos tecidos do cão, o parasita se multiplica por merogonia; (5) merozoítos maduros são liberados e infectam neutrófilos e monócitos; (6) antes da infecção dos glóbulos brancos, os parasitas podem repetir o ciclo de reprodução assexuada, desenvolvendo novos merontes; (7) o carrapato é infectado ao sugar sangue de um cão infectado; (8) os glóbulos brancos em desintegração liberam gamontes no intestino do carrapato, onde os gametas masculinos e femininos são desenvolvidos; e (9) são formados oocistos na cavidade do corpo do carrapato, com centenas de esporocistos confinados por membrana, contendo esporozoítos, que são infecciosos para o cão (Adaptado segundo - (SAARI; NÄAREAHO; NIKANDE, 2019).

3.5 Patogenia

A infecção por *H. canis* apresenta normalmente sinais clínicos leves, relacionada a baixa parasitemia pelo agente. A doença pode afetar baço, linfonodos e medula óssea, resultando em anemia e letargia. Os sinais clínicos ocasionados pelo agente indicam que a patogênese da doença pode ser considerada branda. Estudos indicam que cães assintomáticos apresentam baixa parasitemia enquanto cães com elevada parasitemia podem apresentar doença grave, além de letargia, anemia e caquexia. É provável que cães, que apresentem menor carga parasitária exibam a capacidade de infectar o vetor, pois estes artrópodes exibem a capacidade de concentração de sangue acima do seu peso corporal (BANETH et al., 2001; BANETH; SHKAP, 2003; IVANOV; TSACHEV, 2008).

A infecção por *H. americanum* varia de assintomática a grave e pode ser fatal em casos de letargia extrema, caquexia e anemia. O agente apresenta como característica a presença de piogranuloma, onde estão presentes os merozoítos que serão liberados na circulação e podem causar reinfecção. Além disso apresentam a possibilidade de infecção através da predação e ingestão do parasita com cistozoides, o que difere da espécie *H. canis* que realiza infecção através da ingestão do artrópode esporulado (ASSARASAKORN et al., 2006; BANETH; SHKAP, 2003).

Um fator limitante da patogênese da hepatozoonose é a influência por infecções concorrentes e imunossupressão. Co-infecções com outras hemoparasitoses como *Babesia* spp. ou *Ehrlichia* spp. predispõem o aparecimento de muitas manifestações clínicas, entretanto, estudos sugerem que o agente *H. canis* atua como um agente oportunista e sua presença não altera o sistema imune (AGUIAR et al., 2004; CHHABRA; UPPAL; SINGLA, 2013; MAIA et al., 2014b; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001; PALUDO et al., 2005; RUBINI et al., 2006).

O processo de merogonia do *H. americanum* ocorre primariamente entre fibras musculares, enquanto *H. canis* se reproduz nos tecidos hemolinfáticos, órgãos viscerais. Enquanto os merontes de *H. americanum* são encontrados dentro de cistos conhecidos como “pele de cebola” (onion skin cyst), formados por camadas de mucopolissacarídeos elaboradas pela célula hospedeira. Estudos indicam que o agente induz a célula hospedeira a produzir cisto com objetivo de proteger o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Essa característica não está associada a espécie de *H. canis* (MATHEW et al., 2000; OTRANTO et al., 2011; ÚNGARI et al., 2018).

Durante exame histopatológico do músculo esquelético de cães domésticos infectados com *H. canis* foram observadas degeneração e atrofia muscular, alterações semelhantes à

encontrada por *H. americanum*; no entanto, a presença dos cistos característicos do *H. americanum* não foi observada, demonstrando a grande variabilidade das manifestações clínicas da hepatozoonose por *H. canis* (PALUDO et al., 2005).

3.6 Sinais clínicos

As manifestações clínicas da hepatozoonose são indefinidas, variam de assintomático a severas. A doença geralmente é associada a outros agentes infecciosos ou enfermidades imunossupressoras dificultando a identificação dos sinais clínicos do agente. Cães com hepatozoonose são frequentemente assintomáticos com baixos níveis de parasitemia, enquanto cães com altos níveis de parasitemia podem apresentar doença grave, febre, letargia, anemia e caquexia (AGUIAR et al., 2004; ASSARASAKORN et al., 2006; BANETH; SHKAP, 2003; LEVI et al., 2018; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001; RUBINI et al., 2006).

Hepatozoon canis geralmente causa infecção subclínica, porém em alguns casos, pode apresentar febre, letargia, perda de peso e linfadenomegalia. No entanto, esses sinais clínicos são indistinguíveis se esses animais apresentarem coinfeção com de outras doenças, tornando difícil a diferenciação dos sinais clínicos característicos do Hepatozoon. Além disso, a quimioterapia imunossupressora ou infecções simultâneas podem causar a reativação de *H. canis* (BANETH; SHKAP, 2003; BOUATTOUR et al., 2021; OTRANTO et al., 2011; PALUDO et al., 2003; PICCIONE et al., 2013).

As manifestações clínicas mais comuns do *H. americanum* incluem febre, dor generalizada, fraqueza, letargia, perda de peso, rigidez muscular, paresia e secreção ocular. Os sinais clínicos da doença são severos mesmo com ausência de outras doenças concomitantes e podem estar relacionados a grande quantidade de cistos formados na musculatura esquelética e lesões proliferativas ósseas. Sem tratamento específico levam a morte em meses (LI et al., 2008; PALUDO et al., 2003; RUBINI et al., 2006).

As alterações hematológicas da hepatozoonose incluem contagem elevada de leucócitos, anemia normocítica normocrômica, trombocitose ou trombocitopenia, leucocitose e neutrofilia ou linfopenia. Alguns autores sugerem a presença de eosinofilia mais comum, linfocitose, monocitose, trombocitopenia e anemia, tanto em animais infectados pelo agente como por animais coinfectados com outros patógenos. Avaliações bioquímicas indicam redução da concentração de glicose e albumina, hiperglobulinemia, além do aumento da atividade da fosfatase alcalina e concentração de fósforo nos animais infectados pelo agente (FISHER et al., 2020; OTRANTO et al., 2011; VOYVODA; PASA; UNER, 2004).

3.7 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da hepatozoonose pode ser realizado por exames diretos e indiretos. O método direto é baseado na detecção microscópica dos gametócitos em neutrófilos e monócitos no esfregaço sanguíneo, entretanto, nem sempre são detectáveis devido a parasitemia intermitente ou número de gametócitos circulantes. Enquanto, o método indireto baseia-se em gametócitos do *Hepatozoon* podem ser detectados em seções exames sorológicos na pesquisa de anticorpos histopatológicas (BANETH et al., 2013; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001; OTRANTO et al., 2011).

A técnica em cadeia da polimerase (PCR) apresenta especificidade e sensibilidade elevadas, capaz de detectar o agente em amostras de sangue dentre outros tipos de amostras. É o método mais apropriado para a confirmação do diagnóstico da doença assim como de infecções crônicas. Porém, *Hepatozoon* spp. em alguns estágios de desenvolvimento podem ser mecanicamente resistentes, dificultando a liberação de DNA e reduzindo a sensibilidade da detecção do agente. Contudo, estudos indicam que outras técnicas como a reação em cadeia polimerase nested (nPCR) ou reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) podem auxiliar em casos com baixa parasitemia aumentando a sensibilidade do diagnóstico (INOKUMA et al., 2002; LI et al., 2008; MATJILA et al., 2008; MODRÝ et al., 2017; RUBINI et al., 2006).

3.7.1 Análises Moleculares

A sequência 18S rDNA é um marcador molecular popular para a identificação de diversos agentes assim como *Hepatozoon* spp. devido à presença de regiões conservadas (DE SOUSA et al., 2017; GABRIELLI et al., 2010; GUO et al., 2020; PERLES et al., 2019). Entretanto, existem algumas limitações que devem ser esclarecidas sobre o uso exclusivo desse gene para realização de árvores filogenéticas moleculares (BARTA et al., 2012; BAZZANO et al., 2020; MODRÝ et al., 2017). A partir de sequências moleculares adquiridas é possível obter informações sobre eventos evolutivos e uma estrutura adequada para a reconstrução de sequências ancestrais através da árvore filogenética. Em várias regiões ao redor do mundo há relatos da detecção molecular de *Hepatozoon* spp, contudo, a diversidade genética desse agente necessita de mais informações (BISHARAT; KOTON; OLIVER, 2020; GABRIELLI et al., 2010; NAJM et al., 2014; VÁSQUEZ-AGUILAR et al., 2021).

Estudos realizados anteriormente, indicam que a maioria das sequências de espécies hospedeiras do agente *Hepatozoon* spp. apresentam entre 250 a 700 pares de bases de comprimento. As sequências de curto comprimento nas análises filogenéticas dificultam os

estudos sobre a confirmação de espécies entre *Hepatozoon* spp. (BARTA et al., 2012; KARADJIAN; CHAVATTE; LANDAU, 2015; MERINO et al., 2006; NAJM et al., 2014). A diversidade de espécies de *Hepatozoon* em carnívoros é complexa devido a heterogeneidade de DNA em sequências de genes conservados de *Hepatozoon* spp., além disso, a escassez de dados estabelece uma desvantagem para trabalhos futuros (STARKEY et al., 2013).

Outro método utilizado para análise de dados moleculares de *Hepatozoon* spp descritos na literatura são as redes de haplótipos que permitem analisar relações filogeográficas. Estas podem ser utilizadas na análise de populações de dados genéticos de agentes para visualização de relações genealógicas em nível intraespecífico, e observar inferências sobre biogeografia e história das populações (CASSENS; MARDULYN; MILINKOVITCH, 2005; LEIGH; BRYANT, 2015; VÁSQUEZ-AGUILAR et al., 2021).

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M. et al. Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arq. Bras. Med.Vet. Zootec**, p. 411–413, 2004.
- AGUIAR, D. M. et al. A novel Ehrlichia genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 537–544, 2014.
- AGUIRRE, A. A. Wild canids as sentinels of ecological health: A conservation medicine perspective. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, 2009.
- AKTAS, M. et al. A molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis in domestic dogs in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 3–4, p. 264–267, 30 abr. 2015.
- ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V. A. Hepatozoon canis infection of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 279–282, 1997.
- ANDRÉ, M. R. et al. Tick-borne agents in domesticated and stray cats from the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 6, p. 779–786, 2015.
- ASSARASAKORN, S. et al. A retrospective study of clinical hematology and biochemistry of canine hepatozoonosis on hospital populations in Bangkok, Thailand. **Comparative Clinical Pathology**, v. 15, n. 2, p. 107–109, jun. 2006.
- BANETH, G. et al. TRANSMISSION OF HEPATOZOON CANIS TO DOGS BY NATURALLY-FED OR PERCUTANEOUSLY-INJECTED RHIPICEPHALUS SANGUINEUS TICKS. **J. Parasitol**, v. 87, n. 3, p. 606–611, 2001.
- BANETH, G. et al. Redescription of Hepatozoon felis (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. 2013.
- BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick Rhipicephalus sanguineus and domestic dog (Canis familiaris). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 283–299, abr. 2007.
- BANETH, G.; SHKAP, V. Monozoic cysts of Hepatozoon canis. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 379–381, abr. 2003.
- BARTA, J. R. et al. Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (myzozoa, Apicomplexa, coccidia, eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18s rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171–180, mar. 2012.
- BAZZANO, V. et al. Phylogenetic analysis of Hepatozoon spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae)

- infecting *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Dipsadidae) in Uruguay. **Parasitology Research**, v. 119, n. 3, p. 1093–1100, 1 mar. 2020.
- BERNDT, T. R. et al. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmosse trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Scientific Electronic Archives**, v. 34, n. 6 SUPPL. 2, p. 3811–3822, 2019.
- BISHARAT, N.; KOTON, Y.; OLIVER, J. D. Phylogeography of the marine pathogen, *Vibrio vulnificus*, revealed the ancestral scenarios of its evolution. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 9, p. 1–8, 2020.
- BOUATTOUR, A. et al. Hepatozoon canis and Babesia vogeli infections of dogs in Tunisia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 23, 1 jan. 2021.
- CAPONI, A. G. et al. Incidência de hemoparasitoses em cães da região sul da cidade de Palmas/TO. **Pubvet**, v. 14, n. 1, p. 1–4, 2020.
- CASSENS, I.; MARDULYN, P.; MILINKOVITCH, M. C. Evaluating intraspecific “network” construction methods using simulated sequence data: Do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach? **Systematic Biology**, v. 54, n. 3, p. 363–372, 2005.
- CHHABRA, S.; UPPAL, S. K.; SINGLA, L. DAS. Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 483–486, 2013.
- CRIADO-FORNELIO, A. et al. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (apicomplexa: adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93–99, fev. 2006.
- DA SILVA, M. R. L. et al. *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 6, p. 878–881, 1 out. 2017.
- DE SOUSA, K. C. M. et al. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, v. 237, p. 37–46, 15 abr. 2017.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, A. A. et al. Molecular detection and characterization of *Hepatozoon canis* in stray dogs from Cuba. **Parasitology International**, v. 80, 1 fev. 2021.
- EVANS, P. G. H. Intraspecific nest parasitism in the European starling *Sturnus vulgaris*. **Animal Behaviour**, v. 36, n. 5, p. 1282–1294, 1988.
- FISHER, M. et al. Clinical variations observed among the main hemoparasitosis caused by *Rhipicephalus sanguineus* in dogs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 6, p. 163–172, 30 dez. 2020.

- FORLANO, M. et al. Diagnosis of Hepatozoon spp. in Amblyomma ovale and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 1–7, 2005.
- GABRIELLI, S. et al. The First Report of Hepatozoon canis Identified in Vulpes vulpes and Ticks from Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2010.
- GIANNELLI, A. et al. Rhipicephalus turanicus, a new vector of Hepatozoon canis. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 730–737, 1 maio 2017a.
- GIANNELLI, A. et al. Three different Hepatozoon species in domestic cats from southern Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 721–724, 1 ago. 2017b.
- GIANNITTI, F. et al. Infection with a Hepatozoon sp. closely related to Hepatozoon felis in a wild Pampas gray fox (Lycalopex - Pseudalopex - gymnocercus) co-infected with canine distemper virus. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 497–502, 2012.
- GOMES, L. DE A. et al. Molecular analysis reveals the diversity of Hepatozoon species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1061–1066, 2016.
- GONEN, L. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to Hepatozoon canis. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 131–139, 21 jun. 2004.
- GUADARRAMA, S. S. et al. Hypoxia by Altitude and Welfare of Captive Beaded Lizards (Heloderma Horridum) in Mexico: Hematological Approaches. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 23, n. 1, p. 74–82, 2020.
- GUO, W. P. et al. Molecular detection of Hepatozoon canis in dogs and ticks in Shaanxi province, China. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 72, 1 out. 2020.
- HODŽIĆ, A. et al. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (Vulpes vulpes) from Bosnia and Herzegovina. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 8 fev. 2015.
- HODŽIĆ, A. et al. Hepatozoon silvestris sp. Nov.: Morphological and molecular characterization of a new species of Hepatozoon (Adeleorina: Hepatozoidae) from the European wild cat (Felis silvestris silvestris). **Parasitology**, v. 144, n. 5, p. 650–661, 1 abr. 2017.
- HRAZDILOVÁ, K. et al. Quest for the type species of the genus Hepatozoon—phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. **Systematics and Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. 622–631, 2021.
- INOKUMA, H. et al. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 265–271, 2002.
- IVANOV, A.; TSACHEV, I. Hepatozoon Canis and Hepatozoonosis in the Dog Mini-review

- HEPATOZOON CANIS AND HEPATOZOONOSIS IN THE DOG. **Trakia Journal of Sciences**, v. 6, n. 2, p. 27–35, 2008.
- KARADJIAN, G.; CHAVATTE, J. M.; LANDAU, I. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. **Parasite**, v. 22, 2015.
- LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.
- LEVI, M. M. et al. Pesquisa de *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães de uma região semiárida do Brasil. **Parasites and Vectors**, v. 24, n. 1, p. 52–58, 2018.
- LI, Y. et al. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1–2, p. 50–58, 20 out. 2008.
- MAIA, C. et al. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, 24 mar. 2014a.
- MAIA, J. P. et al. Molecular assessment of hepatozoon (apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission dynamics across taxonomic groups. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 4, p. 837–848, 1 out. 2014b.
- MARCELO, L. B. M. E P. C. DE. Carrapato em cães no Brasil. **Clinica Veterinaria**, 2001.
- MATHEW, J. S. et al. PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF HEPATOZOON (APICOMPLEXA: ADELEORINA) BASED ON MOLECULAR, MORPHOLOGIC, AND LIFE-CYCLE CHARACTERS. **J. Parasitol**, v. 86, n. 2, p. 366–372, 2000.
- MATJILA, P. T. et al. Molecular detection of *Babesia rossi* and *Hepatozoon* sp. in African wild dogs (*Lycaon pictus*) in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1–2, p. 123–127, 20 out. 2008.
- MERINO, S. et al. Molecular characterization of the 18S rDNA gene of an avian *Hepatozoon* reveals that it is closely related to *Lankesterella*. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6, p. 1330–1335, dez. 2006.
- MITKOVA, B. et al. Autochthonous *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* and imported *Babesia gibsoni* infection in dogs in the Czech Republic. **Veterinarni Medicina**, v. 62, n. 3, p. 138–146, 2017.
- MODRÝ, D. et al. A Review of Methods for Detection of *Hepatozoon* Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 66–72, 1 jan. 2017.
- NAJM, N. A. et al. *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: Molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp.

- Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2979–2985, 2014.
- O'DWYER, L. H.; MASSARD, L. C.; DE SOUZA, P. C. J. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 143–150, 2001.
- ORKUN, Ö.; NALBANTOĞLU, S. Hepatozoon canis in Turkish red foxes and their ticks. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p. 35–37, 1 ago. 2018.
- OTRANTO, D. et al. Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, 2011.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 157–163, abr. 2009.
- PAIZ, L. M. et al. Hematological disorders detected in dogs infected by Hepatozoon canis in a municipality in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 68, n. 5, p. 1187–1194, 2016.
- PALUDO, G. R. et al. Hepatozoon spp.: Report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 3–4, p. 243–248, 30 dez. 2003.
- PALUDO, G. R. et al. Hepatozoon spp.: Pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**, v. 97, n. 2, p. 167–170, ago. 2005.
- PANCIERA, R. J. et al. Canine hepatozoonosis: comparison of lesions and parasites in skeletal muscle of dogs experimentally or naturally infected with Hepatozoon americanum. **Veterinary Parasitology** **82**, 1999.
- PANCIERA, R. J. et al. Comparison of Tissue Stages of Hepatozoon americanum in the Dog Using Immunohistochemical and Routine Histologic Methods. **Vet Pathol**, v. 38, p. 422–426, 2001.
- PENZHORN, B. L. et al. Occurrence of Hepatozoon canis (Adeleorina: Hepatozoidae) and Anaplasma spp. (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in black-backed jackals (Canis mesomelas) in South Africa. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2018.
- PEREZ, R. R.; RUBINI, A. S.; O'DWYER, L. H. The first report of Hepatozoon spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 94, n. 2, p. 83–85, set. 2004.
- PERLES, L. et al. Genetic diversity of Hepatozoon spp. in rodents from Brazil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- PICCIONE, G. et al. Oxidative stress associated with road transportation in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1–3, p. 235–238, 2013.

- RAZMI, G. et al. Journal of Parasitology A PARASITOLOGIC AND MOLECULAR SURVEY OF HEPATOZOON CANIS INFECTION IN STRAY DOGS IN NORTHEAST OF IRAN-Manuscript Draft-Manuscript Number: 17-105R2 Full Title: A PARASITOLOGIC AND MOLECULAR SURVEY OF HEPATOZOON CANIS INFECTION IN ST. 2018.
- RUBINI, A. S. et al. Molecular characterization of feline Hepatozoon species from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 168–171, 15 abr. 2006.
- SAARI, S.; NÄAREAHO, A.; NIKANDE, S. **Canine Parasites and Parasitic Diseases**. Andre Wolff, 2019.
- SMITH, T. G. THE GENUS HEPA TOZOON (APICOMPLEXA: ADELEINA). **J. Parasitol**, v. 82, n. 4, p. 565–585, 1996.
- SMITH, T. G.; DESSER, S. S. Phylogenetic analysis of the genus Hepatozoon Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina). **Systematic Parasitology**, v. 36, p. 213–221, 1997.
- SPOLIDORIO, M. G. et al. Hepatozoon canis infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357–361, 26 ago. 2009.
- STARKEY, L. A. et al. Genetic diversity of hepatozoon spp. in coyotes from the South-Central United States. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 375–378, 2013.
- SUSAN E.SHAW, MICHAEL J. DAY, R. J. B. AND E. B. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Parasitology**, 2001.
- TOMÉ, B. et al. Patterns of genetic diversity in Hepatozoon spp. infecting snakes from North Africa and the Mediterranean Basin. **Systematic Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 249–258, 1 mar. 2014.
- ÚNGARI, L. P. et al. Molecular characterization and identification of Hepatozoon species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 12, p. 3857–3865, 1 dez. 2018.
- VÁSQUEZ-AGUILAR et al. Phylogeography and population differentiation in Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) reveal expansion and gene flow in world populations. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2021.
- VEZZANI, D.; SCODELLARO, C. F.; EIRAS, D. F. Hematological and epidemiological characterization of Hepatozoon canis infection in dogs from Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 90–93, 1 maio 2017.
- VIANA, L. A. et al. Hepatozoon caimani (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Wild Caiman, Caiman yacare, from the Pantanal Region, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 83–88, 2010.
- VOYVODA, H.; PASA, S.; UNER, A. Clinical Hepatozoon canis infection in a dog in Turkey.

Journal of Small Animal Practice, v. 45, n. 12, p. 613–617, 2004.



CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Hepatozoon* spp. EM CANÍDEOS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NO DISTRITO FEDERAL

BRASILIA

2022

RESUMO

Hepatozoon spp. é um protozoário que infecta uma variedade de carnívoros domésticos e selvagens. Devido à dificuldade de obter maiores fragmentos do agente, informações a respeito da caracterização molecular são imprescindíveis para compreender qual espécie do gênero está presente no país. Foram testadas amostras de sangue total de cães domésticos e silvestres com suspeita de hemoparasitoses ou suspeita prévia para *Hepatozoon* spp. Inicialmente foi realizada uma triagem das amostras para o gênero *Hepatozoon* spp., onde 22 amostras foram positivas e submetidas a caracterização molecular usando ensaios convencionais de PCR com outros quatro conjuntos de oligonucleotídeos do gene 18S rDNA. Cinco amostras positivas em todos os conjuntos foram submetidas ao sequenciamento e após triagem e análise de qualidade geraram sequências do gene 18S rDNA de *Hepatozoon canis*. Posteriormente, foi obtida uma árvore filogenética, com cerca de 1.300 nucleotídeos por amplicon, por análise bayesiana utilizando fragmentos parciais do gene 18S rDNA de 58 isolados de *H. canis*. Para construção das redes de haplótipos, foram utilizadas 68 sequências oriundas tanto do banco de dados GenBank como do presente estudo. Três das sequências obtidas se caracterizam como os maiores fragmentos de isolados brasileiros já detectados em *Canis lupus familiaris*. Na árvore filogenética, as três sequências de cães domésticos (ID-3, ID-4 e ID-5) e uma sequência de raposinha-do-campo, um canídeo silvestre (ID-2) se agruparam no mesmo clado que reúne os outros isolados de *H. canis*. Esses três isolados de cão doméstico do Distrito Federal não formaram um grupo monofilético, mas se mostraram mais próximos filogeneticamente, além disso, encontram-se em uma posição mais basal em relação às outras sequências de *H. canis*. O isolado da raposinha-do-campo mostrou-se, filogeneticamente mais distante dos outros três isolados de cães domésticos identificados no presente estudo. As duas redes construídas, uma avaliando filogeograficamente os isolados e outra correlacionando os seus hospedeiros, mostraram a existência de 10 haplótipos no Brasil, dentre eles, o haplótipo H10, o segundo maior haplótipo brasileiro identificado, que apresenta nove isolados sendo três deles as sequências de cães domésticos deste estudo. A sequência do canídeo silvestre (raposinha-do-campo), agrupou-se no haplótipo H5, juntamente com mais duas sequências, tendo como hospedeiros desses isolados as espécies *Tapirus terrestris* e *Lycalopex vetulus*. A análise bayesiana revelou a existência mais provável de dois grupos genéticos no Brasil de *H. canis*, com a indicação de fluxo gênico desse agente no país.

PALAVRAS CHAVES: 1. Hepatozoon 2. Caracterização Molecular 3. Canídeos Domésticos 4. Canídeos Silvestres

ABSTRACT

Hepatozoon spp. is a protozoan that infects a variety of domestic and wild carnivores. Due to the difficulty of obtaining larger fragments of the agent, information about molecular characterization is essential to understand which species of the genus is present in the country. Whole blood samples from domestic and wild dogs with suspected hemoparasitosis or previous suspicion for *Hepatozoon* spp. Initially, samples were screened for the genus *Hepatozoon* spp., where 22 samples were positive and subjected to molecular characterization using conventional PCR assays with four other sets of oligonucleotides from the 18S rDNA gene. Five positive samples in all sets were submitted to sequencing and after trimming and quality analysis generated sequences of the 18S rDNA gene from *Hepatozoon canis*. Subsequently, a phylogenetic tree was obtained, with approximately 1,300 nucleotides per amplicon, by Bayesian analysis using partial fragments of the 18S rDNA gene from 58 *H. canis* isolates. To construct the haplotype networks, 68 sequences from both the GenBank database and the present study were used. Three of the sequences obtained are characterized as the largest fragments of Brazilian isolates ever detected in *Canis lupus familiaris*. In the phylogenetic tree, the three sequences from domestic dogs (ID-3, ID-4 and ID-5) and one sequence from a foxtail, a wild canid (ID-2) were grouped in the same clade that brings together the others. isolates of *H. canis*. These three isolates of domestic dogs from the Federal District did not form a monophyletic group, but they were phylogenetically closer, in addition, they are in a more basal position in relation to the other sequences of *H. canis*. The isolated fox-do-camp was phylogenetically more distant from the other three isolates from domestic dogs identified in the present study. The two networks built, one phylogeographically evaluating the isolates and the other correlating their hosts, showed the existence of 10 haplotypes in Brazil, among them, the H10 haplotype, the second largest identified Brazilian haplotype, which presents nine isolates, three of them being the sequences of domestic dogs in this study. The sequence of the wild canid (fox-do-field) was grouped in the H5 haplotype, together with two more sequences, having as hosts of these isolates the species *Tapirus terrestris* and *Lycalopex vetulus*. The Bayesian analysis revealed the most probable existence of two genetic groups of *H. canis* in Brazil, indicating the gene flow of this agent in the country.

KEYWORDS: 1. Hepatozoon 2. Molecular Characterization 3. Domestic Canids 4. Wild Canids

1.0 INTRODUÇÃO

Hepatozoon spp. é um hemoprotozoário que infecta carnívoros domésticos e selvagens. A infecção apresenta duas espécies descritas *H. canis* e *H. americanum* (BANETH et al., 2003; PANCIERA et al., 2001). A transmissão do *Hepatozoon* spp. difere da maioria dos patógenos que realizam o repasto sanguíneo, ela ocorre quando os hospedeiros intermediários ingerem o hospedeiro definitivo invertebrado portador dos oocistos do agente (Smith, 1996). *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma ovale* são considerados vetores biológicos do agente, dentre outras que ainda demandam investigação (BANETH; SAMISH; SHKAP, 2007; GIANNELLI et al., 2017a; RUBINI et al., 2009). Atualmente, a presença de *H. canis* em espécies de canídeos silvestres estão em evidência por se apresentar mais frequentes na literatura, devido ao hospedeiro definitivo não ser endêmico na região onde os animais habitam (HODŽIĆ et al., 2015; NAJM et al., 2014). A infecção por *Hepatozoon canis* na maioria dos cães é considerada subclínica, ou apresenta sinais clínicos leves, entretanto, pode tornar-se grave e potencialmente fatal em alguns casos. Os exames de esfregaço de sangue são um método diagnóstico fácil e prático, porém o diagnóstico molecular é o mais adequado devido a alta sensibilidade e especificidade para a detecção da doença (CRIADO-FORNELIO et al., 2006; MODRÝ et al., 2017; OTRANTO et al., 2011).

A presença do agente *H. canis* é relatada em todo o mundo, incluindo África, Américas, Ásia e Europa (ALLEN et al., 2008; FARKAS et al., 2014; GABRIELLI et al., 2010; KISTLER et al., 2014; LI et al., 2008; O'DWYER; MASSARD; DE SOUZA, 2001). No Brasil, a infecção em canídeos domésticos e silvestres foram descritas em diversos locais, como Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Distrito Federal (ANDRÉ et al., 2010; PALUDO et al., 2005; RUBINI et al., 2006; SPOLIDORIO et al., 2009; VIANA et al., 2010). Apesar da disponibilidade de informações acerca da morfologia, especificidade e ciclo de vida dos hospedeiros do *Hepatozoon* spp., a taxonomia de muitas espécies ainda permanece incerta, devido a inconsistência de dados filogenéticos. Assim, a caracterização molecular no Brasil é essencial para se avaliar a diversidade genética desse agente e apontar diferenças entre espécies e gêneros no país (MATHEW et al., 2000; O'DONOGHUE, 2017).

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram testadas 74 amostras de sangue total de animais com suspeita de hemoparasitoses ou suspeita previa para *Hepatozoon* spp. Estes animais realizaram pesquisa de hemoparasitas e posteriormente análises moleculares para obter um maior fragmento do gene 18 S rDNA. Essas amostras eram provenientes de animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília ou de laboratórios veterinários na região de Brasília e em entorno, no período de março de 2020 a fevereiro de 2022. Os animais foram escolhidos independente de raça, idade e sexo.

2.2 Análises

2.2.1. Avaliação Hematológica

As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária na Universidade de Brasília.

As amostras em tubos com EDTA foram utilizadas para pesquisa de hemoparasitas que foi realizada mediante a leitura por microscopia ótica de luz do esfregaço sanguíneo corado pelo método de Panótico (NewProv®, Brasil) (THRALL et al., 2015).

2.2.2 Ensaios Moleculares

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília.

A partir das amostras de sangue total, cerca de 200µl foram utilizados para extração de DNA, com auxílio de kits comerciais (Illustra Blood genomic Prep Mini Spin kit, GE Healthcare®, Piscataway, NJ.). Após extração de DNA o material foi mantido a -20°C até o momento da realização das PCRs. Com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos em virtude da presença de inibidores da PCR, além de confirmação de integridade do DNA, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR convencional (cPCR) objetivando a amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb do gene *gapdh* de mamíferos. Neste ensaio foram utilizados os oligonucleotídeos *GapdhF* e *GapdhR* descritos por (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003) (Tabela 1). A mistura da PCR utilizou solução tampão 10X, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,25µl de TaqDNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada primer a 10pM, 2,0µL de DNA e água *Milli-Q*® purificada para obter um volume final de 25µL para a reação. O protocolo de

amplificação consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos repetitivos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 53°C, e 1 minuto a 72°C, seguidos por uma extensão final de 72°C por 5 min.

Inicialmente foi realizada uma triagem das amostras suspeitas para o gênero *Hepatozoon* spp. utilizando os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R (Tabela 1). Todas as amostras positivas nesta triagem foram submetidas a caracterização molecular usando ensaios convencionais de PCR (cPCR) com outros quatro conjuntos de oligonucleotídeos (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 - Protocolos para análise molecular do gene 18S rDNA.

Gene	Oligonucleotídeos	Sequências dos oligonucleotídeos (‘5-3’)	Especificidade	Fragmento	Referências
18S rRNA	Ham-1 Hpf-2	GCCAGTAGTCATATGCTTGTC GACTTCTCCTTCGTCTAAG	Piroplasmídeos	~1760 pb	(CRIADO-FORNELIO et al., 2006)
18S rRNA	Hemo-1 Hemo-2	TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC	Hemogregarina	~1000 pb	(PERKINS; KELLER, 2001)
18S rRNA	Hep-1mod Hep-4	CGCGAAATTACCCAATTCTA TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT	Hepatozoon	~ 670 pb	(SPOLIDORIO et al., 2009)
18S rRNA	Hep-F Hep-R	ATACATGAGCAAAATCTCAAC CTTATTATTCCATGCTGCAG	Hepatozoon	~ 660 pb	(INOKUMA et al., 2002)
18S rRNA	Hep300 Hep900	GTTTCTGACCTATCAGCTTTTCGACG CAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC	Hepatozoon	~ 660 pb	(UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004)
GAPDH	Gapdh-F Gapdh-R	CCTTCATTGACCTCAACTACAT CCAAAGTTGTCATGGATGACC	Gapdh Mamíferos	~ 400 pb	(BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003)

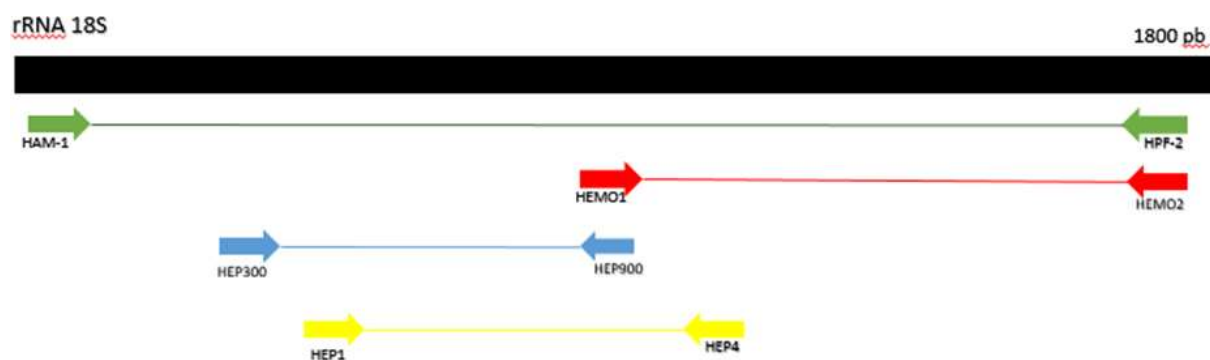


Figura 1. Representação esquemática do gene 18S completo e oligonucleotídeos. Em verde, sequência do gene quase completo (Ham-1 e Hpf-2) (CRIADO-FORNELIO et al., 2006). Em vermelho, sequência parcial do gene (Hemo-1 e Hemo-2) (PERKINS; KELLER, 2001). Em

azul, sequencia parcial (Hep300 e Hep900) (UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004) e em amarelo, sequencia parcial (Hep1 e Hep4) (SPOLIDORIO et al., 2009).

Na triagem das amostras positivas para *Hepatozoon* spp utilizou-se ensaio de cPCR com iniciadores do gênero *Hepatozoon* que amplificam a sequência parcial do gene 18S, HepF e HepR apresentados na Tabela 1 (INOKUMA et al., 2002). A mistura da PCR utilizou solução tampão 10X, 0,8mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,2μL de TaqDNA Polymerase 5U/μL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 0,5μL de cada primer a 10pM, 2,0μL de DNA e água Milli-Q® purificada para obter um volume final de 25μL para a reação. O protocolo de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, 40 ciclos repetitivos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, e 90 segundos a 72°C, seguidos por uma extensão final de 72°C por 5 min.

Para a caracterização molecular do *Hepatozoon* as amostras positivas para oligonucleotídeos de triagem (Hep-F e Hep-R) foram submetidas a outras PCR utilizando os oligonucleotídeos Ham-1 e Hpf-2 (CRIADO-FORNELIO et al., 2006), Hemo1 e Hemo2 (PERKINS; KELLER, 2001), Hep-1mod e Hep-4 (SPOLIDORIO et al., 2009) e Hep300 e Hep900 (UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004) (Tabela 1). A Figura 1 representa o gene 18SrRNA e as regiões de anelamento de cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Na mistura da PCR para os oligonucleotídeos Ham-1 e Hpf-2 utilizou um volume final de 25μL na reação com solução tampão 10X, 1,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,2μL de TaqDNA Polymerase 5U/μL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 2μL de DNA, 1,0μL de cada oligonucleotídeo (10 mM). O protocolo de amplificação consiste na desnaturação inicial a 98°C por 3 min e depois submetidas a 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 min, com um período de extensão adicional de 10 min a 72°C, com alterações nos tempos das reações (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

A mistura da PCR para os oligonucleotídeos Hemo-1 e Hemo-2 utilizou um volume final de 25μL na reação com solução tampão 10X, 1,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,25μL de TaqDNA Polymerase 5U/μL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1μL de DNA, 1,0μL de cada oligonucleotídeo (10 mM). O protocolo de amplificação consiste na desnaturação inicial a 94°C por 5 min e depois submetidas a 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 min, com um período de extensão adicional de 5 min a 72°C, com alterações nos tempos das reações (PERKINS; KELLER, 2001).

Para os oligonucleotídeos Hep1mod e Hep4 foram utilizados 1 µL das amostras de DNA na mistura da reação com volume final de 25 µL contendo solução tampão a 10X, 0,75 mM de MgCl₂, 0,2mM de trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTP) a 25 mmol, 0,2µL de TaqDNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada primer (10 mM). O ensaio de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos por 53°C, e 40 segundos por 72°C, com extensão final a 72°C por 5 minutos (Spolidorio et al 2009). O protocolo de amplificação dos oligonucleotídeos Hep300 e Hep900 consistiu na desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 40 ciclos repetitivos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos por 60°C, e 1 minuto por 72°C, com extensão final a 72°C por 10 minutos. A mistura da PCR utilizou solução tampão a 10X, 0,75mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,2µL de TaqDNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1µL de DNA, 1,0µL de cada primer (10 mM), e água *Milli-Q*® purificada para obter um volume final de 25µL na reação, com alteração no número de ciclos (UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004).

Os conjuntos de oligonucleotídeos testados após a triagem com os oligonucleotídeos Hep-F e Hep-R foram denominados por números de regiões para melhor entendimento nos resultados. Região 1 - oligonucleotídeos Ham-1 e Hepf-2; Região 2 – oligonucleotídeos Hemo-1 e Hemo-2; Região 3 - oligonucleotídeos Hep300 e Hep900; Região 4 – oligonucleotídeos Hep1e Hep-4 (Tabela 2).

Tabela 2 - Regiões do gene 18S para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeos	Divisão
Hep-F e Hep-R	Triagem
Ham-1 e Hepf-2	Região 1
Hemo-1 e Hemo-2	Região 2
Hep300 e Hep900	Região 3
Hep1 e Hep4	Região 4

Todas as amostras foram testadas em duplicata no aparelho termociclador (Biorad® C1000TM Thermal Cycler, Hercules, CA.). Como controle negativo foi utilizada a água ultrapura *Milli-Q*® autoclavada e como controle positivo, amostras de DNA de animais naturalmente infectados por *Hepatozoon*. Em seguida, os produtos das PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados em brometo de etídio (Vetec Sigma-Aldrich®, St

Louis, MO) e visualizados com iluminação ultravioleta por meio de transiluminador (UV transiluminator®, UVP LLC, Upland, CA).

Os produtos da PCR com tamanho dos pares de bases esperados para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados foram purificados utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®, Calsbad, CA) conforme recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram mantidas a -20°C e encaminhadas para a realização do sequenciamento genético. As amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger e realizada no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP em Jaboticabal, por método de Sanger, em sequenciador automático com 96 capilares ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA), utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada PCR realizada.

Após a trimagem, os produtos sequenciados nas quatro regiões do gene 18S rDNA, foram submetidos à análise de qualidade de sequenciamento e unidas as cinco sequências para gerar uma sequência consenso por meio do programa Geneious v. 9.0.5. As sequências foram submetidas à ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sequências parciais do gene 18S rDNA de 54 isolados de *Hepatozoon canis* foram recuperadas do banco de dados GenBank para análise filogenética. O alinhamento foi realizado usando o algoritmo MUSCLE. As sequências de nucleotídeos estão no Anexo I e posteriormente serão depositadas no banco de dados GenBank.

A árvore filogenética (cerca de 1.300 nucleotídeos) foi obtida por análise bayesiana utilizando fragmentos parciais do gene 18S rDNA de 58 isolados de *Hepatozoon canis*. A árvore é enraizada com fragmentos externos e foi construída com o software MrBayes v3.2 usando o modelo "General Time Reversible" (GTR) com distribuição gama (+G) como matriz de substituição de acordo com o programa jModelTest v2.1.10. O algoritmo Monte Carlo Markov Chain (MCMC) foi realizado com 4 cadeias ao longo de 1.000.000 gerações amostradas a cada 100. Os primeiros 25% das gerações foram descartados como "burn-in".

Para construção das redes de haplótipos foram utilizadas 68 sequências oriundas tanto do banco de dados GenBank (n=66), com no mínimo, aproximadamente, 500 nucleotídeos cada, quanto do presente estudo (n=4). Destas, 36 eram de isolados brasileiros. Foram incluídas sequências representativas de diversas regiões do mundo assim como todas as sequências brasileiras que possuíam tamanho adequado e correspondessem à mesma região nucleotídica. A rede de haplótipos foi realizada no software PopART v.1.7 pelo método "Median Joining". Duas redes foram construídas, uma com base na localização geográfica dos isolados e outra nos hospedeiros nos quais foram identificados.

O programa DnaSP v. 6 foi aplicado para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Dh), número médio de diferenças de nucleotídeos (K) e número de sítios segregantes (S) entre os isolados brasileiros.

O número mais provável de grupos brasileiros de *H. canis* com diferenciação genética foi estimado por análise bayesiana pelo programa BAPS v.6.0. Utilizou-se o algoritmo “clustering with linked loci” e “codon” como modelo de ligação. Diversos números de grupos genéticos (K=2 a K=19) foram avaliados em três análises independentes. A escolha de K foi determinada com base no resultado com maior probabilidade. As sequências foram agrupadas de acordo com as unidades federativas brasileiras

3.0 RESULTADOS

Das 74 amostras analisadas, 22 foram positivas na PCR de triagem para *Hepatozoon* spp.

3.1. Avaliação Laboratorial

Dentre as 22 amostras positivas nas PCRs, foram observados gametócitos de *Hepatozoon* spp. em oito esfregaços sanguíneos, sendo sete amostras de cães domésticos e uma raposinha-do-campo (Figura 2 e Tabela 3).

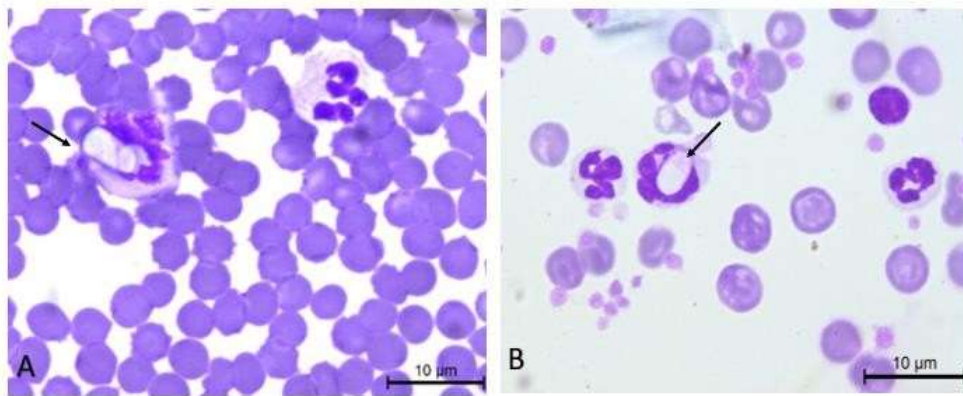


Figura 2 – A) Gametócito de *Hepatozoon* em monócito de canídeo doméstico. B) Gametócito de *Hepatozoon* em monócito de canídeo silvestre.

3.2. Amplificações por PCR

Todas as amostras positivas em todos os quatro conjuntos de oligonucleotídeos foram submetidas a caracterização molecular. Os resultados destas amplificações estão apresentados na Tabela 3.

Contudo, dentre as 22 amostras testadas, sete produtos de PCR foram positivos em todas as regiões do gene 18S rDNA (Tabela 3), e cinco amostras foram selecionadas (2, 3, 4, 5, e 7) por se apresentarem melhor material de amplificação e foram submetidas ao sequenciamento de DNA.

Tabela 3 - Resultado das PCR realizadas para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados que amplificaram regiões do gene 18S rDNA em canídeos silvestres e domésticos no Distrito Federal e entorno.

Amostra	Espécie	GAPDH	HEP F/ HEP R Triagem	HAM1 / HEP 2 (Região 1)	HEMO 1/ HEMO 2 (Região 2)	HEP 300/ HEP 900 (Região 3)	HEP 1/ HEP 4 (Região 4)
1	<i>Lycalopex vetulus</i>	+	+	-	+	+	+
2	<i>Lycalopex vetulus</i> *§	+	+	+	+	+	+
3	<i>Canis lupus familiaris</i> *§	+	+	+	+	+	+
4	<i>Canis lupus familiaris</i> *§	+	+	+	+	+	+
5	<i>Canis lupus familiaris</i> *§	+	+	+	+	+	+
6	<i>Canis lupus familiaris</i> *	+	+	+	+	+	+
7	<i>Canis lupus familiaris</i> *§	+	+	+	+	+	+
8	<i>Canis lupus familiaris</i> * ²	+	+	+	+	+	+
9	<i>Canis lupus familiaris</i> * ²	+	+	+	-	+	+
10	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	+	-	+	+
11	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	+	-	+
12	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	+	+
13	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	-	-
14	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	-	-
15	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	-	+
16	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	-	-
17	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	-	-
18	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	+	-	-	-
19	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	+	-	+	-
20	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	+	+
21	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	-	-	+	+
22	<i>Canis lupus familiaris</i>	+	+	+	-	+	+
Total de positivos		22	22	12	9	15	16

Legenda: * Presença de gametócito de *Hepatozoon* spp. em esfregaço sanguíneo; § Amostras submetidas à sequenciamento. *Lycalopex vetulus* (Raposinha-do-campo) e *Canis lupus familiaris* (Cão doméstico).

3.3 Análise de sequências por BLASTn

Os fragmentos do gene 18S rDNA amplificados com os diferentes conjuntos de oligonucleotídeos resultaram em cinco sequências de maior fragmento do gene 18S (quatro sequências de cães domésticos e de uma sequência de canídeo silvestre), que estão apresentados na Tabela 4. As sequências geradas neste estudo apresentaram alta identidade (99,2-99,7%) com isolados de *H. canis* de diversas localidades quando analisados por BLASTn (Tabela 4). A ID-3 (Identificação amostra 3 - cão doméstico) apresentou 99,63% de identidade com um isolado detectado em *Vulpes vulpes* com origem na República Checa. O isolado ID-7

(Identificação amostra 7 – cão doméstico) apresentou 99,77% de identidade identificado em cão doméstico com origem na Zâmbia, a sequência ID-2 (Identificação amostra 2 - cão silvestre) exibiu identidade de 99,21% com detecção em cão doméstico com origem em Israel e dois isolados, ID-5 (Identificação amostra 5 - cão doméstico) e ID-4 (Identificação amostra 4 - cão doméstico) respectivamente, apresentaram 99,73 e 99,68% de identidade detectado em chacal-asiático com origem na Romênia (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de identidade apresentados da análise de BLATn dos isolados testados.

Sequências	Tamanho da sequência (bp)	Identidade (%)	Cobertura (%)	E-value	Sequências com maior identidade	Países
ID-2	1388	99.21%	100%	0.0	<i>Hepatozoon canis</i> MK091088.1	Israel
ID-3	1356	99.63%	100%	0.0	<i>Hepatozoon canis</i> KU893125.1	República Checa
ID-4	1558	99.68%	100%	0.0	<i>Hepatozoon canis</i> KX712127.1	Romênia
ID-5	1490	99.73%	100%	0.0	<i>Hepatozoon canis</i> KX712127.1	Romênia
ID-7	1313	99.77%	100%	0.0	<i>Hepatozoon canis</i> LC331054.1	Zâmbia

A sequência ID-7 (Identificação amostra 7 - cão doméstico) (Tabela 4) foi retirada das análises filogenéticas, pois, na análise do cromatograma, observaram-se com boa cobertura, picos duplos em três sítios: na posição 335 (Adenina/Guanina), 362 (G/A), 376 (G/A), dando indícios de uma possível coinfeção por diferentes isolados. A técnica de clonagem molecular poderia ser utilizada para caracterizar adequadamente essas sequências.

Os isolados submetidos à sequenciamento apresentaram uma alta identidade entre os próprios isolados analisados, apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Matriz de identidade dos isolados ID-3, ID-4, ID-5 (identificação de cães domésticos) e ID-2 (identificação de cão silvestre) do Distrito Federal.

	ID-2	ID-3	ID-4	ID-5
ID-2	100%			
ID-3	99,06	100%		
ID-4	99,04	99,93	100%	
ID-5	99,06	99,93	100%	100%

3.4. Análises Filogenéticas

O filograma foi realizado utilizando fragmentos extensos com no mínimo 1300 nt do gene 18S rDNA de isolados de *H. canis*. A utilização de quatro pares de oligonucleotídeos permitiu a construção de uma sequência consenso mais extensa e com maior cobertura favorecendo uma melhor caracterização molecular. Três das sequências obtidas se caracterizam como os maiores fragmentos de isolados brasileiros já detectados em *Canis lupus familiaris*. Na árvore filogenética, as três sequências obtidas de cães domésticos (ID-3, ID-4 e ID-5) e a de canídeo silvestre (ID-2) se agruparam com bom suporte no mesmo clado que reúne os outros isolados de *H. canis* (Figura 3). Contudo, comparando essas quatro sequências entre si, encontram-se em clados menores distintos. Os isolados ID-3, ID-4 e ID-5 não formaram um grupo monofilético, mas se mostraram mais próximos filogeneticamente formando politomias. Além disso, encontram-se em uma posição mais basal em relação às outras sequências de *H. canis*. O isolado ID-2 mostrou-se, portanto, filogeneticamente mais distante dos outros três isolados identificados no presente estudo, agrupando-se com bom suporte com sequências oriundas de diversos países distribuídos pelo Oriente Médio, pela América do Sul, pela Europa e pela Ásia. Porém, foi o único isolado brasileiro incluído nesse clado. Os hospedeiros dos isolados desse mesmo grupo incluem canídeos domésticos e silvestres. Os outros isolados brasileiros obtidos do GenBank não formaram um agrupamento monofilético.

Duas redes foram construídas, uma avaliando filogeograficamente os isolados e outra correlacionando os seus hospedeiros. As redes mostraram a existência de 10 haplótipos no Brasil, dentre eles, o haplótipo H10, o segundo maior haplótipo brasileiro identificado, com 9 isolados sendo 3 deles as sequências de cães domésticos deste estudo (ID-3, ID-4 e ID-5). O mesmo grupo é constituído por sequências obtidas de *Canis lupus familiaris* e *Rhipicephalus sanguineus*, com alguns isolados de origem indiana. O haplótipo H12 foi identificado como o

maior haplótipo dentre os que possuíam sequências brasileiras, possuindo ampla distribuição geográfica e diversidade de espécies de hospedeiros. A sequência ID-2, identificada em canídeo silvestre, agrupou-se no haplótipo H5, juntamente com mais duas sequências, tendo como hospedeiros desses isolados as espécies *Tapirus terrestres* e *Lycalopex vetulus* (Figura 4 e 5). Os resultados dos índices de diversidade obtidos para os isolados brasileiros foram: diversidade de nucleotídeos ($\pi=0,00684$), número de haplótipos ($h=10$), diversidade haplotípica ($Hd=0,651$), número médio de diferenças de nucleotídeos ($K=2,62063$) e número de sítios segregantes ($S=14$).

A análise bayesiana com base estatística demonstrou como mais provável a existência de quatro grupos com diferenciação genética no Brasil ($K=2$), tendo o log de probabilidade marginal igual a -309.6008 e probabilidade posterior de 1,0. Cada cor representa um grupo genético. No grupo genético 1 encontram-se os isolados do Distrito Federal, em Minas Gerais e Rio grande do Norte. No grupo genético 2 encontram-se os estados da Bahia, de Goiás, do Mato Grosso do Sul, do Pará, de Pernambuco, do Rio de Janeiro, do Rio grande do Sul, de Santa Catarina e de São Paulo, este apresenta o com maior número de sequências ($n=25$), seguido pelo grupo ($n=10$) com isolados do Distrito Federal, em Minas Gerais e Rio grande do Norte.

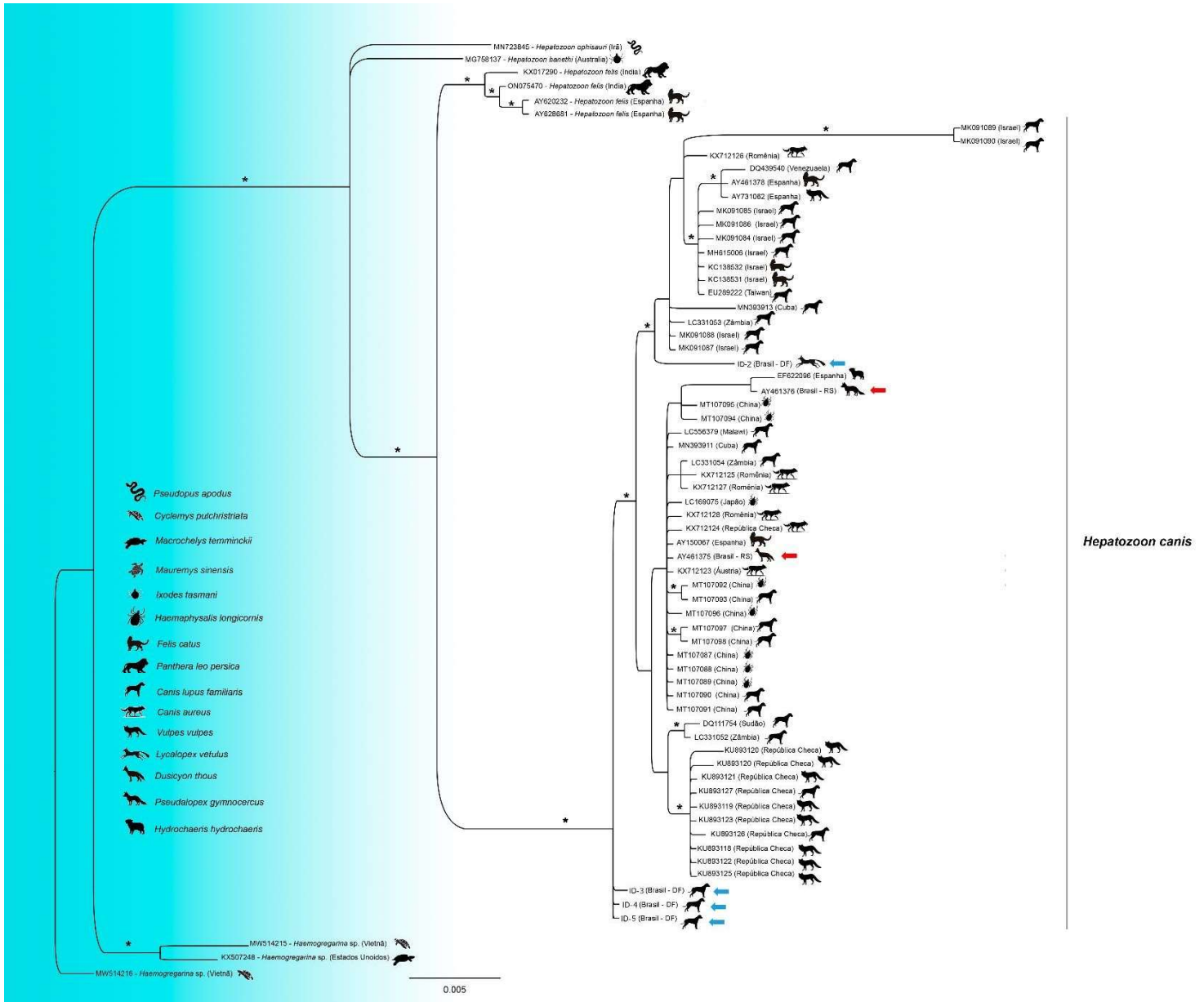


Figura 3 - Árvore Filogenética de gene 18S rDNA de quatro sequências obtidas no estudo – Árvore obtida por análise bayesiana de fragmentos parciais de 18S rDNA (1.335 nt) de 58 isolados de *Hepatozoon canis*. Probabilidades posteriores iguais a 0,90 ou mais são representadas por asteriscos. As sequências obtidas no presente estudo se encontram destacadas com setas azuis. As outras sequências brasileiras obtidas do GenBank estão sinalizadas com setas vermelhas.

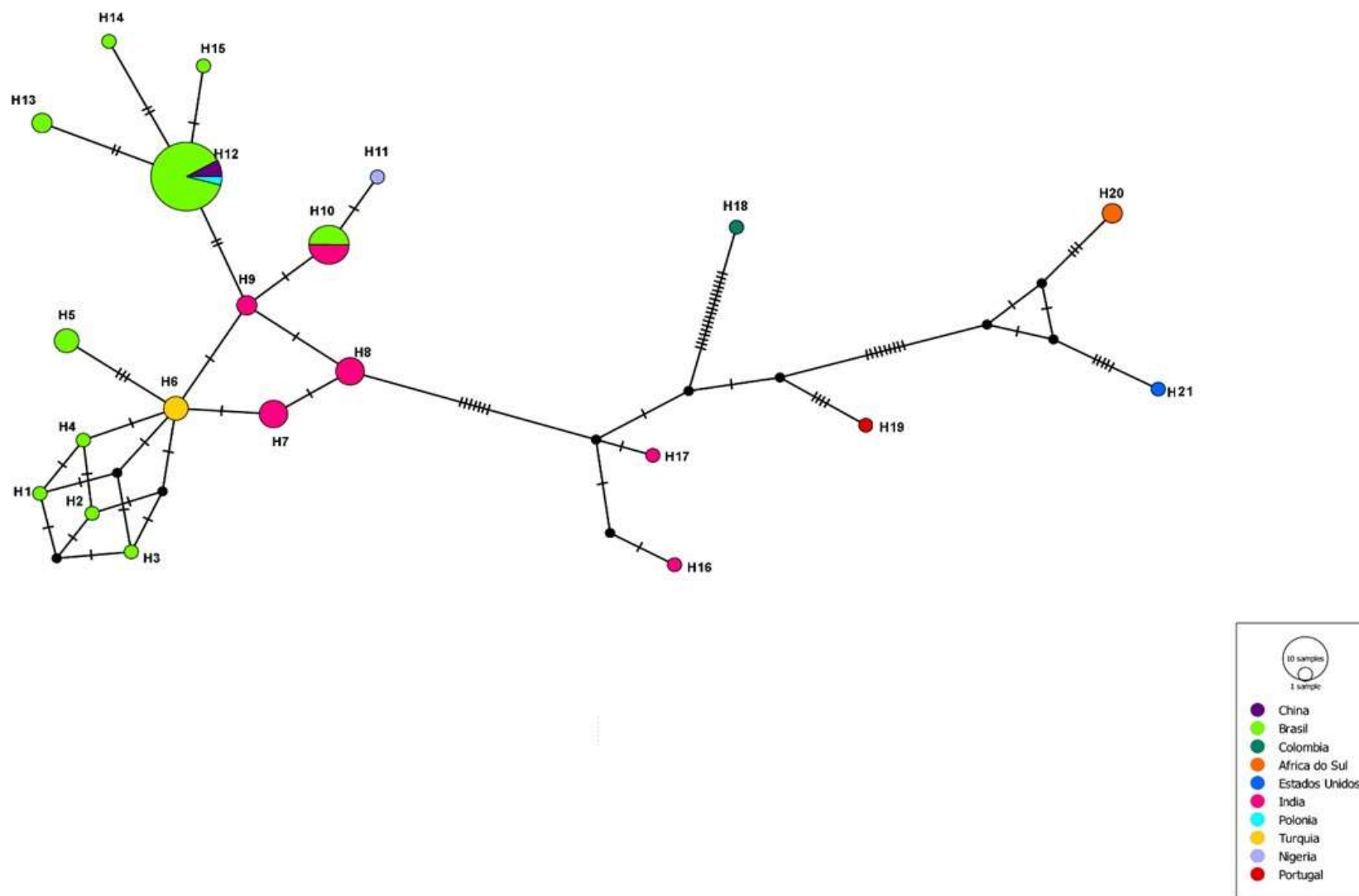


Figura 4 – Rede de haplótipos de isolados de *H. canis* no Brasil e de outros países.

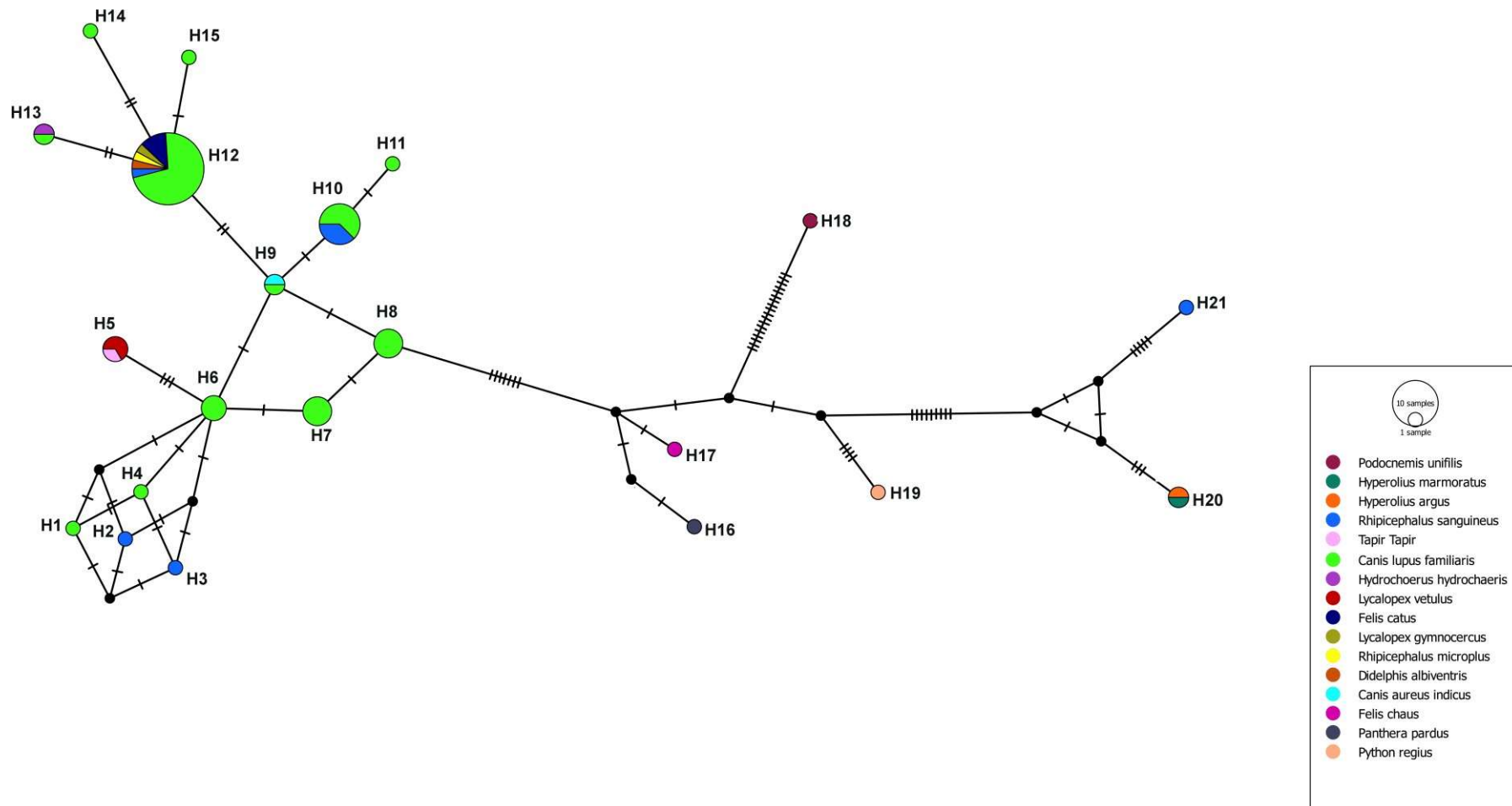


Figura 5 – Rede de haplótipos representando hospedeiros de isolados de *H. canis*.

Tabela 6 - Identificação de haplótipos e números de acesso das sequências correspondentes com destaque nos estados e hospedeiros dos isolados brasileiros e de outros países.

Nº haplótipos	Número de acesso no banco de dados
H1	KF972442 (BR-RN) ¹
H2	KF972444 (BR-RN) ¹
H3	KF972443 (BR-RN) ¹
H4	KF972441 (BR-RN) ¹
H5	MT458172 (BR-MG) ² ; MT458173 (BR-MG) ³ ; ID-2 (BR-DF) ³
H6	OL467380; OL467538; MZ930460
H7	OK631936; OK631774; OK631940; OK631937
H8	OK631939; OK631935; OK631938; OK631776
H9	OK631775; MZ823614
H10	OL694091; ON155604; OK181857; OK181882; OK181864; ID-3 (BR-DF) ¹ ; ID-4 (BR-DF) ¹ ; KF692039 (BR) ¹ ; ID-5 (BR-DF) ¹
H11	KU729738
H12	GQ176285 (BR-RJ) ¹ ; KF692038 (BR) ¹ ; KU232309 (BR-GO) ¹ ; DQ315565 (BR-SP) ⁴ ; DQ315566 (BR-SP) ⁴ ; KF692040(BR) ¹ ; KX816958 (BR-SC) ⁵ ; KU232310 (BR-MS) ¹ ; MN103412 (BR-MS) ¹ ; KU729737 (BR-PA) ¹ ; MH891623 (BR-BA) ¹ ; KY026192 (BR-SP) ¹ ; KY026191 (BR-SP) ¹ ; FJ743476 (BR-SP) ¹ ; EU571737 (BR-RS) ¹ ; DQ198378 (BR-SP) ¹ ; DQ198379 (BR-SP) ¹ ; HQ605710 (BR) ⁶ ; KY392884 (BR-SP) ⁷ ; MT081050 (BR-RO) ¹ ; MT081051 (BR-RO) ¹ ; OL423594; OM714910; MZ675626
H13	KY965141 (BR-PA) ⁸ ; KU729738 (BR-PA) ¹
H14	JX118828 (BR-MS) ¹ ;
H15	FJ943578 (BR-PE) ¹ ;
H16	OL852083
H17	ON054034
H18	MW246122
H19	MZ475989
H20	MG041598; MG041599
H21	AF176837

Legenda: ¹ *Canis familiaris*, ² *Tapirus terrestris*, ³ *Lycalopex vetulus*, ⁴ *Felis catus*, ⁵ *Lycalopex gymnocercus*, ⁶ *Rhipicephalus microplus*, ⁷ *Didelphis albiventris*, ⁸ *Hydrochoerus hydrochaeris*

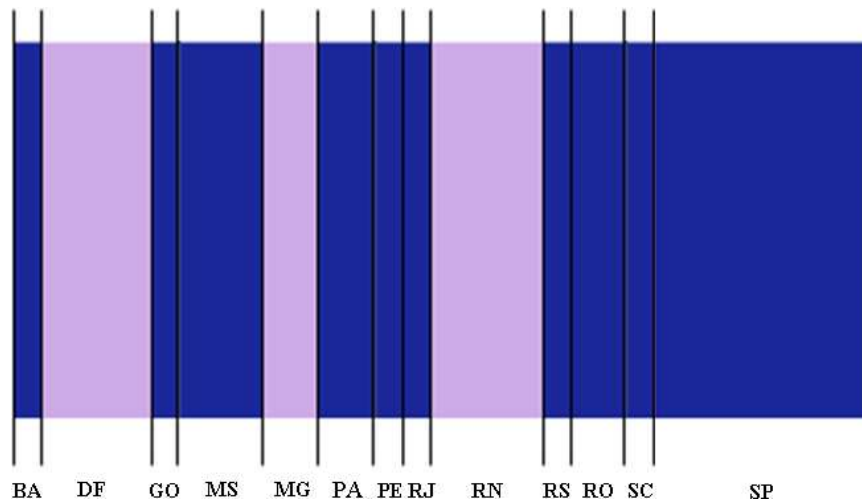


Figura 6 – Análise bayesiana de estrutura populacional de *Hepatozoon canis* no Brasil. A análise indica dois grupos genéticos distribuídos pelos estados. Em lilás, está o grupo genético presente no Distrito Federal, em Minas Gerais e no Rio grande do Norte. E em azul escuro, corresponde ao grupo genético dos estados da Bahia, do Goiás, do Mato Grosso do Sul, do Pará, de Pernambuco, do Rio de Janeiro, do Rio grande do Sul, de Santa Catarina e de São Paulo.

4.0 DISCUSSÃO

Os ensaios de PCR, com a utilização dos oligonucleotídeos de regiões distintas do gene 18S rDNA (Figura 1 e Tabela 2), amplificaram as sequências de DNA para *H. canis*. A detecção de agente pela técnica cPCR em sangue total de hospedeiros vertebrados é considerada confiável pela literatura (INOKUMA et al., 2002). Cabe salientar que apenas sete amostras amplificaram com todos os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados e isto pode ser explicado pela baixa parasitemia, mas provavelmente pela variabilidade do gene na região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados. Quinze sequências não tiveram amplificação para algum dos quatro conjuntos de oligonucleotídeos, provavelmente devido à variabilidade do gene na região em que ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos (Tabela 2). Entretanto, o nível de parasitemia deve ser considerado nesses casos de ausência de amplificação (GOMES et al., 2016; KARAGENC et al., 2006). Outras técnicas são indicadas em casos de animais com baixa parasitemia, como a reação em cadeia polimerase *nested* (nPCR) e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) por apresentarem maior sensibilidade no diagnóstico (CRIADO-FORNELIO et al., 2006; LI et al., 2008; RUFINO et al., 2013; SOUZA et al., 2012).

Apesar do gene 18S rDNA ser o mais estudado para o agente, este gene apresenta algumas limitações para estudos moleculares e filogenéticos. Estas limitações são decorrentes de descrição de sequências parciais (pequenas) que comprometem a identificação das espécies de *Hepatozoon* spp. (GOMES et al., 2016; MODRÝ et al., 2017). No presente estudo, os ensaios de PCR com a utilização dos oligonucleotídeos de regiões distintas do gene 18S rDNA (Figura 1, Tabela 2 e 4) possibilitaram a geração de sequências com no mínimo 1300 nucleotídeos de DNA para *H. canis* permitindo uma caracterização molecular mais adequada.

Por meio da utilização de quatro conjunto de pares de oligonucleotídeos neste estudo, foi possível ampliar os fragmentos do gene 18S rDNA, obtendo-se uma maior sequência de *H. canis* no Brasil. Até então, os isolados depositados no banco de dados para cães domésticos no país possuíam sequências pequenas ou intermediárias, e que dificultam uma melhor caracterização molecular (ANDRÉ et al., 2010; GOMES et al., 2016; MODRÝ et al., 2017; PALUDO et al., 2005).

As sequências detectadas em canídeos domésticos e uma sequência de canídeo silvestre (Raposinha-do-campo) do Distrito Federal apresentaram valores de identidade em torno de 99,2–99,7% com outros isolados de *Hepatozoon canis*. Essa alta identidade compartilhada pelas sequências e confirmada através da análise filogenética (Figura 3) indicam que os isolados do Distrito Federal pertencem à mesma espécie.

A árvore filogenética apresenta uma topologia em que a maior parte dos ramos apresentaram um bom suporte. As sequências ID-3, ID-4 e ID-5 estão em posição mais basal na árvore filogenética (Figura 3). Isso sugere que esses isolados são mais antigos evolutivamente (WOESE, 2000). Outro ponto relevante é que houve uma diferença entre os isolados do estudo. ID-3, ID-4 e ID-5 (cães domésticos) se apresentaram mais distantes filogeneticamente na árvore em relação ao isolado ID-2 (canídeo silvestre) (Figura 3), apesar de terem valores de identidade entre eles elevados (Tabela 4). A rede de haplótipos também dá suporte a isso ao mostrar esses isolados em dois haplótipos distintos: ID-3, ID-4 e ID-5 (H10), e ID-2 (H5). Essa distância observada pode sugerir, embora sejam da mesma região, que animais das espécies *Canis lupus familiaris* e *Lycalopex vetulus* no Distrito Federal podem não compartilhar o mesmo ciclo epidemiológico de transmissão de *H. canis*. Contudo, uma amostragem adequada é necessária para melhor esclarecimento das relações entre essas duas espécies. Além disso, foram observadas várias politomias na árvore apresentada (Figura 3), em que os isolados são filogeneticamente muito próximos. Para esclarecer a proximidade entre eles, sugere-se utilizar novos marcadores, como os mitocondriais *cox1* e *cytb* para o agente, assim como caracterizar molecularmente maiores fragmentos do gene 18S rDNA, a fim de reduzir o número de politomias (CRIADO-FORNELIO et al., 2006; HRAZDILOVÁ et al., 2021; KOLANGATH et al., 2022). Atualmente somente duas outras sequências brasileiras possuem um fragmento do gene 18S rDNA extenso, todas provenientes do Rio Grande do Sul (Figura 3). Uma melhor elucidção filogenética poderia ser feita caso mais isolados fossem adicionados na análise filogenética (CRIADO-FORNELIO et al., 2006).

Os quatro isolados brasileiros do Distrito Federal e as duas sequências de canídeos silvestres do Rio grande do Sul presentes na árvore filogenética não se agruparam em um clado monofilético entre si (Figura 3). Isso poderia levantar a hipótese, a princípio, de não ocorrência de estruturação genética entre essas populações devido a um alto fluxo gênico desse agente com populações de outros países, conforme já demonstrado para grupos de populações da África, América, Europa e Ásia (VÁSQUEZ-AGUILAR et al., 2021). Contudo, somente cinco sequências brasileiras do Distrito Federal puderam ser utilizadas. Embora a árvore filogenética tivesse uma quantidade reduzida de sequências brasileiras, a rede de haplótipo por utilizar fragmentos menores, ampliou esse número.

O estudo descrito mostrou que *Hepatozoon canis* apresenta um alto grau de diversidade haplotípica no Brasil ($H_d=0,702$), o que condiz com trabalhos realizados em raposas e em cães para diversos locais no mundo (CRIADO-FORNELIO et al., 2006; HELM et al., 2020; KOLANGATH et al., 2022; NAJM et al., 2014). Esse grau elevado de diversidade, a partir de

36 sequências brasileiras, resultaram em 10 haplótipos no país (Figura 4 e 5), informação que difere com a pesquisa anterior que identificou 12 haplótipos brasileiros (VÁSQUEZ-AGUILAR et al., 2021). Com uma alta diversidade haplotípica de *H. canis* no Brasil associado com uma baixa diversidade de nucleotídeos, percebe-se que os haplótipos diferem-se por poucos pares de bases e, conseqüentemente, estão próximos geneticamente. Com isso, existem indícios que haja expansão recente das populações de *H. canis* no Brasil, embora estudos populacionais futuros sejam necessários assim como outras análises, incluindo testes de neutralidade, para se verificar esse fenômeno.

Hepatozon canis apresenta relatos por todo o mundo. Neste trabalho foi possível observar que existem isolados da China, Polônia e Índia que compartilham o mesmo haplótipo com os isolados brasileiros, portanto, de alguma forma podem ocorrer um fluxo genético entre as populações destes países, relacionado com os efeitos da migração dos humanos, o que corrobora com estudos recentes (GARCIA-R et al., 2017; GREAY et al., 2018; VÁSQUEZ-AGUILAR et al., 2021)

Na análise filogeográfica (Figura 4), existe um maior haplótipo que apresenta vários isolados brasileiros de diversas regiões do Brasil: Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), Centro-oeste (Goiás e Mato grosso do Sul), Sul (Rio grande do Sul e Santa Catarina), Norte (Rondônia) e Nordeste (Bahia) (Figura 4), e que apresenta o cão doméstico como o hospedeiro predominante entre os isolados deste estudo, seguido do *R. sanguineus* (Figura 5). Isso corrobora com descrições na literatura, em que o cão doméstico se apresenta como um dos hospedeiros intermediários da doença e que o carrapato marrom (*R. sanguineus*), predominante no país, mostra-se como a espécie que desempenha um papel importante na transmissão desse protozoário, possuindo distribuição abundante entre as regiões do país. Entretanto, alguns estudos indicam que essa capacidade vetorial pode se comportar de forma distinta entre as regiões (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; OTRANTO et al., 2015).

No Brasil, estudos indicam a presença de outras espécies de carrapatos entre os possíveis vetores do *H. canis* como *A. cajennense* e *A. ovale* (FORLANO et al., 2005; MELO et al., 2016; RUBINI et al., 2009). Entretanto, não existem sequências brasileiras depositadas que tenham esses carrapatos como hospedeiros, o que impediu analisá-los filogeneticamente com os outros isolados. No presente estudo foram incluídos isolados de *R. sanguineus* e uma sequência brasileira apresentando como vetor biológico *Rhipicephalus microplus*. Este se agrupou no haplótipo H12, o que corrobora com o achado de que o carrapato coletado parasitava um cão doméstico em uma zona rural (Figura 5 e Tabela 6) (DE MIRANDA et al., 2011; PEREZ; RUBINI; O'DWYER, 2004; RUBINI et al., 2009). Porém, não é possível afirmar se a espécie

em questão é um hospedeiro acidental ou se possui importância no ciclo epidemiológico. O fato de se agrupar no maior haplótipo brasileiro descrito até então pode ocorrer por realmente ter algum papel importante no ciclo epidemiológico ou simplesmente por haver uma maior probabilidade de se infectar acidentalmente com isolados desse grupo, dada a sua distribuição e número de isolados. Além disso, no mesmo haplótipo, existem sequências de gato doméstico e de mamífero marsupial (gambá-de-orelha-branca). Como já discutido na literatura, *H. canis* apresenta uma baixa prevalência em gatos, e provavelmente essa espécie é um hospedeiro acidental (GIANNELLI et al., 2017b). Também existe a hipótese de que marsupiais podem ser reservatórios do agente assim como os canídeos silvestres e domésticos, ou hospedeiros acidentais, o que denota a necessidade de maiores estudos e análises a respeito, inclusive de prevalência (ANDRÉ et al., 2010; CRIADO-FORNELIO et al., 2006; DA SILVA et al., 2017; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015; GOMES et al., 2016; KÖSEOĞLU et al., 2021; REVATHI et al., 2022; SPOLIDORIO et al., 2009).

Outro haplótipo brasileiro com presença de isolados do estudo e hospedeiros silvestres, anta (*Tapirus terrestris*) e raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), é o H5. Estudos anteriores relataram haplótipos semelhantes entre raposas e cães domésticos, havendo alta prevalência nesses animais silvestres na Alemanha. Inicialmente acreditava-se que raposas eram apenas reservatórios do agente, porém foi possível com esses dados de filogeografia e de prevalência confirmar que os canídeos silvestres apresentam relação no ciclo biológico de *H. canis* em cães, assim como sugerir a presença de espécies distintas de vetores como hospedeiro definitivo (ANDRÉ et al., 2010; CRIADO-FORNELIO et al., 2006; NAJM et al., 2014). No presente estudo, o haplótipo H5 é um dos dois únicos haplótipos com isolados brasileiros constituído exclusivamente por sequências de animais silvestres. Isso sugere que pode haver algum ciclo silvestre do qual o cão doméstico não participa no Brasil ou que simplesmente nenhuma sequência de cão nesse grupo foi amostrada até o presente momento. Mais estudos de prevalência com caracterização molecular são necessários. Outra informação relevante é que os animais provenientes de Minas Gerais (anta e raposa-do-campo) e Distrito Federal (raposa-do-campo) possuem certa proximidade geográfica e a mesma espécie de hospedeiro envolvida. Adicionalmente, pela análise bayesiana, os isolados de *H. canis* do Distrito Federal, Minas Gerais e Rio Grande do Norte mais provavelmente pertencem ao mesmo grupo genético, indicando com um alto suporte a existência de fluxo gênico entre essas populações (Figura 6). Existem relatos a respeito de outros patógenos nessa espécie, mas ainda não foi confirmada a sua participação no ciclo biológico do *H. canis*, portanto, requer mais estudos para entender

como o protozoário se comporta neste hospedeiro em especial (FAVA et al., 2022; GREAY et al., 2018; HELM et al., 2020; KOLANGATH et al., 2022).

Outro haplótipo brasileiro chamou atenção por apresentar como hospedeiros do agente *H. canis* um canídeo doméstico e uma capivara na mesma região (Brasil-PA). É possível sugerir que os dois hospedeiros ou apresentam alguma participação no mesmo ciclo biológico para o agente, ou que a capivara seja um hospedeiro acidental. Recomendam-se mais estudos a respeito da presença desse hospedeiro no ciclo biológico do agente, além de reforçar a possibilidade de a infecção ocorrer devido a ingestão ocasional do hospedeiro invertebrado devido aos hábitos alimentares dessa espécie (CRIADO-FORNELIO et al., 2006; DE AZEVEDO GOMES et al., 2018).

Analisando os quatro grupos genéticos e a sua distribuição pelas unidades federativas no Brasil, percebe-se que os únicos estados compostos por mais de um grupo genético são o Pará e São Paulo. Além disso, para os grupos genéticos em lilás e azul escuro (Figura 6), nota-se que diversos estados distantes geograficamente, inclusive de diferentes macrorregiões, compartilham o mesmo grupo, em especial o em azul escuro. Isso indica a ocorrência de fluxo gênico desse agente no país, que deve estar relacionada à movimentação de animais silvestres como também à atividade humana de deslocamento associada com os cães como animais de estimação. Para se verificar a ocorrência de diferenciação genética, ou seja, se elas são estruturadas geneticamente, dentro dos estados e entre eles, é necessário que estudos de genética populacional sejam realizados.

5.0 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as sequências encontradas na caracterização molecular ampliaram os fragmentos do gene 18S rDNA de *H. canis* no Brasil, permitindo uma nova forma de obter maiores fragmentos do gene e esclarecer informações do agente no país.

Através da análise filogenética e filogeográfica foi observado que os isolados brasileiros não se agrupam em um clado monofilético, provavelmente devido ao alto fluxo gênico do agente no mundo. Os isolados apresentaram uma alta diversidade de haplótipos no país com proximidade genética entre as sequências analisadas. Além disso, a presença de hospedeiros próximos aos canídeos silvestres ou domésticos como os mamíferos marsupiais e ungulados que carecem de mais informações sobre a presença destes hospedeiros no ciclo biológico do *H. canis*. Sugere-se também a ocorrência de fluxo gênico desse agente no país, como já demonstrado para outras regiões no mundo.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, K. E. et al. Diversity of Hepatozoon species in naturally infected dogs in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 154, n. 3–4, p. 220–225, 2008.
- ANDRÉ, M. R. et al. Molecular detection of Hepatozoon spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–138, 2010.
- BANETH, G. et al. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate Hepatozoon spp. **Trends in Parasitology**, 2003.
- BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick Rhipicephalus sanguineus and domestic dog (Canis familiaris). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 283–299, abr. 2007.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype ... Developme
- JOHN R. COLE, JR., CATHERINE R. SULZER, A. A. R. P. Improved Microtechnique for the Leptospiral Microscopic Agglutination Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.
- CRIADO-FORNELIO, A. et al. New molecular data on mammalian Hepatozoon species (apicomplexa: adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93–99, fev. 2006.
- DA SILVA, M. R. L. et al. Didelphis albiventris naturally infected with Hepatozoon canis in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 6, p. 878–881, 1 out. 2017.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of Rhipicephalus sanguineus group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1–2, p. 9–13, 2015.
- DE AZEVEDO GOMES, L. et al. Genetic diversity of Hepatozoon spp. in Hydrochoerus hydrochaeris and Pecari tajacu from eastern Amazon. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 314–318, 2018.
- DE MIRANDA, R. L. et al. Oocysts of Hepatozoon canis in Rhipicephalus (Boophilus) microplus collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3–4, p. 392–396, 2011.
- FARKAS, R. et al. First molecular evidence of Hepatozoon canis infection in red foxes and golden jackals from Hungary. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014.
- FAVA, N. M. N. et al. Occurrence and Molecular Identification of Hemoparasites in Wild Mammals Kept in Rehabilitation Centers in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 67, n. 1, p. 476–486, 2022.

- FORLANO, M. et al. Diagnosis of Hepatozoon spp. in Amblyomma ovale and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 1–7, 2005.
- GABRIELLI, S. et al. The First Report of Hepatozoon canis Identified in Vulpes vulpes and Ticks from Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2010.
- GARCIA-R, J. C. et al. Local and global genetic diversity of protozoan parasites: Spatial distribution of Cryptosporidium and Giardia genotypes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.
- GIANNELLI, A. et al. Rhipicephalus turanicus, a new vector of Hepatozoon canis. **Parasitology**, v. 144, n. 6, p. 730–737, 1 maio 2017a.
- GIANNELLI, A. et al. Three different Hepatozoon species in domestic cats from southern Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 721–724, 1 ago. 2017b.
- GOMES, L. DE A. et al. Molecular analysis reveals the diversity of Hepatozoon species naturally infecting domestic dogs in a northern region of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1061–1066, 2016.
- GREAY, T. L. et al. An Australian dog diagnosed with an exotic tick-borne infection: should Australia still be considered free from Hepatozoon canis? **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 11, p. 805–815, 2018.
- HELM, C. S. et al. Identical 18S rRNA haplotypes of Hepatozoon canis in dogs and foxes in Brandenburg, Germany. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 6, 1 nov. 2020.
- HODŽIĆ, A. et al. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (Vulpes vulpes) from Bosnia and Herzegovina. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 8 fev. 2015.
- HRAZDILOVÁ, K. et al. Quest for the type species of the genus Hepatozoon—phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. **Systematics and Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. 622–631, 2021.
- INOKUMA, H. et al. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 265–271, 2002.
- KARAGENC, T. I. et al. A parasitological, molecular and serological survey of Hepatozoon canis infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 113–119, 2006.
- KISTLER, W. M. et al. First report of Angiostrongylus vasorum and Hepatozoon from a red fox (Vulpes vulpes) from West Virginia, USA. **Veterinary Parasitology**, v. 200, n. 1–2, p. 216–220, 2014.
- KOLANGATH, S. M. et al. Molecular investigation and clinical management of Hepatozoon Canis infection in an Indian jackal – a case report. **BMC Veterinary Research**, p. 1–8, 2022.

- KÖSEOĞLU, A. E. et al. Molecular investigation of bacterial and protozoal pathogens in ticks collected from different hosts in Turkey. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2021.
- LI, Y. et al. Diagnosis of canine Hepatozoon spp. infection by quantitative PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1–2, p. 50–58, 20 out. 2008.
- MATHEW, J. S. et al. PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF HEPATOZOON (APICOMPLEXA: ADELEORINA) BASED ON MOLECULAR, MORPHOLOGIC, AND LIFE-CYCLE CHARACTERS. **J. Parasitol**, v. 86, n. 2, p. 366–372, 2000.
- MELO, A. L. T. et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, 2016.
- MODRÝ, D. et al. A Review of Methods for Detection of Hepatozoon Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 66–72, 1 jan. 2017.
- NAJM, N. A. et al. Hepatozoon canis in German red foxes (Vulpes vulpes) and their ticks: Molecular characterization and the phylogenetic relationship to other Hepatozoon spp. **Parasitology Research**, v. 113, n. 7, p. 2979–2985, 2014.
- O'DONOGHUE, P. Haemoprotozoa: Making biological sense of molecular phylogenies. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 3, p. 241–256, 2017.
- O'DWYER, L. H.; MASSARD, L. C.; DE SOUZA, P. C. J. Hepatozoon canis infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 143–150, 2001.
- OTRANTO, D. et al. Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, 2011.
- OTRANTO, D. et al. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. **Veterinary Parasitology**, v. 213, n. 1–2, p. 24–37, 2015.
- PALUDO, G. R. et al. Hepatozoon spp.: Pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**, v. 97, n. 2, p. 167–170, ago. 2005.
- PANCIERA, R. J. et al. Comparison of Tissue Stages of Hepatozoon americanum in the Dog Using Immunohistochemical and Routine Histologic Methods. **Vet Pathol**, v. 38, p. 422–426, 2001.
- PEREZ, R. R.; RUBINI, A. S.; O'DWYER, L. H. The first report of Hepatozoon spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 94, n. 2, p. 83–85, set. 2004.
- PERKINS, S. L.; KELLER, A. K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of

hemogregarines amplified with specific primers. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 870–876, 2001.

REVATHI, P. et al. Molecular Epidemiology , Characterisation of Hepatozoon canis in Dogs as well as in Ticks and Haemato-biochemical Profile of the Infected Dogs in Chennai Molecular Epidemiology , Characterisation of Hepatozoon canis in Dogs as well as in Ticks and Haemato. **Indian Journal of Animal Research**, n. April, 2022.

RUBINI, A. S. et al. Molecular characterization of feline Hepatozoon species from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 168–171, 15 abr. 2006.

RUBINI, A. S. et al. Acquisition and transmission of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2–4, p. 324–327, 14 out. 2009.

RUFINO, C. P. et al. Detection of Ehrlichia canis and Anaplasma platys DNA using multiplex PCR. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 12, p. 846–850, 2013.

SILVA, E. P. H. et al. Haemogregarina daviesensis sp. nov. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from South American lungfish Lepidosiren paradoxa (Sarcopterygii: Lepidosirenidae) in the eastern Amazon region. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 2773–2779, 2019.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Hepatozoon canis infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 357–361, 26 ago. 2009.

THRALL, M. A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ª Edição ed. 2015.

UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High prevalence of Hepatozoon spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (Liasis fuscus) from tropical Australia. **The Journal of parasitology**, v. 90, n. 3, p. 670–672, 2004.

VÁSQUEZ-AGUILAR et al. Phylogeography and population differentiation in Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) reveal expansion and gene flow in world populations. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2021.

VIANA, L. A. et al. Hepatozoon caimani (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Wild Caiman, Caiman yacare, from the Pantanal Region, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 83–88, 2010.

WOESE, C. R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8392–8396, 2000.