



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

***Hepatozoon caimani*: caracterização morfológica e molecular**

Priscilla Soares dos Santos

Dissertação apresentada à
Fundação Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Mestre em Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fernando Paiva

Campo Grande, MS

Março, 2014

RESOLUÇÃO Nº 15, DE 21 DE MARÇO DE 2014.

O COLEGIADO DE CURSO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições, resolve:

Aprovar a composição da “Banca Examinadora de Dissertação” de Priscilla Soares dos Santos, intitulada “Hepatozoon caimani: caracterização morfológica e molecular”, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Paiva, conforme segue:

Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes (UFMS - Presidente)

Dr. Erney Camargo Plesmann (USP)

Dr. Lucio André Viana (UFMS)

Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira (IOC/ Fiocruz)

Dra. Vanda Lúcia Ferreira (UFMS)

**Vanda Lúcia Ferreira,
Presidente.**

***Hepatozoon caimani*: caracterização morfológica e molecular**

Priscilla Soares dos Santos

Dissertação apresentada à
Fundação Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Mestre em Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fernando Paiva

Campo Grande, MS

Março, 2014

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Ao meu orientador, Prof. Fernando Paiva, pelo tempo, incentivo, disposição nas coletas dos jacarés, ajuda em laboratório e imensa paciência a mim dedicados. Sou muito grata a tudo que me ensinou, desde os primeiros passos quando iniciei os estudos na graduação até o mestrado, foram seis anos de grande aprendizado.

Minha sincera gratidão aos professores Luiz Eduardo R. Tavares e Vanda Lúcia Ferreira, por serem prestativos nos momentos em que precisei. Aos professores Carlos Eurico Fernandes, Maria Auxiliadora Abdul (Dorinha), pela ajuda em análises histológicas.

Ao pessoal do Lab. de Parasitologia Veterinária: Fernando Rodrigues e Francielle pelo auxílio em bio mol, Lucas por correções no texto, Augusto pela ajuda em estatística, Eurico Sczesny e Kelly pela ajuda em campo. Ao Lúcio Viana pela ajuda na compreensão de algumas questões apiCOMPLEXAS e outras triviais sobre o projeto.

À Larissa Olarte e Andreza Souza pela ajuda em laboratório e campo.

Ao biólogo Fábio Ricardo da Rosa pela ajuda nas análises dos dados e ilustração do ciclo de Hepatozoon caimani.

Aos amigos do PPGBA Alessandher Piva, João Pedro Athayde e Inara Keiko, pelas conversas e alegrias infinitas.

Aos meus pais, Pedro e Dalila que me deram a vida e o ensinamento de vivê-la com dignidade, que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação para que pudesse trilhar sem medo. Que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Cada um de seus atos foi uma oportunidade que eu tive para crescer e me tornar o que sou.

Muito obrigada!

*"[...] you might be a big fish in a little pond, doesn't mean you've won 'cause
along may come a bigger one [...]" – Coldplay (Lost)*

Resumo

No século passado, as primeiras descrições de *Hepatozoon caimani* em populações de jacarés no Brasil correspondiam a observações morfológicas de gametócitos em sangue periférico. No Pantanal sul-mato-grossense, alguns trabalhos foram realizados para ampliar o conhecimento do ciclo de vida de *H. caimani* em populações naturais do jacaré-do-pantanal, *Caiman yacare*. Diferenças no hábito alimentar e exposição a vetores entre jacarés jovens foram consideradas como um fator médio de risco a infecções por *H. caimani* no Brasil central. A ocorrência de anuros e peixes na dieta de jacarés em ambiente silvestre, associada à susceptibilidade dos animais simpátricos, é registrada por alguns autores como uma das vias naturais de transmissão de *H. caimani*. Atualmente existem muitas hipóteses de relações filogenéticas entre taxa do sub-filo Apicomplexa, baseadas nas análises de sequências de rDNA 18S. Entretanto, isso foi realizado somente para algumas espécies do gênero *Hepatozoon*. A ausência de estudos referentes ao sequenciamento de nucleotídeos de *H. caimani* para comparação genotípica com as demais espécies e a semelhança morfológica de outros gêneros de hemogregarinas ocasionam algumas imprecisões taxonômicas para a espécie. Embora os resultados anteriores sobre os ciclos de vida tenham contribuído para elucidar sua biologia, de modo geral, o emprego de estudos baseados em ferramentas moleculares se tornam fundamentais para aprimorar a descrição e caracterização de *H. caimani* nas populações de jacarés.

Palavras-chave: Apicomplexa, hemogregarinas, jacaré-do-pantanal

Abstract

In the last century, the first descriptions of *Hepatozoon caimani* in caiman's populations in the Brazil corresponded to morphological observations of gametocytes in peripheral blood. In the region of Pantanal in Mato Grosso do Sul State, some works have been performed to increase knowledge about the life cycle of *H. caimani* in wild population of jacaré-do-pantanal, *C. yacare*. Differences in the feeding habit and exposition to vectors between young caimans were considered as one average factor of risk to infections with *H. caimani* in the Central Brazil. The occurrence of anurans and fishes in the diet of caiman in wild environment, associated to susceptibility of sympatric animals is recorded for some authors as one natural mode of transmission of *H. caimani*. Currently there are many hypotheses of phylogenetic relationships between *taxa* of the Apicomplexa subphylum, based on analyses to sequences of 18S rDNA, however, this was only for some species of genus *Hepatozoon*. Absence of studies relating to the sequencing of nucleotides of *H. caimani* for comparison genotypic with other species associated to morphological similarity of others genus of hemogregarines causes some imprecisions taxonomic to specie. While previous results about cycles of life have contributed to explain your biology, altogether, studies based on molecular tools become essential to enhance the description and characterization of *H. caimani* in caiman population.

Keywords: Apicomplexa, hemogregarines, jacaré-do-Pantanal

INTRODUÇÃO GERAL

Os Crocodylia modernos diferem pouco entre si ou das formas do Mesozoico, a maior variação inter-específica observada diz respeito ao formato da cabeça. Atualmente, apenas 21 espécies sobrevivem, a maioria é encontrada em regiões tropicais e sub-tropicais, mas três espécies apresentam distribuição que se estende pela zona temperada. Essas espécies são divididas em três famílias, Alligatoridae (*Alligator*, *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus*), Crocodylidae (*Crocodylus*, *Osteolaerus* e *Tomistoma*) e Gavialidae (*Gavialis*) (Pough *et al.*, 2003). Entretanto, para Ross *et al.* (2007), a posição filogenética, com base em dados morfológicos é incerta, pois colocam a família Gavialidae como grupo ancestral dos crocodilianos, os resultados apresentados por filogenia molecular incluem em Crocodylidae.

Crocodylidae apresenta um número maior de espécies, possuem uma ampla distribuição na África, América Central, Ásia e Austrália. Apesar dessa abrangência, a região neotrópica apresenta uma diversidade maior de gêneros de crocodilianos, quando comparada com África, Ásia e Austrália (Molnar, 1993), sendo 10 espécies distribuídas em quatro gênero, *Caiman crocodilus* Linnaeus, 1756, *C. latirostris* Daudin, 1801, *C. yacare* Daudin, 1801, *Melanosuchus niger* Spix, 1825, *Paleosuchus palpebrosus* Cuvier, 1807, *P. trigonatus* Schneider, 1801, *Crocodylus acutus* Cuvier, 1807, *C. intermedius* Graves, 1819, *C. moreletii* Dumeril e Bibron, 1851, *C. rhombifer* Cuvier, 1807 (**Figura 1**).

No Brasil, ocorrem seis espécies pertencentes à Alligatoridae, popularmente chamadas de jacarés, *P. trigonatus*, *P. palpebrosus*, *M. niger*, *C. crocodilus*, *C. latirostris* e *C. yacare* (King e Burke, 1989; Da Silveira, 2002), das quais apenas as duas últimas não ocorrem na Amazônia. *C. latirostris* (jacaré-de-papo-amarelo), além de ser nativo de regiões de Mata Atlântica no Brasil, ocorre em outros países, como Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai, com amplitude através das bacias dos rios Paraná, Paraguai, São Francisco e Uruguai (Verdade, 1998; Verdade, 2001; Silva-Soares *et al.*, 2011).

O jacaré-do-Pantanal (*C. yacare*) está distribuído nas planícies do norte e leste da Bolívia e oeste do Brasil, no sul da Amazônia nas áreas do sistema de rios Guaporé/ Madeira e Paraguai/ Paraná, e no norte da Argentina (Crawshaw e Schaller, 1980; Llobet e Aparicio, 1999; Campos, 1993). A espécie possui um comportamento nunca descrito para os demais taxa, que é o movimento terrestre coordenado em grupos, com ocorrência principalmente na estação seca de agosto a dezembro, que estão relacionadas à proteção contra predadores e à probabilidade de captura de presas (Campos, 2003).

As características morfológicas e ecológicas são semelhantes as do jacaré da Amazônia, *C. crocodilus*, como tonalidade corpórea esverdeada com manchas cinza e amarela, podendo alcançar até 3,0 metros de comprimento (Vasconcelos e Campos, 2007). O ciclo reprodutivo da espécie está associado à dinâmica sazonal de secas e inundações do Pantanal, e a ocupação de diversas formações aquáticas (Da Silveira *et al.*, 1997). Apesar da caça ilegal em passado recente, é uma espécie amplamente distribuída na planície pantaneira; análises sugerem que esta caça predatória não teve impacto negativo nas populações (Mourão *et al.*, 1996).

A criação em cativeiro de *C. yacare* possui um grande potencial econômico (Villela, 2008), como melhor aproveitamento da pele, diminuição da pressão sobre os estoques nativos e, assim, como outros animais silvestres, um bom requisito para evitar extinção. Essa atividade é recente, com poucas informações referentes ao sistema de criação, nutrição, instalações, processamento de pele (Maciel *et al.*, 2003; Rieder *et al.*, 2004). Considerando a implantação de criadouros comerciais pelo alto valor da pele e carne dos jacarés, estudos sobre sanidade destes animais são importantes para conservação e manejo da espécie, pois é comum relatos de infecções por nematoides, trematódeos, septicemia bacteriana, coccidiose e hematozoários, como *Trypanosoma* e *Hepatozoon* (Ladds e Sims, 1990; Catto, 1991; Ladds *et al.*, 1995; Viana e Marques, 2005; Viola *et al.*, 2009).

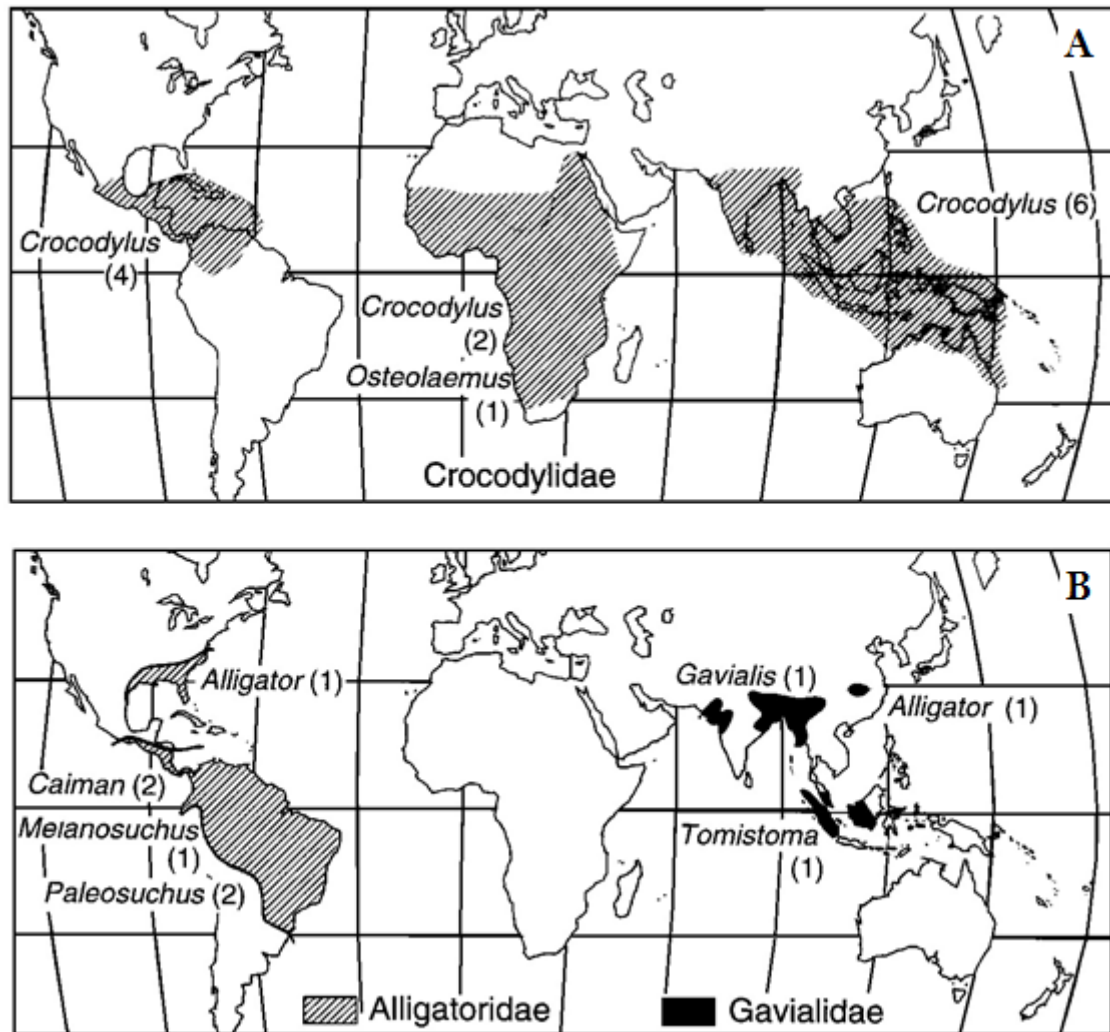


Figura 1. Distribuição das famílias de crocodilianos existentes, Crocodylidae, Alligatoridae e Gavialidae. **A:** América Central – *Crocodylus acutus*, *C. intermedius*, *C. moreletii*, *C. rhombifer*; África – *C. cataphractus*, *C. niloticus*, *Osteolaemus tetraspis*; Ásia-Austrália – *C. johnstoni*, *C. mindorensis*, *C. novaeguineae*, *Cr palustris*, *C. porosus*, *C. siamensis*. **B:** América do Norte – *Alligator mississippiensis*; América Central-Sul – *Caiman crocodilus*, *Melanosuchus niger*, *Paleosuchus palpebrosus*, *P. trigonatus*; América do Sul – *C. latirostris*, *C. yacare*; Ásia – *A. sinensis*, *Gavialis gangeticus*, *Tomistoma schlegelii*. Molnar (1993).

APICOMPLEXA: *Hepatozoon*

Protista é um termo genérico designado para descrever eucariotos com nível de organização unicelular, sem diferenciação celular entre tecidos, pertencentes ao reino Chromalveolata Adl et al., 2005, no qual estão inseridos os filos Cryptophyceae Haptophyta, Stramenopiles e Alveolata. A união desses quatro filos está baseada na ancestralidade em comum com endossimbiontes archaeplastidas, porém em Ciliophora isso ainda não está claro (Adl et al., 2005).

O sub-filo Apicomplexa (Alveolata) Levine, 1980, emend. Adl *et al.*, 2005 abrange as ordens Aconoidasida, Colpodellida e Conoidasida, representadas por parasitos obrigatórios (exceto Colpodellida) com pelo menos uma fase do ciclo de vida com vesículas subpelículas achatadas e um complexo apical que consiste em um ou mais anéis polares, roptrias, micronemas, conóide e microtúbulos; fase sexuada, quando conhecida, ocorre por singamia seguida por meiose, para produzir descendentes haploides; a reprodução assexuada de estágios haploides ocorre por fissão binária, endogenia, endopoligenia, e/ou esquizogonia (Siddall, 1995; Adl *et al.*, 2005).

Aconoidasida e Conoidasida representam as ordens de Apicomplexa de grande importância na medicina humana e animal. Aconoidasida inclui os gêneros *Mesnilium* e *Plasmodium* (Haemosporida Danilewsky, 1885), *Babesia* e *Theileria* (Piroplasmida Wenyon, 1926); entretanto, Conoidasida abrange um grupo maior de espécies incluídas em *Acuta*, *Cephalolobus*, *Gregarina*, *Levinea*, *Menospora*, *Namatocystis*, *Nematopsis*, *Steinina*, *Trichorhynchus* (Gregarinasina Dufour, 1828), *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Eimeria* e *Hepatozoon* (Coccidiasina Leuckart, 1879) (Adl *et al.*, 2005).

Inserido em Coccidiasina, a subordem Adeleorina é caracterizada por organismos com um ciclo de vida complexo, envolvendo um ou mais ciclos assexuados (merogonia), seguido por gametogonia, singamia e esporogonia (Barta, 2000). Os maiores grupos de Adeleorina incluem parasitos de invertebrados (monoxenos) e vertebrados (heteroxenos) (**Figura 2**). Dentre os parasitos que necessitam de um ciclo heteroxeno, as famílias Haemogregarinidae, Hepatozoidae e Karyolysidae são as mais destacadas, pois constitui um grupo de hemoparasitos genericamente denominados de hemogregarinas, com prevalência em peixes, répteis, aves, anfíbios e mamíferos.

A família Haemogregarinidae é a maior delas possuindo três gêneros, *Desseria*, *Cyrtia*, que são parasitos intraeritrocíticos de peixes, com transmissão realizada por sanguessugas, e *Haemogregarina*, parasitos de vertebrados aquáticos, como peixes, répteis e anfíbios. Os vetores conhecidos até o presente momento para o gênero *Haemogregarina* são sanguessugas das famílias Glossiphoniidae e Ozobranchidae (Siddall 1995) e isópodos gnátídeos (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae) em peixes marinhos (Davies *et al.*, 2004).

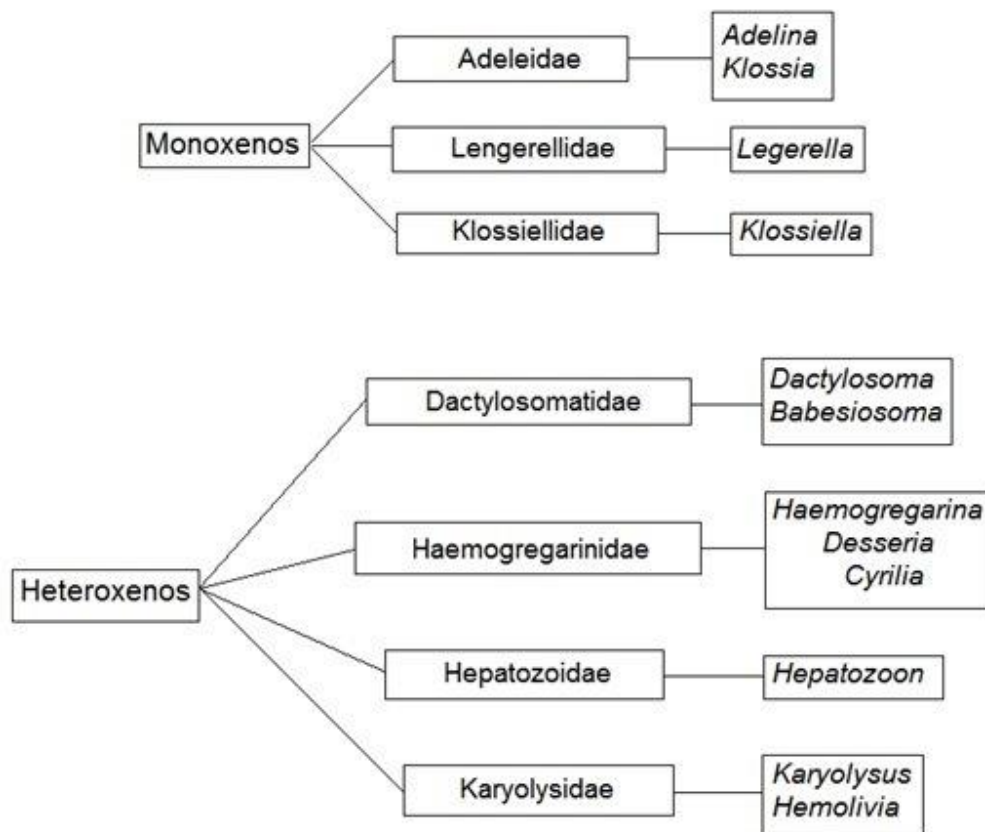


Figura 2. Classificação das famílias de Adeleorina, seguida por seus respectivos gêneros, proposta por Barta (2000).

A segunda família é Karyolysidae, que comporta dois gêneros: *Hemolivia*, que são protozoários intraeritrocíticos em anuros e quelônios, com a transmissão feita por carrapatos (*e.g. Amblyomma rotundatum*); e *Karyolysus*, que se trata de um hemoparasito exclusivamente de lagartos do Velho Mundo, descrito em apenas dois gêneros, *Lacerta* e *Podarcis*, com a transmissão realizada pela ingestão de ácaros (*e.g. Sauronyssus saurarum*). A etimologia do gênero vem da função de atividade de lise nuclear que esses parasitos exercem sobre os eritrócitos dos hospedeiros (Telford, 2008).

Hepatozoidae é a menor família das três, representada por apenas um gênero, *Hepatozoon* (Barta, 2000). O gênero foi reportado pela primeira vez em 1908 por Miller, em um trabalho sobre o ciclo de vida de *H. muris* (sin. *H. perniciosum*) em ratos, utilizando o ácaro *Laelaps echidninus* como vetor. O desenvolvimento do parasito no ácaro ocorre pela formação de um grande oocisto com muitos esporocistos contendo esporozoítos. Os ácaros infectados, quando ingeridos por ratos, liberam os esporozoítos, que invadem o sistema circulatório dos roedores e formam merontes dentro das células do fígado. Os merozoítos, após alguns ciclos dentro das células do

fígado, invadem leucócitos e/ou eritrócitos, transformando-se em gametócitos, estágio infectante para ácaros (Miller, 1908).

Após a descrição realizada por Miller, outros trabalhos foram publicados incluindo diferentes hospedeiros vertebrados, os quais incluíam aves (Hoare, 1924), lagartos (Robin, 1936), serpentes (Ball *et al.*, 1967), tartarugas (Michel, 1973), crocodilianos (Hoare, 1932) e anuros (Desser *et al.*, 1995). Durante a descrição de novos hospedeiros vertebrados (intermediários) de *Hepatozoon*, foi verificada uma variedade de hospedeiros invertebrados (definitivos), incluindo ácaros, carrapatos, triatomíneos, flebotomíneos, mosquitos culicídeos e anofelinos, moscas tsé-tsé (Telford, 1984; Viana *et al.*, 2011), piolhos (Clark *et al.*, 1973), pulgas (Göbel e Krampitz, 1982; Bennett *et al.*, 1992) e possivelmente sanguessugas (Pessoa e Cavalheiro, 1969a; 1969b).

Apesar desta diversidade em hospedeiros vertebrados e invertebrados, o ciclo de vida básico como descrito para *H. muris*, foi observado para todos os membros do gênero para os quais os dados de ciclo de vida completo são válidos. Dependendo das espécies, o desenvolvimento esporogônico para estes parasitos resultam invariavelmente na formação de grande oocisto poliesporocístico. Este pode ocorrer na parede intestinal ou na hemocèle do hospedeiro invertebrado hematófago. A transmissão dos parasitos para vertebrados ocorre exclusivamente pela ingestão de invertebrados hematófagos infectados, com merogonia subsequente, e algumas vezes cistos, o desenvolvimento ocorre em vários órgãos internos. Gametócitos podem parasitar eritrócitos ou, como é comum entre espécies de *Hepatozoon* infectantes em mamíferos, leucócitos (Smith, 1996).

Divergência sob os aspectos taxonômicos acompanharam a descrição desses seis gêneros há mais de um século, devido as grandes semelhanças observadas nos estágios eritrocíticos, impossibilitando a identificação somente com base nesse estágio. No passado, aproximadamente 400 espécies de hemogregarinas foram descritas com o critério de que “a presença em hospedeiros diferentes indica identidade específica” (Telford, 1984). Entretanto, descrições mais apuradas foram realizadas no final dos anos 60 com a utilização de estágios esporogônicos (Ball, 1967). Atualmente são aceitas descrições de espécies quando se tem a combinação do estágio esporogônico, juntamente com as informações da morfologia dos gametócitos, tornando inviável a utilização de apenas um desses estágios (Telford, 2008). Em répteis, os gêneros *Hepatozoon* e *Karyolysus* são muitas vezes indistinguíveis com base na morfologia de gametócitos, nesse caso a inferência de ferramentas moleculares são fundamentais nos trabalhos de descrições.

HEPATOZOON EM CROCODILIANOS

Os primeiros relatos de hemogregarinas em crocodilianos foram reportados por Simond (1901) na Índia, com a descrição de *Haemogregarina hankini* em *Gavialis gangeticus* e *Crocodylus porosus*; e Börner (1901) na Alemanha, que descreveu *Haemogregarina* sp. em *Crocodylus cutus* e *Alligator mississippiensis*, sendo esta última espécie introduzida no país.

Os trabalhos clássicos conhecidos foram realizados na África, por Thiroux (1910), Chatton e Roubaud (1913) e Hoare (1932) que reportaram a presença e transmissão de *H. pettiti* em *Crocodylus niloticus*. Posteriormente, em 1952, Santos Dias descreveu uma nova espécie de hemogregarina para *C. niloticus*, *H. sheppardi*. Para a América do Norte Khan *et al.* (1980) relataram a *Haemogregarina* sp. em *Alligator mississippiensis*.

Seis espécies de crocodilianos foram reportadas infectadas com *Hepatozoon*, destes, duas espécies foram registradas na América do Sul, *H. serrei* em *Paleosuchus trigonatus* e *H. caimani* em *Caiman latirostris* (Smith, 1996). Recentemente este número foi estendido pela descrição de *H. caimani* em *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare* (Lainson *et al.*, 2003). Formas similares a *H. caimani* foram observadas em *Melanosuchus niger* (Lainson *et al.*, 2003).

***Hepatozoon caimani* (CARINI, 1909)**

Em 1909 no Brasil, Carini descreveu pela primeira vez, no Estado do Rio de Janeiro, a espécie *Haemogregarina caimani* parasitando o jacaré-de-papo-amarelo, *Caiman latirostris*. Posteriormente *Haemogregarina caimani* foi modificada para *Hepatozoon caimani*. Outros registros foram realizados por Migone (1916) no Paraguai em *Caiman crocodilus*, no qual o autor se restringiu usar o nome específico do parasito, e por Di Primio (1925) na mesma espécie de jacaré, entretanto denominando a espécie do parasito como *Haemogregarina brasiliensis*.

Os registros realizados por Carini (1909), Migone (1916) e Di Primio (1925) foram obtidos apenas com documentação de formas encontradas em esfregaços delgados. Pessoa *et al.* (1972) no Estado de Goiás, Brasil, descreveram o desenvolvimento esporogônico de *H. caimani* testando hematofagismo por *Haementeria lutzi* (Hirudinea: Glossiphoniidae), *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) e *Culex dolosus* (Diptera: Culicidae) em dois

exemplares de *C. latirostris*, entretanto obtiveram sucesso no desenvolvimento apenas no mosquito *Cx. dolosus*, 24 dias pós infecção (d.p.i).

Em 1977 Lainson na região de Bragança, Estado do Pará, verificou o padrão de desenvolvimento esporogônico de *Hepatozoon* sp. em mosquitos *Cx. fatigans* (= *quinquefasciatus*), com a formação de uma grande quantidade de esporocistos em cada oocisto, assim como relatado por Pessoa *et al.* (1972).

Anos mais tarde Lainson *et al.* (2003) descreveram pela primeira vez, também no Estado do Pará, o ciclo de vida de *H. caimani* em *C. crocodilus* utilizando anuros das espécies *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) e *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae) como hospedeiros paratênicos. A esporogonia, da infecção experimental foi estudada no mosquito *Cx. fatigans*, alimentados sobre espécimes de *C. crocodilus* que apresentavam gametócitos em sangue periférico. Os esporozoítos iniciaram o desenvolvimento no espaço entre o epitélio intestinal do inseto e na membrana elástica da hemocèle, superfície do estômago. Os oocistos esporulados estavam aderidos no intestino, envolvidos pela membrana superficial.

Oocistos totalmente maduros foram observados 21 dias após o hematofagismo. Com 30 d.p.i nenhum estágio esporogônico foi encontrado em sanguessugas alimentadas sobre jacarés infectados. Os anuros *L. fuscus* e *R. catesbeiana*, alimentados com mosquitos contendo oocistos maduros, apresentaram cistos contendo cistozoítos desenvolvidos nos órgãos internos, principalmente fígado. Após se alimentarem destes anuros, os jacarés de cativeiros (negativos para hemogregarinas) apresentaram gametócitos em sangue periférico entre 59 e 79 d.p.i, e desenvolveram cistos em tecidos do fígado, baço, rins e pulmão. O estágio de merogonia foi observado somente na lamina própria do intestino delgado dos jacarés (Lainson *et al.*, 2003).

No Pantanal Sul Matogrossense, trabalhos foram realizados para ampliar o conhecimento do ciclo de vida de *H. caimani* em populações naturais de jacarés, *C. yacare*, como a descrição de prevalência; indicando uma margem superior a 70% dos animais positivos para *H. caimani*, com diferenças entre as faixas etárias, onde os adultos (100%) e sub-adultos (97%) foram positivos, enquanto 63% de jacarés juvenis foram positivos e todos os indivíduos mais jovens estavam negativos, indicando que jacarés são primeiramente infectados no primeiro período como juvenis (Viana e Marques, 2005; Viana *et al.*, 2010a).

Diferenças no hábito alimentar e exposição a vetores entre jacarés muito jovens e juvenis, sugerido por Viana *et al.* (2010b) como um fator de risco à infecção de *H. caimani* no Brasil central, designou a execução de outros estudos abordando

incriminação vetorial, utilizando mosquitos da espécie *Cx. (Melanoconion)* spp. como vetores, e estrutura trófica em infecção natural através da ingestão de anuros simpátricos *L. chaquensis*, *L. podicipinus* e *Scinax nasicus* (Anura: Hylidae), como hospedeiros paratênicos de *H. caimani* para os jacarés *C. yacare* e *C. latirostris* (Viana *et al.*, 2012).

Os anuros, *L. chaquensis*, *L. podicipinus* e *Scinax nasicus*, previamente negativos para hemogregarinas foram alimentados com oocistos esporulados de mosquitos *Cx. melanoconion* sp. mantidos em colônia em laboratório. Posteriormente foram necropsiados aos 30 d.p.i cistozoítos foram identificados em impressão fresca de fígado de *L. chaquensis*; os órgãos internos foram fornecidos a jacarés das espécies *C. yacare* e *C. latirostris* oriundos de criações comerciais e livres de infecção por hemogregarinas. Os *C. yacare* alimentados com o órgão destes anuros apresentaram gametócitos em sangue periférico entre 74 e 80 d.p.i. Gametócitos também foram observados em *C. latirostris* alimentados com órgãos de *L. podicipinus* e *S. nasicus* entre 60–70 e 69–75 d.p.i, respectivamente (Viana *et al.*, 2012) (**Figura 3**).

Após as descrições da susceptibilidade de anuros à infecção de *H. caimani* em jacarés, Pereira *et al.* (2014) realizaram um experimento testando peixes como hospedeiros paratênicos, empregaram quatro espécies de mosquitos (*Aedes fluviatilis*, *A. albopictus*, *A. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus*) alimentados sobre dois *C. yacare* naturalmente infectados, que exibiam níveis distintos de parasitemia: 11.05% e 1.25%. Nenhum dos mosquitos, *A. fluviatilis*, *A. albopictus* e *A. aegypti*, alimentados em um dos primeiros jacarés sobreviveram o período correspondente ao ciclo esporogônico. A maioria dos mosquitos engurgitados morreram em período de 48 horas após se alimentarem. Todos *A. aegypti* alimentados no segundo jacaré estavam negativos, enquanto 91.3% de *C. quinquefasciatus*, alimentados sobre o mesmo jacaré, apresentaram oocistos.

Duas espécies de peixes Characidae, *Metynnis* sp. e *Astyanax* sp., foram individualmente alimentados com *Cx. quinquefasciatus* previamente engurgitados (21-23 d.p.i) sobre o segundo jacaré. Nenhum parasito foi encontrado em *Astyanax* sp. Ao contrário de *Metynnis* sp., onde todos apresentaram numerosos cistos, contendo cistozoítos, em mais de 8 meses após a ingestão de mosquitos infectados. Os cistos estavam localizados próximos dos vasos hepáticos, na túnica íntima destes vasos. Os gametócitos foram observados no sangue periféricos de jacarés jovens que ingeriram os peixes infectados no período de 9-12 semanas aproximadamente (Pereira *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

A ocorrência de anuros e peixes na dieta de jacarés em ambiente silvestre associada com o sucesso da infecção em animais simpátricos é sugerido por Lainson *et al.* (2003), Viana *et al.* (2012) e Pereira *et al.* (2014) como uma das vias naturais de transmissão natural de *H. caimani* para jacarés. Apesar de esses resultados terem grande importância para o conhecimento sobre ciclo de vida de *H. caimani* em *C. yacare*, de modo geral, a especificidade de hospedeiros para *Hepatozoon* foi muito questionada (Telford *et al.*, 2001).

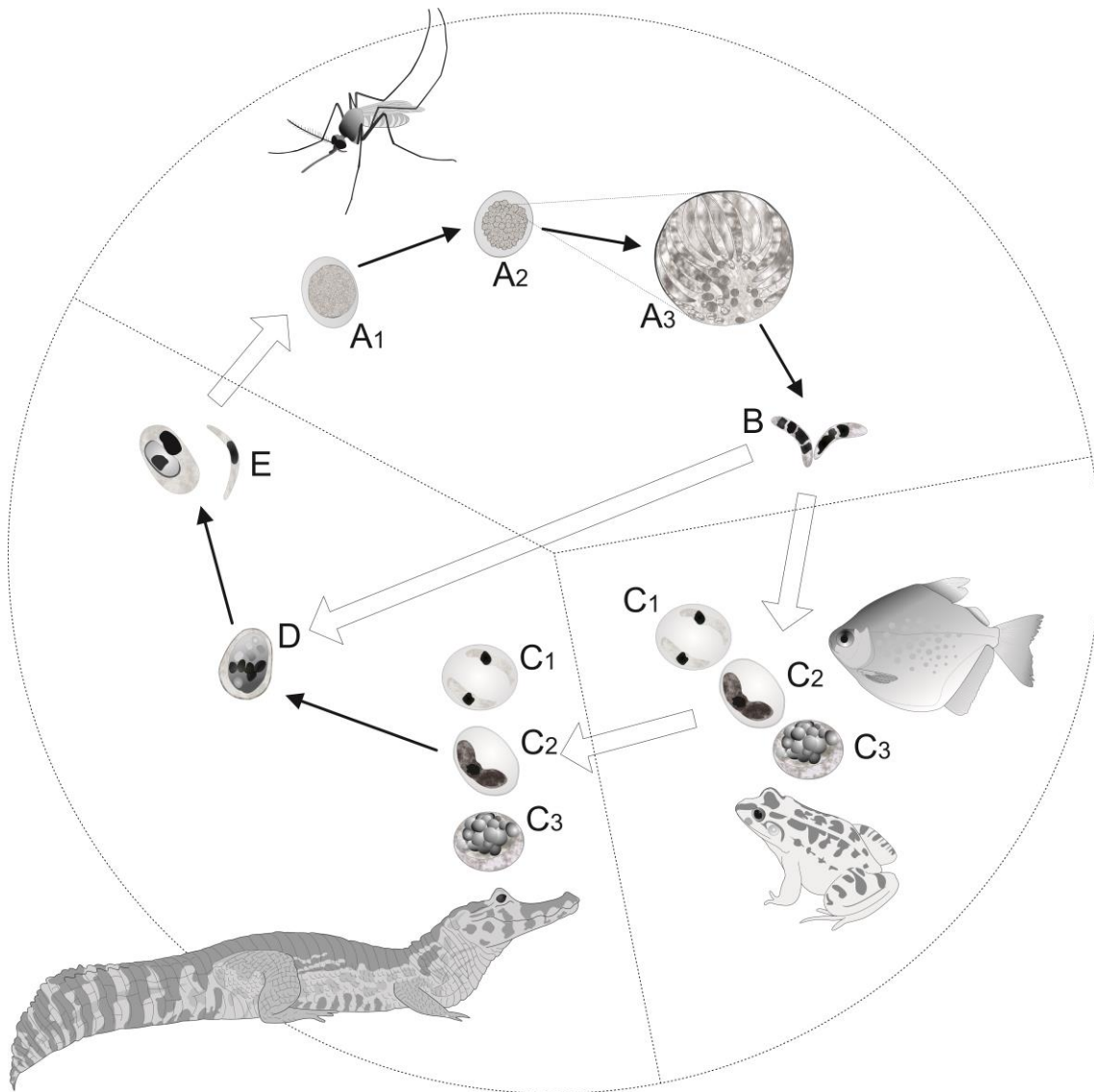


Figura 3: Diagrama representativo do ciclo de *H. caimani*, parasito de *C. yacare*, com base nas descrições de Lainson *et al.* (2003), Viana *et al.* (2011) e Pereira *et al.* (2014). A esporogonia em mosquitos do gênero *Culex*, inicia o desenvolvimento no espaço entre o epitélio intestinal do inseto e a membrana da hemocele, onde o oocisto (A1) realiza o processo de esporulação (A2) produzindo esporocistos (A3), contendo esporozoítos (B), que são formas infectantes para os hospedeiros intermediários e paratênicos. A infecção nos jacarés pode ocorrer por via de ingestão direta de mosquitos, quando os esporozoítos invadem a lâmina própria do intestino delgado dos jacarés, se desenvolvem em merontes (D). Os merontes produzem merozoítos que invadem hemácias e diferenciam-se em gametócitos intra e/ou extraeritrocítico (E), que quando ingeridos por mosquitos dão origem aos oocistos. Outra via de transmissão ocorre quando hospedeiros paratênicos ingerem mosquitos contendo esporozoítos, que se modificam para cistos (C1, C2 e C3) nos órgãos hepáticos; os jacarés, quando se alimentam desses hospedeiros, apresentam diferenciação dos cistos para merontes. As formas de cistozoítos (C1 e C2) são observadas em cortes histológicos, e (C3) visualizada em exame a fresco em tecidos infectados. Ilustração: Fábio Ricardo da Rosa.

Referências Bibliográficas

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA., Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF Jr (2005) The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399–451

Ball GH, Chao J, Telford SR (1967) The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon and Seligman, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae) and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). *Journal of Parasitology* 53: 897-909

Barta JR (2000) Adeleorina. 305-318. In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds). *An Illustrated Guide to the Protozoa*. 2a ed. Allen Press Inc., KS 66044 USA.

Bennett G, Earle M, Pierce M (1992) New species of avian *Hepatozoon* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and re-description of *Hepatozoon neophrontis* (Todd, Wohlbach 1912) Wenyon, 1926. *Syst Parasitol* 23: 183-193

Börner C (1901) Untersuchungen über Hämosporidien. I. Ein Beitrag zur Kenntniss des Genus *Haemogregarina* Danilewsky. *Z. Wissenschaft. Zool* 69: 398-416

Brusatte SL, Benton MJ, Lloyd GT, Ruta M, Wang SC (2011) Macroevolutionary patterns in the evolutionary radiation of archosaurs (Tetrapoda: Diapsida). *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 101: 367–382

Campos Z (2003) Terrestrial Activity of Caiman in the Pantanal, Brazil. *Copeia* 3: 628-634

Catto JB (1991) Taxonomia e ecologia dos helmintos parasitos de *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) no Pantanal Mato-Grossense. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Brasil.

Carini H (1909) Sur une hemogrégarine du *Caiman latirostris* Daud. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 2: 471-472

Chantton EPL, Roubaud E (1913) Sporogonie d'une hémogrégarine chez une tsetse (*Glossina palpalis* R. Desv.). *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 11: 595-609

Clark K, Robinson R, Weishuhn T, Galvin T, Horvath K (1973) *Hepatozoon procyonis* from the Grey Squirrel (*Sciurus carolinensis* Gmelin, 1988), with studies of the life cycle. *Journal of Parasitology* 44: 52-63

Crawshaw Jr PG, Schaller G (1980) Nesting of the Paraguayan caiman (*Caiman yacare*) in Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 33: 283-292

Da Silveira R, Magnusson WE, Campos Z (1997) Monitoring distribution, abundance and breeding áreas of *Caiman crocodilus crocodilus* and *Melanosuchus niger* in the Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. *Journal of Herpetology* 31: 514-520

Da Silveira R (2002) Conservação e manejo de jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) na amazonia brasileira. 61-78 In Verdade LM, Larriera A (Ed). Conservação e manejo de jacarés e crocodilos da América Latina. Piracicaba: C.N. Editora.

Davies AJ, Smit NJ, Hayes PM, Seddon AM, Wertheim D (2004) Haemogregarina bigemina (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) – past, present and future. Folia Parasitologica 51: 99-108

Desser SS, Hong H, Martin DS (1995) The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbiana* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. Journal of Parasitology 81: 212–222

Di Primio R (1925) Contribuição para o conhecimento das Haemogregarinas do Brasil. Sciencia & Medicine 3: 574-576

Göbel E, Krampitz HE (1982) Histologische Untersuchungen zur Gamogonie und Sporogonie von *Hepatozoon erhardovae* in experimentell infizierten Rattenflöhen (*Xenopsylla cheopis*). Zeitschrift für Parasitenkunde 67:261-271

Hoare CA (1924) *Hepatozoon adiei* n. sp., a blood parasite of an Indian eagle. Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene 28: 63-66

Hoare CA (1932) On protozoal blood parasites collected in Uganda: with an account of the life-cycle of the Crocodile Haemogregarine. Parasitology 24: 210-224

Khan RAD, Forrester DJ, Goodwin TM, Ross CA (1980) A hemogregarine from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Journal of Parasitology 66: 324-328

King FW, Burke RL (1989) Crocodilian, Tuatara, and Turtle Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. Association of Systematics Collections, Washington DC, USA.

Ladds PW, Mangunwirjo H, Sebayang D, Daniels PW (1995) Diseases in young farmed crocodiles in Irian Jaya. The Veterinary Record 136: 121-124

Ladds PW, Sims LD (1990) Diseases of young captive crocodiles in Papua New Guinea. Australian Veterinary Journal 67: 323-330

Lainson R (1977) *Trypanosoma cecili* n. sp., a parasite of the South American cayman, *Caiman crocodilus crocodilus* (Linnaeus, 1758) (Crocodilia: Alligatoridae). Protozoology 3: 87-93

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

Llobet A, Aparicio JK (1999) Abundancia, estructura poblacional y perspectivas de aprovechamiento de Caiman yacare en cinco estancias del Departamento del Beni. 285-293 In Manejo y Conservación de Fauna Silvestre en América Latina. Fang TG, Montenegro OL, Bodmer RE. Instituto de Ecología: La Paz, Bolivia

Maciel FR, Logato PVR, Fialho ET, Freitas RTF, Aleixo VM (2003) Coeficiente de digestibilidade aparente de cinco fontes energéticas para o Jacaré do Pantanal (*Caiman yacare*, Daudin, 1802). *Ciência Agrotécnica* 27: 675-680

Michel JC (1973) *Hepatozoon mauritanicum* (Et. et Ed. Sargent, 1904) n. comb. Parasite de Testudo graeca; redescription de la sporogonie chez *Hyalomma aegyptium* et de la schizogonic tissulaire d'après le matériel d'E. Brumpt. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 48: 11-21

Migone LC (1916) Parasitologie de certains animaux au Paraguay. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 9: 359-364

Miller WW (1908) Preliminary Note of a New Pathogenic *Hæmogregarine*, *Hepatozoön Perniciosum*, Found in White Rats in Washington, D. C. *Public Health Reports* 23: 1070-1071

Molnar RE (1993) Biogeography and Phylogeny of the Crocodylia. *In* Fauna of Australia, Amphibia and Reptilia: 1–11. Glasby GC, Ross GJB, Beesley PL (Eds). Canberra: Australian Government Publishing Service

Mourão G, Campos Z, Coutinho M, Abercrombie C (1996). Size structure of illegally harvested and surviving caiman, *Caiman crocodilus yacare*, in Pantanal, Brazil. *Biological Conservation* 75: 261-265

Pereira GR, Soares P, Gomes MQ, Viana LA, Manso PPA, Machado MP, Paiva P, Lourenço-de-Oliveira R (2014) Are fish paratenic natural hosts of the caiman haemoparasite *Hepatozoon caimani*? *Parasitology Research* 13: 39–45

Pessôa SB, Cavalheiro J (1969a) Notas sôbre Hemogregarinas de serpentes Brasileiras. VII. *Revista Brasileira de Biologia* 29: 351-354

Pessôa SB, Cavalheiro J (1969b) Notas sobre Hemogregarinas de serpentes Brasileiras. VIII. Sôbre a evolução da "*Haemogregarina miliaris*" na sanguessuga "*Haementeria lutz*". *Revista Brasileira de Biologia* 29: 351-354

Pessôa SB, De Biasi, Souza DM (1972) Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909), parasite do jacaré-de-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex dolosus* (L. Arribáizaga). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 70: 379-383

Pough FH, Janis CM, Heiser JB (2003) A vida dos vertebrados. 3a ed. São Paulo: Atheneu Editora

Reisz RR, Modesto SP, Scot DM (2011) A new early Permian reptile and its significance in early diapsid evolution. *Proceedings of the Royal Society B* doi:10.1098/rspb.2011.0439

Rieder A, Melo EAS, Borges MF, Borges RCP, Ignácio ARA, Camacho AC (2004) Relações biométricas de jacarés (*Caiman crocodilus yacare*) criados em sistema de cativeiro, Cáceres, Alto Pantanal, Mato Grosso, Brasil. IV Simpósio sobre recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal. Corumbá, MS

Robin LA (1936) Cycle évolutif d'un *Hepatozoon* de *Gecko verticillatus*. *Annales de l'Institut Pasteur* 56: 376-394

Siddall ME (1995) Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarina complex. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 116-125

Silva-Soares T, Ferreira RB, Salles ROL, Rocha CFDR (2011) Continental, insular and coastal marine reptiles from the municipality of Vitória, state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Check list* 7: 290-298

Simond PL (1901) Contribution a l'étude des hématozoaires endoglobulaires des reptiles. *Annales de l'Institut Pasteur* 15: 319-351

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

Telford Jr SR (1984) Haemoparasites of reptiles. *In*: Huff GI, Frye F, Jacobson ER (Eds.), *Diseases of Amphibians and Reptiles*, Plenum Press, New York

Telford Jr SR, Wozniak EJ, Butler JF (2001) Haemogregarine specificity in two communities of Florida snakes, with descriptions of six new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) and a possible species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Journal of Parasitology* 87: 890-905

Telford Jr SR (2008) Hemoparasites of the Reptilia: color atlas and text. CRC Press

Thiroux A (1910) Une hémogrégarine de *Crocodilus niloticus*. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie* 69: 577-578.

Vasconcelos W, Campos Z (2007) Geographic variation between Pantanal Caiman (*Caiman crocodilus yacare*) and Amazonian Caiman (*Caiman crocodilus crocodilus*): First Phase. *Crocodile Specialist Group Newsletter* 26: 6-7.

Verdade LM (1998) *Caiman latirostris*: 18-20 *In* Ross JP (Ed.), *Crocodiles: Status Survey and Conservation Action Plan*. 2a ed. IUCN

Verdade LM (2001) The São Francisco River "Codfish": the northernmost wild populations of the BROADS-SNOURED CAIMAN (*Caiman latirostris*). *Crocodile Specialist Group Newsletter* 20: 80-82

Viana LA, Marques EJ (2005) Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodilia: Alligatoridae) from Pantanal. Corumbá, MS, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 14: 173-175

Viana LA, Paiva F, Coutinho ME, Lourenço-de-Oliveira R (2010a) *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal region, Brazil. *Journal of Parasitology* 96: 83-88

Viana LA, Soares P, Paiva F, Lourenço-de-Oliveira R (2010b) Caiman-biting mosquitoes and the natural vectors of *Hepatozoon caimani* in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 47: 670-676

Viana LA, Soares P, Paiva F, Silva JE, Coutinho ME (2012) Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. *Parasitology Research* 110: 883-886

Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CSA, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MG (2009) Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology* 136: 55–65

Villela PMS (2008) Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Paleosuchus trigonatus*. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Wozniak EJ, Kazacos KR, Telford Jr SR, McLaughlin GL (1996) Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* Infections in unnatural reptilian hosts. *International Journal for Parasitology* 26: 141-146

ARTIGO

CARACTERIZAÇÃO DE *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909)
(ADELEINA: HEPATOTOZOIDAE) EM *Caiman yacare* Daudin, 1801
(CROCODYLIA: ALLIGATORIDAE)

Priscilla Soares dos Santos¹, Tarcilla C. Borghesan³, Lúcio André Viana Dias², Luiz
Eduardo R. Tavares², Vanda Lúcia Ferreira†, Ricardo Lourenço-Oliveira*, Fernando
Paiva²

Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista **Parasitology Research**

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil. soares_priscilla@yahoo.com.br

²Laboratório de Parasitologia Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

³Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

†Laboratório de Zoologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

*Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil

RESUMO

Na região do Miranda-Abobral, Pantanal Sul-matogrossense, foram amostrados 39 jacarés adultos, dos quais 31 (79,5%) estavam parasitados por *H. caimani*. Formas intraeritrocíticas foram caracterizadas por morfologia alongada, algumas encapsuladas, não recurvada, podendo ser estreitos ou amplos. As formas extraeritrocíticas apresentaram extremidades atenuadas e variações na morfologia. Gametócitos extraeritrocíticos apresentaram intensidade média de 6,19% e formas intraeritrocíticas 7,42%. Foi observada relação positiva entre comprimento e largura das hemácias parasitadas ($P = 0,000$; $r^2 = 0,544$), indicando que a largura das hemácias varia em função do comprimento. O comprimento das hemácias parasitadas e não parasitadas diferiram ($P = 0,036$; $z = 2,100$), assim como largura ($P = 0,000$; $z = 5,984$) e área ($P = 0,002$; $z = 3,058$). Entretanto, a morfometria dos núcleos das hemácias apresentaram diferença significativa apenas para comprimento ($P = 0,000$; $z = 5,685$) e área ($P = 0,000$; $z = 3,663$). Tecidos dos animais parasitados, por *H. caimani*, processados por técnicas histológicas, não apresentaram alterações patológicas; apenas nos pulmões e fígados foram visualizados cistos próximos aos vasos. Merontes foram encontrados na parede de vasos dos fígados e entre ductos nos rins. Amostras de sangue foram processadas mediante PCR e resultaram em amplificadas com cerca de 600 e 900 Bp, respectivamente para os *primers* HEPF300/HEP900 e HEMO1/ HEMO2. Este foi o primeiro estudo de confirmação molecular do gênero *Hepatozoon* em populações de jacarés naturalmente infectados; com detalhamento morfológico de gametócitos em microscopia eletrônica de varredura, e histológico de merogonia em fígado e rins de *C. yacare*.

Palavras-chave: Apicomplexa, sequenciamento 18S rDNA, histopatologia, jacaré-do-Pantanal

Abstract

In the Miranda-Abobral region, located in the southern part of Pantanal, were sampled 39 adult caiman, among which 31 (79.5%) were parasitized to *H. caimani*. Intraerythrocytic forms were characterized by elongated morphology, some encapsulated not recurved, and may be narrow or broad. The extraerythrocytic forms showed attenuated ends and variations in the morphology. Extraerythrocytic gametocytes showed medium intensity of 6.19 and intraerythrocytic forms 7.42. Positive relationship was observed between length and width of parasitized erythrocytes ($P = 0.000$; $r^2 = 0.544$), indicating the width of the erythrocytes varies with the length. The length of the erythrocytes parasitized and not parasitized differed ($P = 0.036$; $z = 2.100$), as well as width ($P = 0.000$; $z = 5.984$) and area ($P = 0.002$; $z = 3.058$). However, the morphometric of the nucleos erythrocytes showed significant difference only for length ($P = 0.000$; $z = 5.685$) and area ($P = 0.000$; $z = 3.663$). Animals tissues parasitized by *H. caimani* processed by histological techniques showed no pathological changes; only in lungs and livers were visualized cysts near to veins. Meronts were found in the veins wall of the livers and between kidney ducts. Sample bloods were processed to PCR and resulted in amplifications about 600 and 900 Bp, respectively to *primers* HEPF300/HEP900 and HEMO1/ HEMO2. This the first study for molecular confirmation of the *Hepatozoon* genus in caiman population naturally infected; with morphological detail of gametocytes in scanning electron microscopy, and histological of merogony in liver and lungs of *C. yacare*.

Keywords: Apicomplexa, sequenciamento 18S rDNA, histopatology, jacaré-do-Pantanal

INTRODUÇÃO

Estudos sobre prevalência e vias de transmissão trófica contribuíram inestimavelmente para compreensão sobre o ciclo de vida de *H. caimani* nas populações naturais de jacarés (Lainson *et al.* 2003, Viana e Marques 2005, Viana *et al.* 2012, Pereira *et al.* 2014), porém, de modo geral, a especificidade dos hospedeiros para *Hepatozoon* foi muito questionada (Telford *et al.* 2001). A baixa especificidade das hemogregarinas em répteis propicia uma grande diversidade de espécies hospedeiras; esse histórico pode determinar condições clínicas com significantes lesões inflamatórias necrosantes, incluindo hepatites, pancreatites e esplenites, que em sua maioria estão relacionadas com as infecções em hospedeiros não naturais ou incomuns (Pessoa *et al.* 1974, Wozniak *et al.* 1991, Wozniak *et al.* 1994b).

A constatação de gametócitos em novos hospedeiros foi usada para justificar a descrição de novas espécies (Ball 1967, Sloboda *et al.* 2007), o que dificulta classificação, em decorrência das inconsistências morfológicas e ausência de informações genéticas (Mathew *et al.* 2000, Sloboda *et al.* 2007). Desta forma, considerando que esses parasitos podem infectar uma ampla variedade de espécies de hospedeiros, Telford *et al.* (2004) sugeriram a utilização de ferramentas moleculares para mensurar as relações filogenéticas entre eles e seus hospedeiros, como proposta de diagnóstico e taxonomia.

Os protocolos moleculares, além de contribuírem para detecção dos parasitos em amostras de sangue e tecidos, podem ser efetivos na distinção entre espécies (Wozniak *et al.* 1994a, Ujvari *et al.* 2004, Criado-Fornelio *et al.* 2007). O objetivo do estudo foi caracterizar morfológica e molecularmente o gênero *Hepatozoon* nas populações naturais do jacaré *Caiman yacare*, no Pantanal Sul matogrossense, bem como aspectos histopatológicos da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo – As coletas de amostras foram realizadas no Pantanal Sul Matogrossense, nas regiões do Miranda e Abobral, município de Corumbá/MS. Os ambientes

lênticos estavam localizados próximos a rodovia MS-184, divididos em dois pontos Est1 (S19°19'07.4" W057°03'14.9") e Est2 (S19°19'08.0" W057°03'15.0"). Os ambientes lóticos foram representados pelo rio Vermelho, seccionado em dois pontos, Rio Ver1 (S19°22'09.3" W057°03'04.3") e Rio Ver3 (S19°37'09.9" W056°56'48.7").

Captura e amostragem – Os jacarés foram capturados através busca ativa, em seguida foram mensurados comprimento rostro-cloacal (CRC) e total. Foram capturados apenas indivíduos adultos, CRC superior a 80 cm, em função dos resultados apresentados por Viana *et al.* (2010). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca, na região sagital do tórax, na junção da décima linha de placas esternais, em tubos com anticoagulante comercial (BD Vacutainer™ K3 EDTA) e encaminhados ao laboratório para diagnósticos (licença SISBIO Nº 36781-1).

Caracterização morfológica e morfométrica - Para verificar a existência de formas extraeritrocíticas de *H. caimani* nos jacarés, foi empregada a técnica de microhematócrito (Woo 1969). Foram realizados esfregaços delgados do sangue total, fixados com álcool metílico e corados com Giemsa, para caracterização morfológica e morfométrica das formas de *H. caimani*. As lâminas foram analisadas em sistema computadorizado LAS 3.8 (Lite Qwin– Leica). A intensidade parasitária foi determinada pelo número de formas observadas em 2.000 eritrócitos, em 20 réplicas de 100 eritrócitos examinadas por campo (Godfrey et al. 1987, 1990).

Microscopia Eletrônica de Varredura – Alíquotas de 500µL de amostra de sangue, contendo *H. caimani*, foram diluídas em igual volume PBS pH 7,2, agitadas lentamente e após sedimentação, o sobrenadante foi desprezado e adicionado PBS novamente na mesma proporção, conforme Bhowmick et al. (2013) e processadas em equipamento de microscopia eletrônica de varredura JEOL JSM6380-LV.

Procedimento histopatológico – Cinco jacarés foram eutanasiados, mediante aplicações intracerebral de Thiopentax®. Em seguida, os indivíduos foram necropsiados, com processamento de órgãos e tecidos por impressão e coloração pelo Giemsa. Porções do fígado, baço, pulmão, rins e coração foram transferidos para frascos contendo formol 4% tamponado, para fixação e preservação tecidual. O material foi incluído em parafina para coloração por hematoxilina-eosina. Sanguessugas, coletadas na cavidade oral dos jacarés, também foram submetidas a procedimentos histológicos, com o mesmo protocolo utilizado para os órgãos dos jacarés.

Análises estatísticas - Os índices ecoparasitológicos foram calculados e expressos conforme Bush *et al.* (1997). A distribuição dos parasitos na população de *C. yacare* foi determinada pelo índice de dispersão (ID = variância pela média da intensidade parasitária) e pelo índice de discrepância (D) (Poulin 1993). Para as análises descritivas e cálculo dos índices ID e D foi usado o programa Quantitative Parasitology 3.0 (Rozsa *et al.* 2000). O teste de regressão linear foi utilizado para verificar relação entre comprimento e largura de células parasitadas e não parasitadas; o teste z para comparar morfometria de hemácias e núcleo parasitadas e não parasitadas, mediante das informações de comprimento, largura e área, usando o programa Systat 12.0 (SYSTAT 2007). Com base em parâmetros morfométricos como, comprimento, largura e área de gametócitos intra e extraeritrocítico, foi realizada Análise de componentes principais (PCA), para verificar se estes gametócitos apresentam algum padrão morfológico que os distinguem entre si. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0.05$.

Extração de DNA, PCR e sequenciamento - O DNA total de oito amostras de sangue, com diagnóstico parasitológico positivos para *H. caimani*, foi extraído pela técnica fenol-clorofórmio segundo Sambrook e Russell (2001). Para as PCRs foram utilizados dois pares distintos de oligonucleotídeos, ambos para regiões do gene 18S rRNA. O primeiro foi desenhado por Ujvari *et al.* (2004) (HepF300/ Hep900), *forward* 5'-

GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACG-3' e reverse 5'-
CAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC-3. O segundo por Perkins e Keller (2001),
HEMO1 e HEMO2, com o *forward primer* específico para hemogregarinas (5'-TAT
TGG TTT TAA GAA CTA ATT TTA TGA TTG-3') e um *reverse primer* específico
para parasitos do sub-filo Apicomplexa (5'-CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG
GTT CAC-3').

As amostras extraídas foram quantificadas em equipamento NanoDrop
2000/spectrophotometer (Thermo Scientific) submetidas ao PCR, em reações com total
de 50µL, 1µL de cada set de primer para concentração final 2 mM, 20-50 ng do
template, 5U/µL taq polimerase e DNTPs 2mM e PCR *buffer* e água Milli Q; em todas
as reações um controle negativo era empregado. O ciclo foi ajustado previamente em
reações em gradiente (dados não apresentados) em equipamento Mastercycler Gradient
(Eppendorf®).

As condições das reações para o conjunto de *primers* HepF300/ Hep900 foi:
ciclo inicial 98°C/ 2min., e 35 ciclos de 94°C/ 45s, 50°C/ 30s, 72°C/ 90s e extensão
final 72°C/ 5min; e para o conjunto Hemo1/Hemo2 - ciclo inicial 98°C/ 2min, em 35
ciclos de 94°C/ 45s, 42°C/ 30s, 72°C/ 1min 30s, e extensão final 72°C/ 7min.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese a 80 V, em gel de
agarose 1,5% com Brometo de Etídio (50 µL/1L) para evidênciação em iluminação
ultravioleta em 300 nm. Para estimativa do numero de pares de base (bp) foram
aplicados dois marcadores: um de 1 Kb (Ludwig Biotecnologia Ltda) e outro de 100 bp
(SigmaAldrich).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR, apenas purificados foram submetidos a
reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com
especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer
(Perkin Elmer) e ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). As reações foram
submetidas a 30 ciclos: 15s a 96°C; 15s a 50°C; 4min a 60°C, com um ciclo inicial de 1min a

96°C. Nas reações de sequenciamento foram utilizados os respectivos oligonucleotídeos citados acima.

RESULTADOS

Caracterização dos gametócitos e alterações celulares - Foram amostrados 39 jacarés adultos, dos quais 31 estavam parasitados por *H. caimani*, prevalência de 79,5%. Gametócitos extraeritrocíticos foram observados pela técnica de Woo (1969) e em esfregaços delgados, com intensidade média 6,19% (1 – 26). As formas intraeritrocíticas foram visualizadas somente em esfregaços delgados, intensidade parasitária de 7,42% (1 – 42). Ambas as formas foram visualizadas em todos os animais parasitados, os índices de discrepância para as formas intra e extraeritrocíticos foram, respectivamente, de 0,589 e 0,591.

Apesar da intensidade parasitária média não ser alta, foi possível observar agrupamento de gametócitos extraeritrocíticos invadindo o mesmo eritrócito (Figuras 10: A e B), e eritrócitos parasitados por mais de um gametócito (Figura 11 C).

Foi constatada relação positiva entre comprimento e largura das hemácias parasitadas ($P = 0,000$; $r^2 = 0,544$), indicando que a largura das hemácias varia em função do comprimento (Figura 1), entretanto não houve relação entre comprimento e largura das hemácias não parasitadas ($P = 0,061$; $r^2 = 0,346$). O comprimento das hemácias parasitadas e não parasitadas diferiram ($P = 0,036$; $z = 2,100$), assim como a largura ($P = 0,000$; $z = 5,984$) e área ($P = 0,002$; $z = 3,058$) (Figuras 2, 3 e 4). Entretanto, a morfometria do núcleo das hemácias apresentou diferença significativa apenas para o comprimento ($P = 0,000$; $z = 5,685$) e área ($P = 0,000$; $z = 3,663$) (Figuras 5 e 6). A largura do núcleo não apresentou diferença significativa entre hemácias parasitadas e não parasitadas ($P = 0,127$; $z = -1,527$).

Pela análise de componentes principais, variáveis como comprimento, largura e área dos gametócitos foram ineficientes para separar grupos distintos de gametócitos intraeritrocíticos. Entretanto, essas variáveis foram conspícuas para reforçar a separação de gametócitos intra e extraeritrocíticos (Figura 7).

As formas extraeritrocíticas (Figura 9) apresentaram dimensões de $23,89 \pm 3,37 \times 2,81 \pm 0,65 \mu\text{m}$ ($14,67 - 34,183 \times 1,251 - 6,292$; $n = 145$) (Tabela 1) com extremidades atenuadas. Além das variações morfométricas, foram também observadas variações na morfologia. A cromatina nuclear apresentou variação na disposição, em relação ao citoplasma, podendo variar de mediana ao segundo quarto do corpo do gametócito (Figuras 10: A e B).

Formas intraeritrocíticas foram caracterizadas por morfologia alongada, algumas encapsuladas, não recurvada (Figura 11 A), podendo ser estreitos ou amplos, $12,4 \pm 1,79 \times 4,11 \pm 1 \mu\text{m}$ ($8,9 - 22,3 \times 2,2 - 8,3$; $n = 145$) (Tabela 1). Núcleos posicionados nas porções terminais ou medianas, com cromatina condensada ou dispersa (Figuras 11: A e B). O citoplasma apresentou colorações distintas, em alguns foram observadas opacidade e ausência de pigmento, em outros (gametócitos encapsulados) a coloração de tonalidade azulada persistiu inibindo a visualização do núcleo (Figura 11 D). Em 87,1% dos jacarés parasitados, foi observado vacúolo parasitário eritrocítico (Figura 11 C). Além das alterações hipertróficas em células parasitadas, outras modificações foram observadas, como deslocamento do núcleo celular central para a extremidade, e até mesmo ausência (Figuras: 12 A e B).

Microscopia Eletrônica de Varredura – Os gametócitos extraeritrocíticos visualizados corroboram as características morfológicas observadas em microscopia de luz; apresentando corpo alongado, sem estriações, com destaque para o anel apical conspícuo e a porção posterior afilada (Figura 9).

Histopatologia - Merontes foram encontrados na parede dos vasos do fígado e entre ductos dos rins (Figuras 13: A, B, C e D). Na lâmina própria do intestino delgado, não foram observadas estruturas semelhantes. Os dados morfométricos se encontram na Tabela 2. Dentre os tecidos examinados (rins, baço, pulmão, fígado e intestino delgado e grosso), apenas os pulmões e fígados apresentaram cistos, contendo cistozoítos, próximos aos vasos sanguíneos (Figuras 14: A, B e C; Tabela 2). Tecidos dos animais parasitados, por *H. caimani*, não apresentaram

alterações como infiltrados e/ou necroses circundando merontes e cistos. Em células epiteliais do intestino delgado foi observado estágio de macrogametócito jovem semelhante aqueles observados para *Eimeria* spp. (7,527 x 8,182µm; 25,901 µm²) (Figuras 16: A e B).

As sanguessugas colhidas na cavidade oral dos jacarés, apresentaram oocistos, contendo esporocistos, além de estruturas compatíveis a rosetas, semelhantes as encontradas em parasitos Apicomplexa (Figuras 15: A, B, C e D; Tabela 3), no entanto não foi possível concluir a qual gênero pertenciam.

Análise molecular – Ambos os conjuntos de *primers* HepF300/ Hep900 e HEMO1/ HEMO2 amplificaram fragmentos, com cerca de 600 e 900 bp, respectivamente; avaliados em gel de agarose (Figura 8). O sequenciamento direto dos produtos dos PCRs não foi possível, sendo necessário a clonagem dos amplicons (Anexo3). O processamento de clonagem está em curso.

DISCUSSÃO

Uma vez que prevalência e intensidade das infecções parasitárias são consideradas como parâmetros importantes no monitoramento das doenças em animais silvestres (Mihalca et al. 2008), os dados obtidos foram confrontados com outros registros na mesma região, porém em anos diferentes. A prevalência de jacarés parasitados na amostra estudada correspondeu a 79.5% ($n = 39$) semelhante aos dados de Viana e Marques (2005) (71.4%; $n = 28$) e Viana et al. (2010) (77.22%; $n = 229$), porém, inferior aos de Almeida (2006) (98.44% ; $n = 129$). Parte dessa diferença pode ser explicada através das amostras e/ou esforço amostral distinto (Arya et al. 2012). A alta prevalência de *H. caimani* é provavelmente explicada, pelo o comportamento de distribuição agregada das populações de *C. yacare* (Campos 2003, Campos et al. 2003), pois a densidade populacional de hospedeiros, contatos entre indivíduos, implica proporcionalmente no aumento linear da taxa de transmissão (Anderson e May 1979, Anderson e May 1981, McCallum et al. 2001).

Considerando os papéis desempenhados por parasitos em interações tróficas, outra influência para alta prevalência de *H. caimani* na população de *C. yacare* pode estar associada à dieta, pois além da transmissão direta do vetor ao jacaré (Viana et al. 2010), existe a transmissão mediante hospedeiros vertebrados paratênicos, na qual, o hospedeiro intermediário (*C. yacare*) preda hospedeiros paratênicos, que contém fases do parasito que não se desenvolvem, denominadas cistos (Landau et al. 1972). A estrutura trófica em infecção natural, através da ingestão de anuros simpátricos *Leptodactylus chaquensis*, *L. podicipinus* (Leptodactylidae) e peixes *Metynnis* sp. (Characidae) demonstraram susceptibilidade desses hospedeiros paratênicos na transmissão de *H. caimani* para *C. yacare* (Viana et al. 2012, Pereira et al. 2014).

O comprimento e largura média dos gametócitos intraeritrocíticos (Tabela 1) foram semelhantes aos relatados por Lainson et al. (2003) ($12,15\mu\text{m} \times 4,3\mu\text{m}$) e Viana e Marques (2005) ($12,7\mu\text{m} \times 4,4\mu\text{m}$); entretanto diferem nos valores correspondentes a amplitude, sendo que os gametócitos do presente trabalho apresentaram maiores amplitudes. Além das formas intraeritrocíticas, os gametócitos extraeritrocíticos também apresentaram medidas semelhantes às formas descritas por Lainson et al. (2003), porém amplitudes distintas. A prevalência de 79,5%, considerou a parasitemia de gametócitos intra e extraeritrocíticos, pois todos os animais parasitados por *H. caimani* apresentaram as duas formas simultaneamente. Entretanto, Almeida (2006) observou diferença na parasitemia, relatando que os gametócitos intraeritrocíticos foram mais abundantes. Além das diferenças dos gametócitos, reportadas no presente estudo, alguns eritrócitos continham mais de um gametócito, já descritos em crocodilianos (Lainson et al. 2003) e serpentes (O'Dwyer et al. 2003, O'Dwyer et al. 2004).

Em parasitos do sub-filo Apicomplexa, os gametócitos estão comumente individualizados dentro de uma única célula, na circulação do hospedeiro, como por exemplo, eritrócitos; no entanto duas ou três formas podem ser observadas (Jovani et al. 2004). O termo *double gametocyte*, foi utilizado por Jovani (2002) para explicar infecções com gametócitos duplos (DGI's). A ocorrência de DGI's é frequente em eritrócitos de répteis, como quelônios (Mihalca et al. 2002, Široký et al. 2004), serpentes (Jakes et al. 2003, O'Dwyer et al. 2004) e

crocodilianos (Lainson et al. 2003). A amostra estudada diferiu dos resultados de Jakes et al. (2003), que relataram como observação ocasional; no presente estudo todos os indivíduos positivos para *H. caimani*, apresentaram parasitismo duplo. Segundo Jovani (2002), a ocorrência de dois ou mais gametócitos presentes em uma única célula é considerada como potencial para facilitar a transmissão do parasito para hospedeiros invertebrados.

Os resultados obtidos pela comparação morfológica de gametócitos de *Hepatozoon* em serpentes, apresentados por Moço et al. (2002), concluíram que, dependendo da variável considerada, pode-se separar diferentes populações. Contudo, no presente estudo, as diferenças observadas na morfologia dos gametócitos intraeritrocíticos, como comprimento, largura e área não foram suficientes para separar em grupos distintos empregando análise de componentes principais; demonstrando que a comparação entre formas transitórias de gametócitos intra e extraeritrocíticos são mais consistentes para separação em dois grupos, porém, não é viável separá-las como populações distintas, uma vez que são apenas modificações de fases do ciclo de vida do parasito.

Os oocistos observados nas sanguessugas apresentam morfologia semelhante às pranchas de *Hepatozoon fusifex* em *Aedes togoi*, ilustradas por Telford (2008) e reportada por Ball et al. (1969). Porém a morfometria descrita para as formas diagnosticadas nas sanguessugas apresentaram estruturas com maiores dimensões daquelas relatadas por Ball et al. (1969). Apesar das estruturas observadas serem semelhantes a oocistos descritos para o gênero em trabalhos anteriores, não se pode concluir que essas formas representam, de fato, fases de *Hepatozoon*, pois trabalhos precedentes com ciclo de vida demonstraram que sanguessugas são vetores de *Haemogregarina*, *Desseria* e *Cyrlia* (Khan et al. 1980, Lainson 1981, Siddall e Desser 1991, Siddall 1995). Algumas tentativas de infecção experimental de *Hepatozoon* para crocodilianos não obtiveram sucesso com a utilização de sanguessugas (Pessôa et al. 1972, Lainson et al. 2003). Em serpentes aquáticas, Smith et al. (1994) observaram que, embora *P. ornata* compartilhe o mesmo ambiente que *Nerodia sipedon* (Squamata: Colubridae), e ser validada como hospedeiro definitivo potencial para *Hepatozoon sipedon*, não apresenta desenvolvimento de estágios sexuais ou esporogônicos.

Durante as primeiras análises histológicas em peças de intestino delgado, para busca de estágios merogônicos, foi observada uma estrutura semelhante à macrogametócito jovem de *Eimeria* ssp.. Anteriormente, Aquino-Shuster e Duszynski (1989) descreveram duas espécies de eimerídeos em *C. yacare*, *E. caimani* e *E. paraguayensis*.

Este foi o primeiro relato de merogonia em órgãos hepáticos de jacarés, pois Lainson et al. (2003) realizaram exames em oito jacarés da espécie *C. crocodilos*, naturalmente infectados com *H. caimani*, não diagnosticaram estágio de merogonia nestes órgãos, apenas na lâmina própria do intestino delgado. A observação de merogonia em rins e fígados é comum em mamíferos parasitados por *H. canis*, assim como nodos linfáticos, músculos esqueléticos e cardíacos (Miller 1908, Ivanov e Tsachev 2008). Este não foi o primeiro registro sobre diagnóstico de cistos monozoica e dizóica em fígado de jacarés; Lainson et al. (2003) já haviam descrito em *C. crocodilus*. Relatos como estes também foram observados em mamíferos (Desser 1990, Baneth e Shkap 2003).

O termo “infecção” é referido como, presença de parasito em um indivíduo ou população de hospedeiros, enquanto “doença” se refere a condições clínicas que podem ser observadas ou mensuradas (Scott 1988). Em animais silvestres tendem a manifestar poucos sinais reconhecíveis de doenças (Gulland 1997). Johnson et al. (2008) verificaram a ocorrência de cistos de *H. americanum* em macrófago do miocárdio do roedor *Sigmodon hispidus* com a presença de atrofia, degeneração e necrose da miofibra com foco de infiltrado inflamatório no tecido do miocárdio. No anuro *Hoplobatrachus rugulosus*, naturalmente infectado com *Hepatozoon* sp., apresentou lesões predominantemente no fígado, com inflamação subaguda com infiltração de linfócitos e eosinófilos em torno dos merontes de *Hepatozoon* sp., e lesões semelhantes a granulomas (Sailasuta et al. 2011). Segundo Telford (1984), a ausência de infiltração inflamatória e/ou necrose em torno de merontes e cistos, observadas nos animais do presente estudo, é explicada como uma aparente adaptação destes hemoparasitos aos seus hospedeiros naturais, que provavelmente foram expostos no passado a altas taxas de infecção (Ebert 2005).

A especificidade de hospedeiros é descrita como um grau de adaptação para o qual um parasito é especialista, que confere grande importância para aspectos ecológicos e evolutivos das interações parasito-hospedeiros (Ebert 2005). Um exemplo de especificidade de *Hepatozoon* para répteis é expressa pela infecção de *H. mocassini* em serpentes e lagartos, realizadas por Wozniak et al. (1996), que examinaram serpentes, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, naturalmente parasitadas por *H. mocassini*, as quais continham numerosos merontes e cistos dizóicos hepáticos e nenhuma evidência de inflamação ou necrose foi notada circundando os merontes ou cistos dizoicos nos tecidos. Entretanto, quando *H. mocassini* foi transmitido para três espécies de lagartos (*Sceloporus undulatus*, *Eumeces obsoletus*, *S. poinsetti*), todos apresentaram leve letargia no início da infecção e posteriormente apresentaram letargia severa e anorexia. Portanto, a alta intensidade parasitária observada em sangue periférico de *C. yacare* e a ausência de alterações histopatológicas podem ser atribuídas em parte pela especificidade do parasito.

A utilização dos *primers* HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900 para o PCR das amostras de sangue colhidas de *C. yacare*, foi resultante de protocolos anteriores que prediziam sobre a descrição de diagnósticos rápidos, com iniciadores específicos 18S para parasitos Apicomplexa em hospedeiros com eritrócitos nucleados (Ujvari et al. 2001, Perkins e Keller 2001). Estes mesmos protocolos foram aplicados em estudo realizado com hepatozoídeos de serpentes no Brasil (Moço 2012). Entretanto, os processos das reações dos ciclos para cada *primer*, foram readaptados para o presente estudo. Lamentavelmente, não foi possível sequenciar diretamente os amplificadores obtidos, sem clonagem; oportunamente esta fase será concluída e possibilitará a comparação das sequências com outras depositadas em bancos genéticos.

A descrição do ciclo de vida de *H. caimani*, realizadas anteriormente (Lainson et al. 2003, Viana et al. 2010, Viana et al. 2012, Viana et al. 2013, Pereira et al. 2014) associadas aos resultados da PCR, confirmam o gênero *Hepatozoon*. No Brasil, quando diagnosticado em comunidades de jacarés é classificado como uma única espécie, *H. caimani*. Este foi o primeiro estudo de confirmação molecular do gênero *Hepatozoon*; com detalhamento morfológico dos

gametócitos em microscopia eletrônica de varredura, e histológico dos estágios de merogonia em fígado e rins de *C. yacare* no Pantanal Sul-matogrossense.

Referências

Almeida RS (2006) *Trypanosoma* sp. (Protozoa: Kinetoplastida) em *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae), no Pantanal de Mato Grosso do Sul – Região Miranda Abobral. Dissertação de Pós Graduação em Ecologia e Conservação. UFMS. Campo Grande

Anderson RM, May RM (1979) Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280: 361-367

Anderson RM, May RM (1981) The population dynamics of micro-parasites and their invertebrate hosts. *Philos Trans R Soc Lond B* 291: 451-524

Aquino-Shuster AL, Duszynski DW (1989) Coccidian parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) from two species of crocodilian, *Caiman yacare* Daudin and *Caiman latirostris* Daudin, (Alligatoridae) from Paraguay, South America. *J. Parasitol.* 75: 348-352

Arya R, Antonisamy B, Kumar S (2012) Sample Size Estimation in Prevalence Studies. *Indian J Pediatr* 79:1482–1488

Ball GH, Chao J, Telford SR (1967) The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon and Seligman, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae) and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). *Journal of Parasitology* 53: 897-909

Ball GH, Chao J, Telford Jr SR (1969) *Hepatozoon fusifex* sp. n., a Hemogregarine from *Boa constrictor* Producing Marked Morphological Changes in Infected Erythrocytes. *The J Parasitol* 55: 800-813

Baneth G, Shkap V (2003) Monozoic Cysts of *Hepatozoon canis*. *J Parasitol* 89: 379-381

Bhowmick S, Das DK, Maiti AK, Chakraborty C (2013) Structural and textural classification of erythrocytes in anaemic cases: A scanning electron microscopic study. *Micron* 44: 384–394

- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.*. revisited*. J Parasitol 83: 575-583
- Campos Z (2003) *Caiman crocodilus yacare*. Food-related movement. Herp Rev 34: 141
- Campos Z, Coutinho M, Magnusson W (2003) Terrestrial activity of caiman in the Pantanal, Brazil. Copeia 2003: 628-634
- Criado-Fornelio A, Ruas JL, Casado N, Farias NAR, Soares MP, Müller G, Brum JGW, Berne MEA, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2006) New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. J Parasitol 92: 93–99
- Desser SS (1990) Tissue “cysts” of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus carolinensis*: the significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. J Parasitol 76: 257-259
- Ebert D (2005) Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>
- Godfrey Jr RD, Fedynich AM, Pence DB (1987) Quantification of haematozoa in blood smears. J Wildlife Dis 23: 558–565
- Godfrey Jr RD, Pence DB, Fedynich AM (1990) Effects of host and spatial factors on a haemoproteid community in mourning doves from western Texas. J Wildlife Dis 26: 435–441
- Gulland FMD (1979) The impact of parasites on wild animal populations. Parasitologia 39: 287-291
- Ivanov A, Tsachev I (2008) *Hepatozoon canis* and hepatozoonosis in the dog. Trakia Journal of Sciences 6: 27-35
- Jakes KA, O’Donoghue PJ, Whittier J (2003) Ultrastructure of *Hepatozoon boigae* (Mackerras, 1961) nov. comb. from brown tree snakes, *Boiga irregularis*, from northern Australia. Parasitol Res 90: 225–231
- Johnson EM, Allen KE, Breshears MA, Panciera RJ, Little SE, Ewing SA (2008)

Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. Vet Parasitol 151:164–169

Jovani R (2002) Malaria transmission, sex ratio, and erythrocytes with two gametocytes. Trends Parasitol 18:537–539

Jovani R, Amo L, Arriero E, Krone O, Marzal A, Shurulinkov P, Tomás G, Sol D, Hagen J, López P, Martín J, Navarro C, Torres J (2004) Double gametocyte infections in apicomplexan parasites of birds and reptiles. Parasitol Res 94: 155–157

Khan RAD, Forrester DJ, Goodwin TM, Ross CA (1980) A hemogregarine from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). J Parasitol 66: 324-328

Lainson R (1981) On *Cyrtilia gomesi* (Neiva and Pinto, 1926) gen. nov. (Haemogregarinidae) and *Trypanosoma bourouli* Neiva and Pinto, in the fish *Synbranchus marmoratus*: simultaneous transmission by the leech *Haementeria lutzi*. 150-158. In: Canning EU (ed) Parasitological topics. (Society of Protozoologists special publication 1) Society of Protozoologists, London

Lainson R, Paperna I, Naiff RD (2003) Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi e De Souza, 1972 in the Caiman *Caiman c. crocodilus*, the Frog *Rana catesbeiana* and the Mosquito *Culex fatigans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 103-113

Landau I, Michel JC, Chabaud AG (1972) Cycle biologique d' *Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de Coccidie. Z Parasitenk 38: 250-270

Mathew JS, Van Den Bussche RA, Ewing SA, Malayer JR, Latha BR, Panciera RJ (2000) Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. J Parasitol 86: 366–372

McCallum H, Barlow N, Hone J (2001) How should pathogen transmission be modelled? Trends Ecol Evol 16: 295-300

Mihalca A, Achelăriței D, Popescu P (2002) Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of european pond turtles (*Emys orbicularis*) from Drăgășani, Vâlcea county, Romania. Sci Parasitol 2: 22-27

Mihalca AD, Racka K, Gherman C, Ionescu DT (2008) Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from Romania. Parasitol Res 102: 1081–1083

487

488 Miller WW (1908) Preliminary Note of a New Pathogenic Hæmogregarine, Hepatozoön
489 Perniciosum, Found in White Rats in Washington, D. C. Public Health Rep 23: 1070-1071

490

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

494

495 O'Dwyer LH, Moço TC, Barrella TH, Vilela FC, Silva RJ (2003) Prevalence of *Hepatozoon*
496 spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) among recently captured Brazilian snakes. Arq Bras Med
497 Vet Zootec 55:

498

499 O'Dwyer LH, Moço TC, Silva RJ (2004) Description of the gamonts of a small species of
500 *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) found in *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes,
501 Viperidae). Parasitol Res 92: 110–112

502

503 Pereira GR, Soares P, Gomes MQ, Viana LA, Manso PPA, Machado MP, Paiva P, Lourenço-
504 de-Oliveira R (2014) Are fish paratenic natural hosts of the caiman haemoparasite *Hepatozoon*
505 *caimani*? Parasitol Res 13: 39-45

506

507 Perkins SL, Keller AK (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of
508 hemogregarines amplified with specific primers. J Parasitol 87:870-876

509

510 Pessôa SB, De Biasi, Souza DM (1972) Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909),
511 parasite do jacaré-de-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex dolosus* (L.
512 Arribálzaga). Mem Inst Oswaldo Cruz 70: 379-383

513

514 Pessôa SB, De Biasi P, Puerto G (1974) Transferencia do *Hepatozoon tupinambi* parasita do
515 lagarto *Tupinambis teguixin*, para a serpente cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) por
516 intermédio de mosquito *Culex fatigans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 72:295-299

517

518 Poulin R (1993) The disparity between observed and uniform distributions: a new look at
519 parasite aggregation. Int J Parasitol 23: 937-944

520

521 Rozsa L, Reiczigel J, Majoros G (2000) Quantifying parasites in samples of hosts. J Parasitol
522 86: 228-232

523

Sailasuta A, Satetasit J, Chutmongkonkul M (2011) Pathological Study of Blood Parasites in Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834) Veterinary Medicine International 2011: 1-5 (doi:10.4061/2011/850568)

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning – a laboratory manual. 3a ed. Cold spring harbor laboratoty press, New York

Scott ME (1988) The impact of infection and disease on animal populations: implications for conservation biology. Cons Biol 2: 40-55

Siddall ME, Desser SS (1991) Merogonic development of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the leech *Placobdella ornata* (Glossiphoniidae), its transmission to a chaelonian intermediate host and phylogenetic implications. J Parasitol 77: 426-436

Siddall ME (1995) Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. J. Eukaryot Microbiol 42: 116–125

Šíroký P, Kamler M, Modrý D (2004) Long-term occurrence of *Hemolivia* cf. *mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in captive *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence for cyclic merogony? J Parasitol 90:1391-1393

Smith TG, Desser SS, Martin DS (1994) The development of *Hepatozoon sipedon* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). Parasitol Res 80:559-568

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

Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D (2007) A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. J Parasitol 93:1189-1198

SYSTAT (2007) Systat 12 for windows. Richmond, California

- Telford Jr SR (1984) Haemoparasites of reptiles. In: Huff GI, Frye F, Jacobson ER (Eds.), Diseases of Amphibians and Reptiles, Plenum Press, New York
- Telford Jr SR, Wozniak EJ, Butler JF (2001) Haemogregarine specificity in two communities of Florida snakes, with descriptions of six new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) and a possible species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). J Parasitol 87: 890-905
- Telford Jr SR (2008) Hemoparasites of the Reptilia: color atlas and text. CRC Press
- Ujvari B, Madsen T, Olsson M (2004) High Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. J Parasitol 90: 670-672
- Viana LA, Marques EJ (2005) Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodilia: Alligatoridae) from Pantanal, Corumbá, MS, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 14: 173-175
- Viana LA, Paiva F, Coutinho ME, Lourenço-de-Oliveira R (2010) *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal region, Brazil. J Parasitol 96: 83–88
- Viana LA, Soares P, Silva JE, Paiva F, Coutinho ME (2012) Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. Parasitol Res 110: 883-886
- Woo PTK (1969) The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. Can J Zoo 47: 921-923
- Wozniak EJ, Telford Jr SR (1991) The fate of possibly two *Hepatozoon* species naturally infecting Florida black racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors: histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. Int J Parasitol 21: 511-516
- Wozniak EJ, McLaughlin GL, Telford Jr SR (1994a) Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert sidewinder rattlesnakes (*Crotalus cerastes cerastes*). J Zoo Wildl Med 25: 103-110

Wozniak EJ, Telford Jr SR, McLaughlin GL (1994b) Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its applications to preventative zoological medicine. J Zoo Wildl Med 25: 538-547

Wozniak EJ, Kazacos KR, Telford Jr SR, McLaughlin GL (1996) Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* Infections in unnatural reptilian hosts. Int J Parasitol 26: 141-146

609 Tabela 1. Dados morfométricos de gametócitos intra e extraeritrocíticos de *H. caimani*, parasito de *C. yacare*. CG: comprimento de gametócitos; L.G:
610 Largura de gametócitos; A.G: Área do gametócito; C.N: Comprimento do núcleo; L.N: Largura do núcleo; A.N: Área do núcleo. Medidas lineares em
611 μm e medidas de áreas em μm^2

Intraeritrocíticos							Extraeritrocíticos					
Gametócitos			Núcleo				Gametócitos			Núcleo		
CG	L.G	A.G	C.N	L.N	A.N		CG	L.G	A.G	C.N	L.N	A.N
DP	1,797	1,001	4,588	1,674	1,038	3,445	3,378	0,650	7,159	1,627	0,721	3,917
Média	12,449	4,111	29,922	5,895	3,080	16,150	23,891	2,809	50,689	7,027	2,752	18,002
Mín.	8,860	2,200	22,585	2,410	1,403	10,518	14,674	1,251	31,274	2,806	1,073	10,254
Máx.	22,274	8,318	52,082	12,873	6,025	32,453	34,183	6,292	77,127	13,225	6,455	31,229

620 Tabela 2. Dados morfométricos de merontes, merozoítos, cisto e cistozoíto de *H. caimani*, observados em tecidos de *C. yacare*. Comp.: comprimento
621 das formas; Larg.: largura; V.P.: vacúolo parasitário; E.P.: espessura da parede. Medidas lineares em μm e medidas de áreas em μm^2

Merontes					Merozoítos			Cistos				Cistozoítos		
	Comp.	Larg.	Área	V.P.	Comp.	Larg.	Área	Comp.	Larg.	Área	E.P.	Comp.	Larg.	Área
DP	3,450	5,449	6,585	0,731	2,689	0,723	5,170	0,997	2,470	4,065	1,645	6,394	1,252	15,150
Média	34,159	22,024	92,875	2,879	25,872	4,107	54,397	33,519	31,952	100,840	2,120	19,510	4,809	45,061
Mín.	29,484	14,550	85,395	2,457	23,818	3,442	49,560	32,665	30,139	98,066	0,688	12,271	3,404	24,123
Máx.	37,459	24,409	100,737	3,971	28,915	4,876	59,845	34,615	34,765	105,506	3,977	26,580	6,261	59,559

629 Tabela 3. Dados morfométricos de oocistos, esporocistos e estruturas semelhantes a rosetas, observadas em sanguessugas *P. ornata* encontradas
630 aderidas em *C. yacare*. Comp.: comprimento das formas; Larg.: largura; E.P.: espessura da parede. Medidas lineares em μm e medidas de áreas em μm^2 .
631
632

	Oocistos				Esporocistos			“Rosetas” 633		
	Comp.	Larg.	Área	E.P.	Comp.	Larg.	Área	Comp.	Larg.	Área
DP	373,211	213,265	1.138,743	0,051	5,425	4,873	15,466	6,756	6,183	22,160
Média	814,503	449,087	2.256,207	2,701	18,775	18,817	58,610	21,078	17,799	63,589
Mín.	393,454	309,800	1.196,271	2,670	13,283	14,339	44,411	13,730	9,617	35,727
Máx.	1.119,809	694,603	3.460,271	2,759	24,145	25,805	76,260	29,018	26,626	84,768

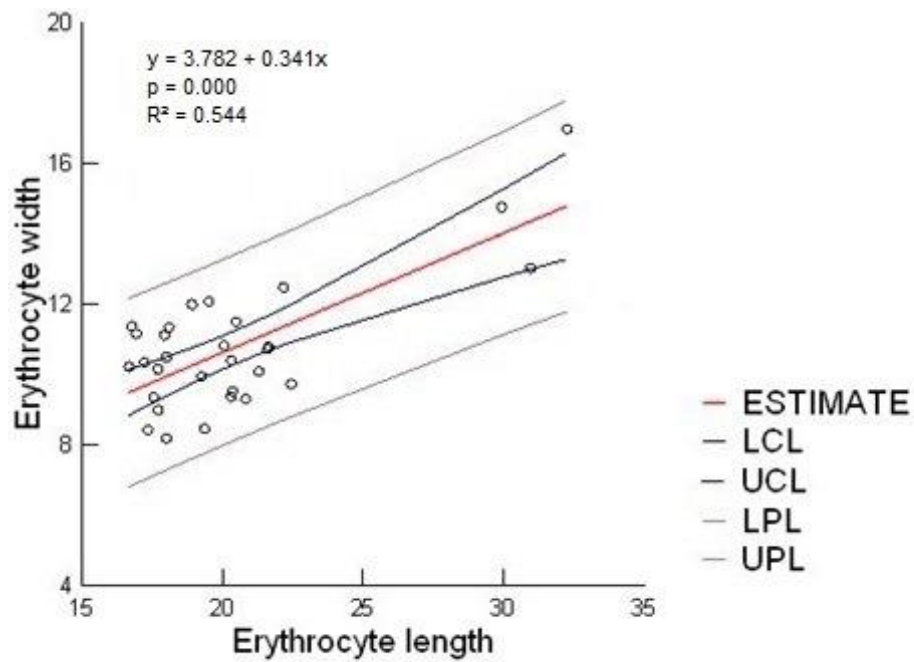


Figura 1. Regressão linear entre comprimento e largura das hemácias não parasitadas, indicando que a largura das hemácias varia em função do comprimento. Retas do gráfico: valores previstos (estimate), intervalos de confiança (LCL e UCL) e intervalos previstos (LPL e UPL).

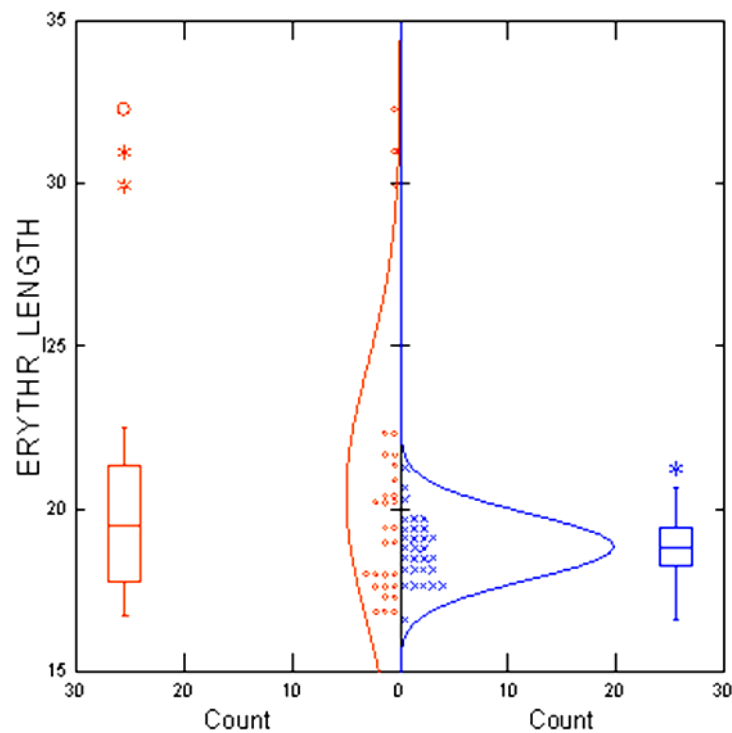


Figura 2. Comparação entre as médias do comprimento das hemácias parasitadas por *H. caimani* (o) e não parasitadas (x). $P: 0,036$; $z: 2,100$.

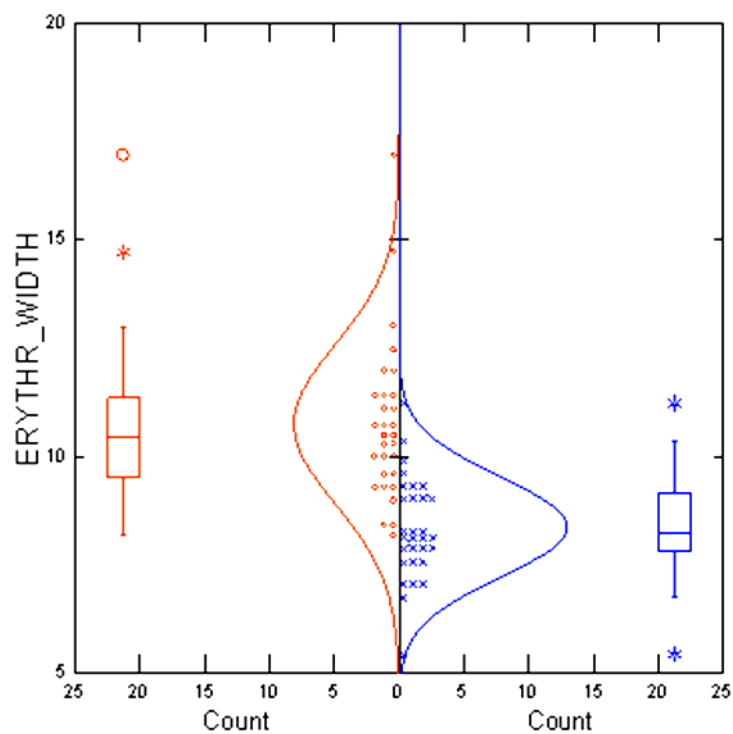


Figura 3. Comparação entre as médias da largura das hemácias parasitadas por *H. caimani* (o) e não parasitadas (x). $P: 0.000$; $z: 5.984$.

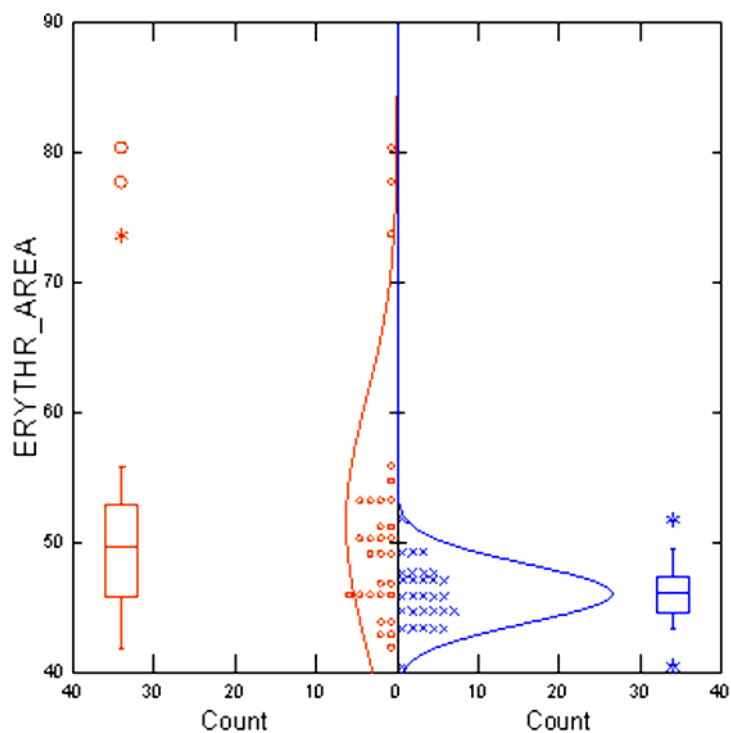


Figura 4. Comparação entre as médias da área das hemácias parasitadas por *H. caimani* (o) e não parasitadas (x). $P: 0.002$; $z: 3.058$.

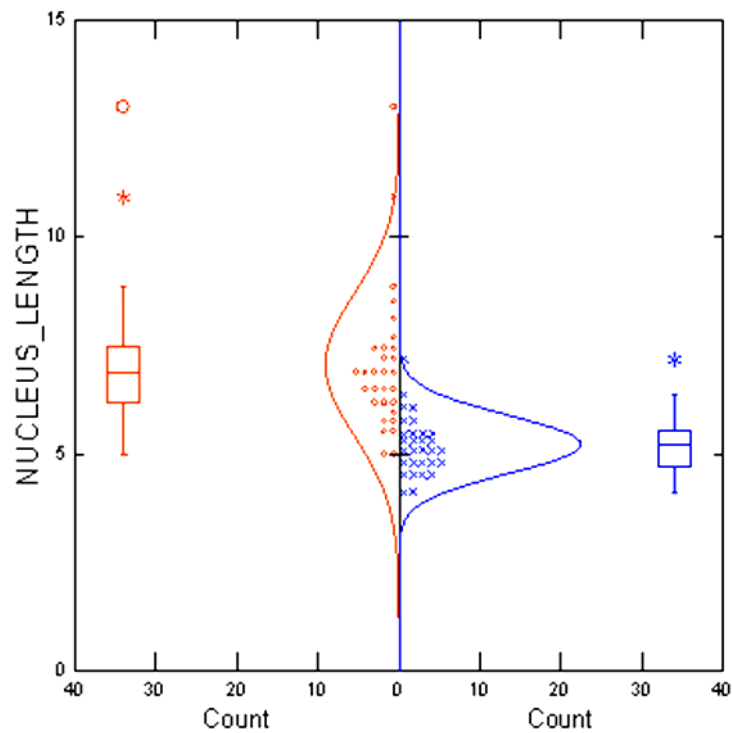


Figura 5. Comparação entre as médias do comprimento nuclear das hemácias parasitadas por *H. caimani* (o) e não parasitadas (x). P : 0.000; z : 5.685.

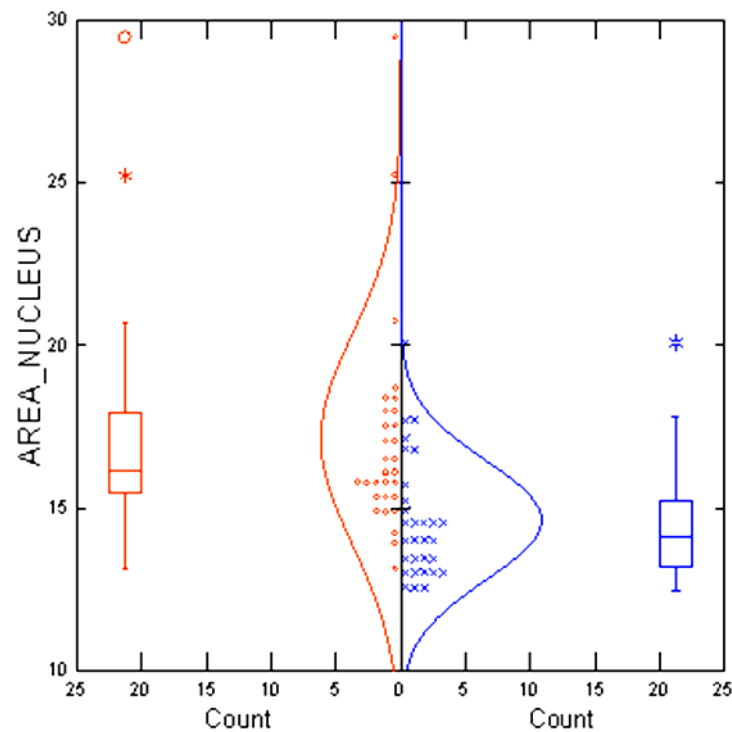


Figura 6. Comparação entre as médias da área nuclear das hemácias parasitadas por *H. caimani* (o) e não parasitadas (x). P : 0.000; z : 3.663.

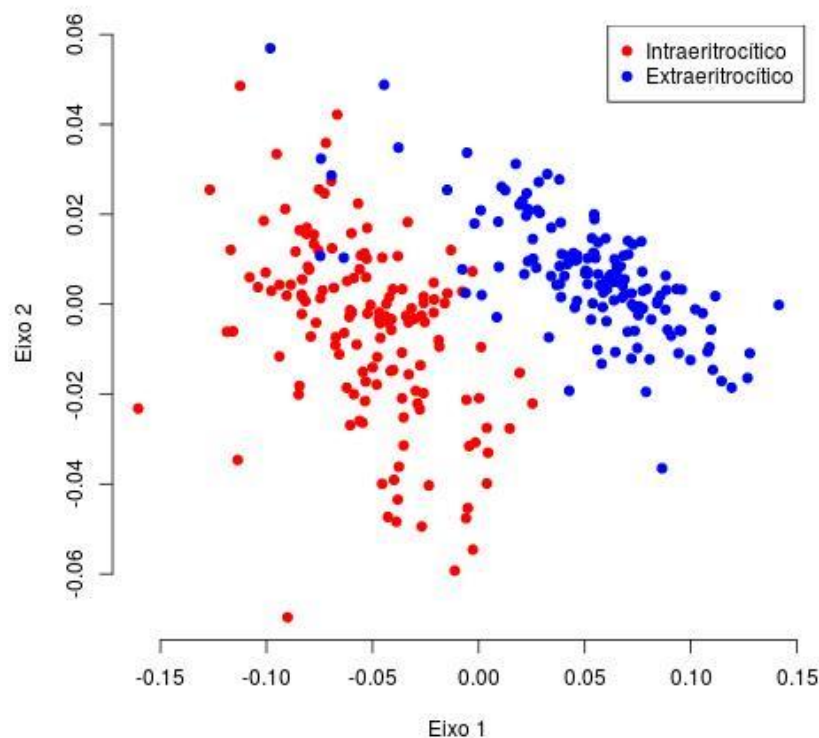


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) entre gametócitos intra e extraeritrocíticos de *H. caimani* em *C. yacare* naturalmente infectados.

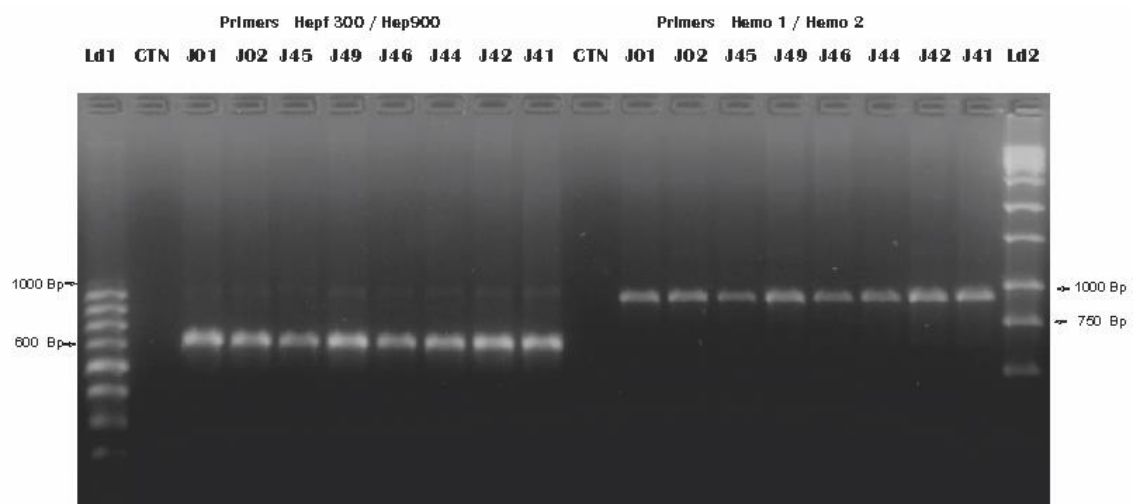


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose, 1,5 %, dos produtos da amplificação parcial, por PCR, do gene 18S rRNA de *Hepatozoon*, em sangue periférico de *C. yacare*. Poços: 1 e 20 (Ld1 e Ld2) aos marcadores moleculares, respectivamente 100 e 1Kbp; 2 e 11 (CTN) controles negativos; 3 a 10 amplificações realizadas com conjuntos de *primers* HepF300/Hep900, 11 a 19 amplificações com conjunto de *primers* Hemo1/Hemo2.

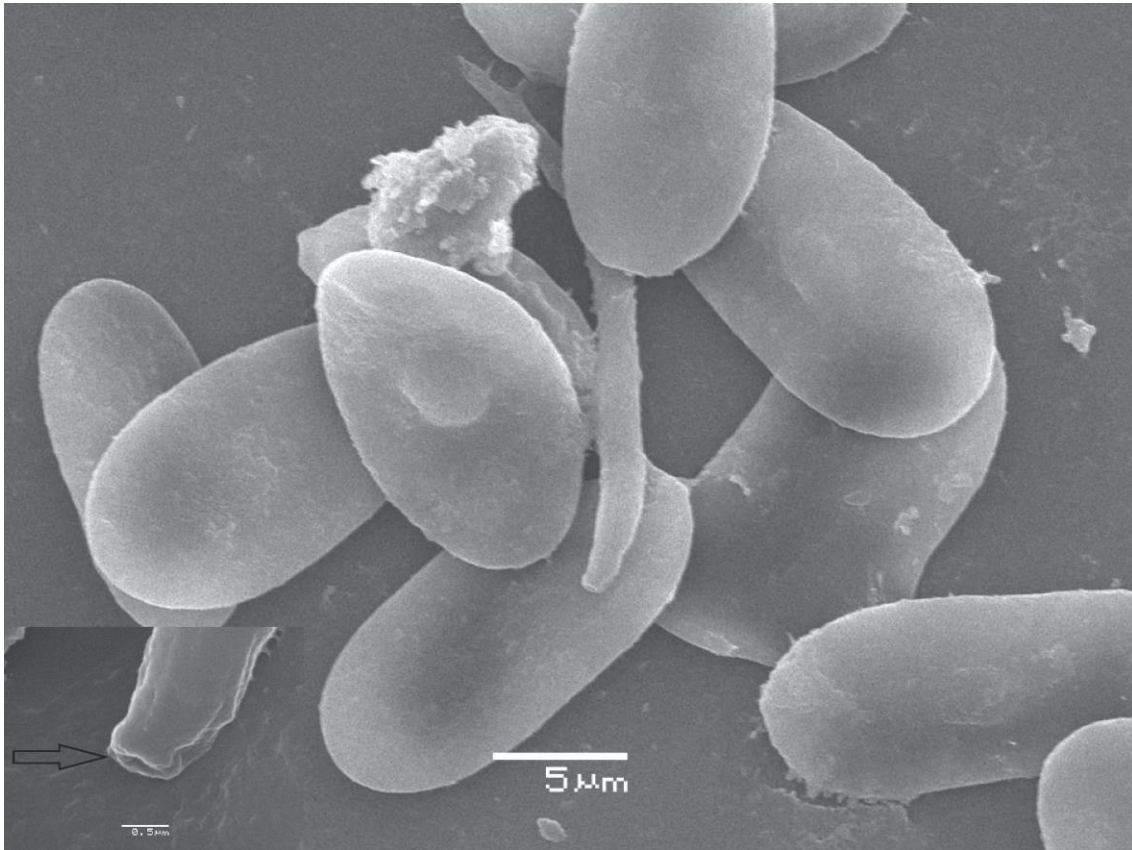


Figura 9. Microscopia eletrônica de varredura de gametócito extraeritrocítico de *H. caimani* com detalhe para anel apical (seta), diagnosticado em sangue periférico de *C. yacare*.

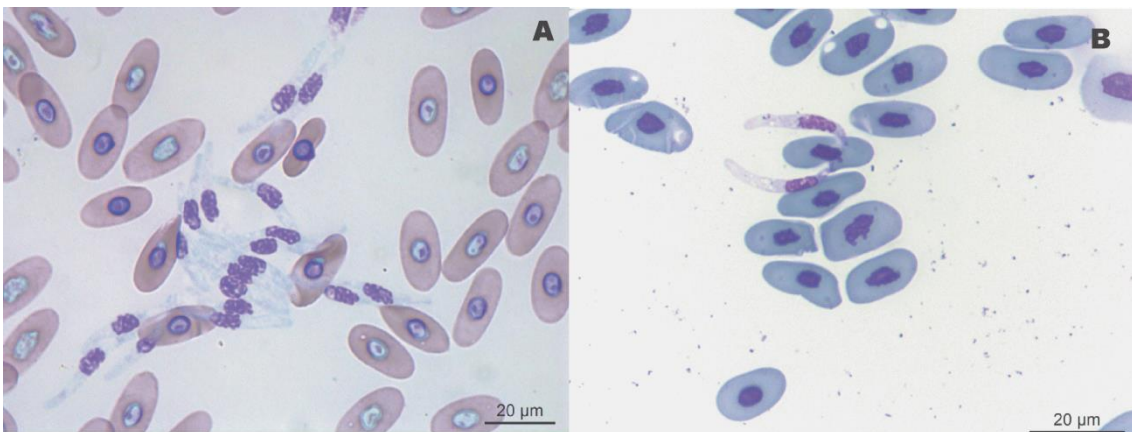


Figura 10. Gametócitos extraeritrocíticos, ou formas livres, de *H. caimani* observados em sangue periférico de *C. yacare*. Cromatina nuclear com variação na disposição, em relação ao citoplasma, podendo variar de mediana ao segundo quarto do corpo do gametócito. Comportamento agrupado de algumas formas (A) e parasitismo duplo com duas formas infectando o mesmo eritrócito (B).

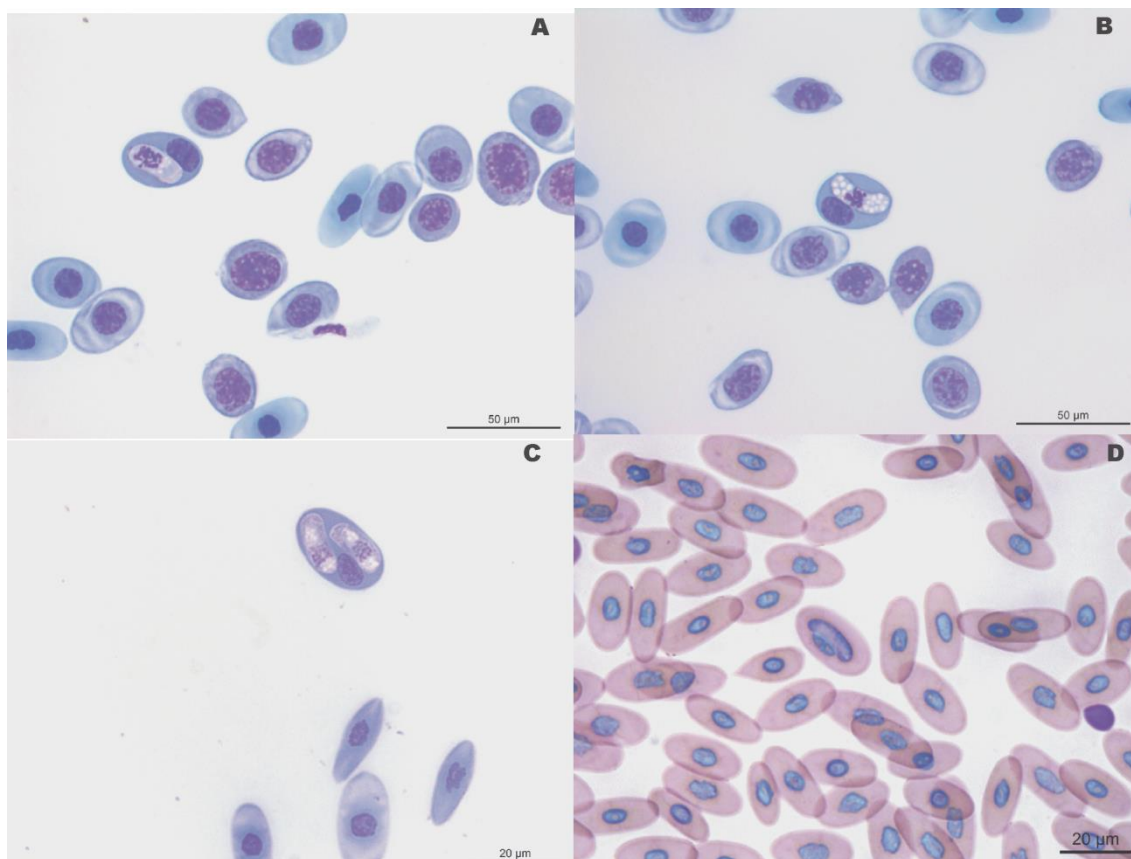


Figura 11. Gametócitos intraeritrocíticos de *H. caimani* observados em sangue periférico de *C. yacare*. Morfologia alongada, não recurvada, cromatina nuclear condensada e prolixa (A), citoplasma com eventuais vacúolos (B), presença de mais de um gametócito por célula, vacúolo parasitário eritrocítico (C) e formas encapsuladas (D).

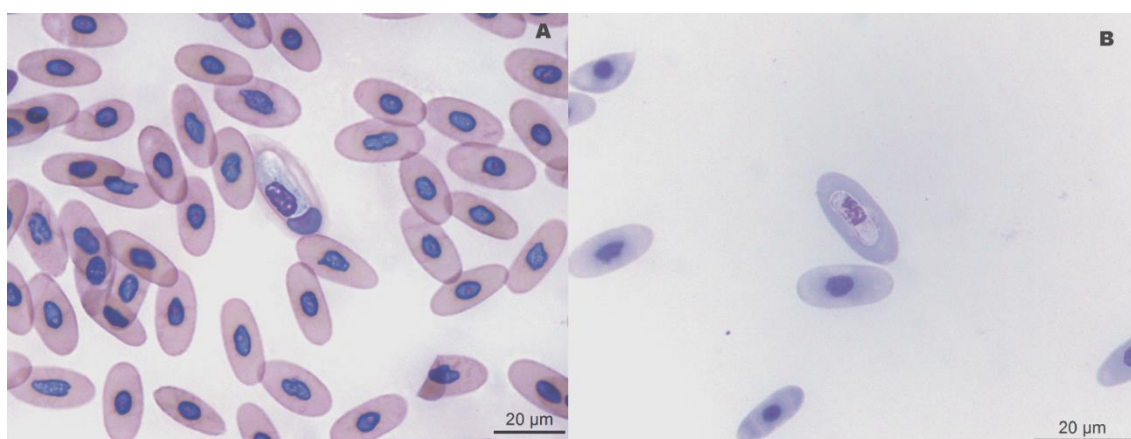


Figura 12. Alterações hipertróficas em células parasitadas por gametócitos intraeritrocíticos de *H. caimani* observados em sangue periférico de *C. yacare*. Deslocamento do núcleo celular para a extremidade (A) e ausência do mesmo (B).

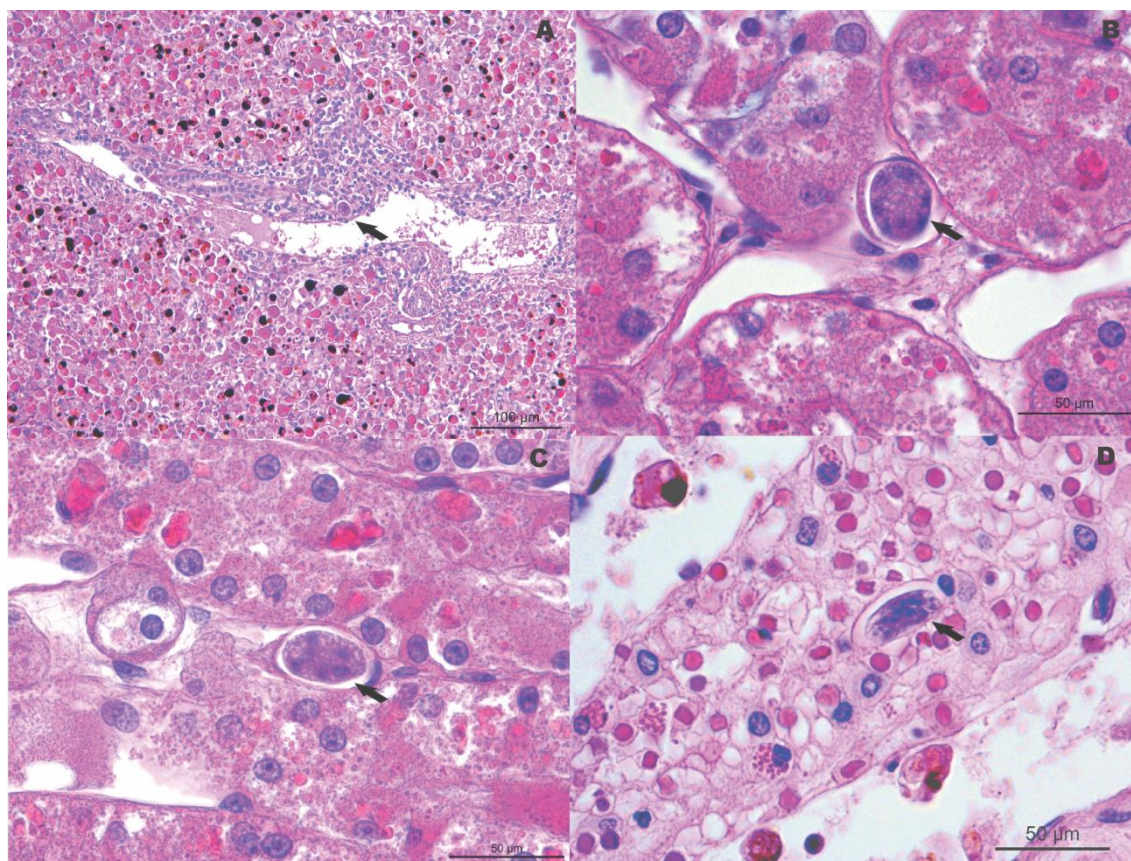


Figura 13. Cortes histológicos de *C. yacare*, corado com hematoxilina e eosina. Merontes (setas) entre ductos renais (B), em fígado (C e D) próximo aos vasos (A).

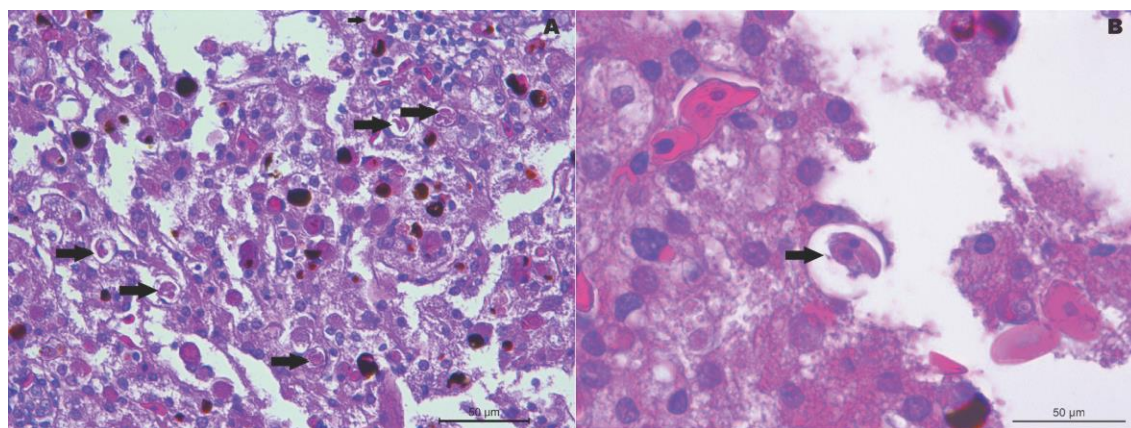


Figura 14. Cortes histológicos de pulmão de *C. yacare*, presença de cistos contendo cistozoítos (setas) no parênquima pulmonar (A e B). Coloração de hematoxilina e eosina.

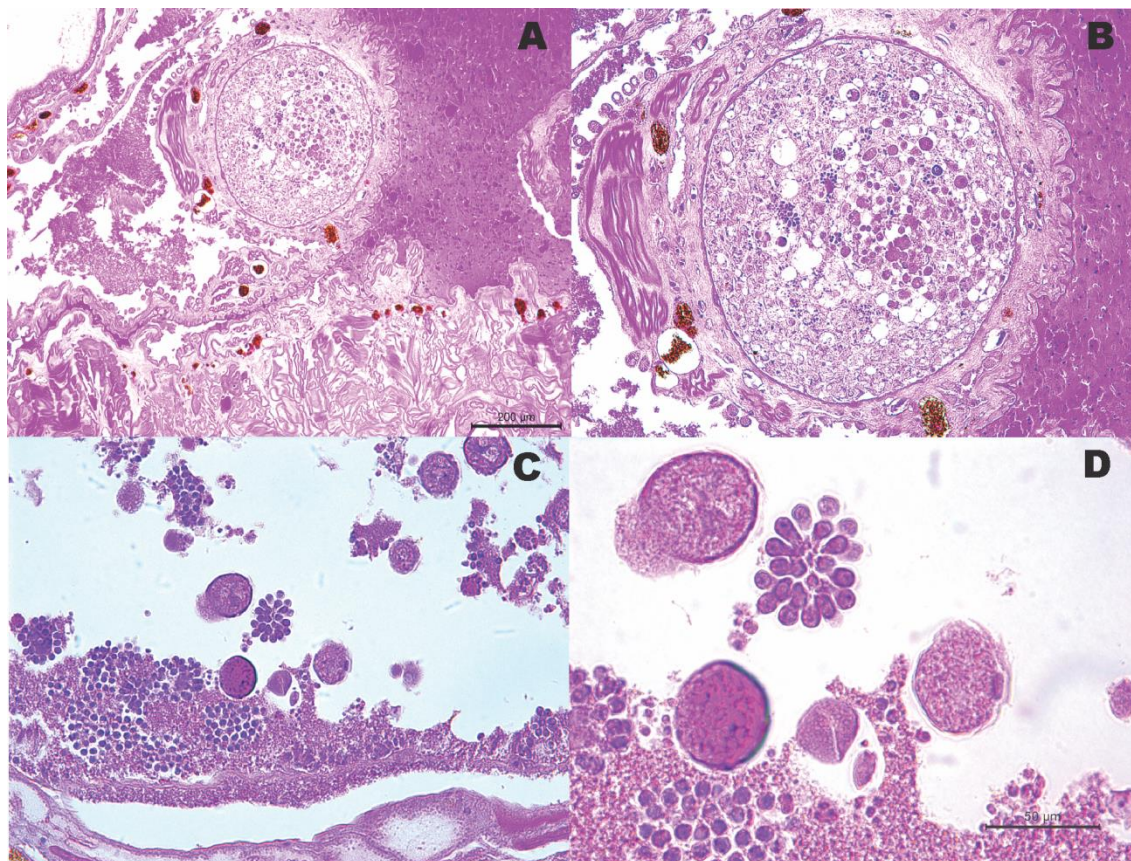


Figura 15. Oocisto contendo esporocistos e estruturas semelhantes a rosetas, presentes em *Placobdella ornata*. Coloração: hematoxilina e eosina (A, B, C e D).

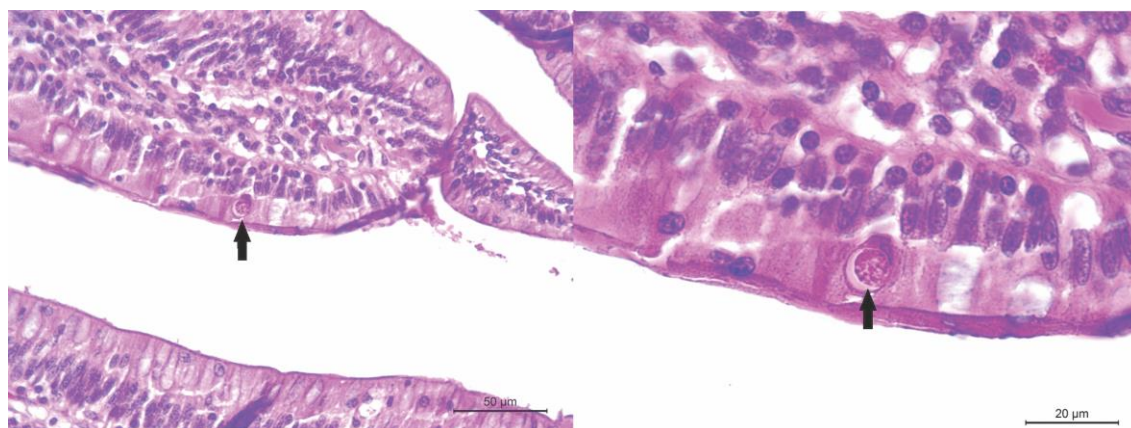


Figura 16. Macrogametócito jovem de coccídeo não identificado (seta), presente em célula epitelial do intestino delgado de *C. yacare*. Coloração: hematoxilina e eosina (A e B).

742 Anexo I

743
744 Alinhamento: primer HEMO1

746						
747						
748		5	15	25	35	45
749	MT-462_897	TRSKTKSRRT	WTCTAGSCAT	ATGCTGCTAT	AAATACAAGG	TGAATTCTTA
750	MT-462_897	GASKKKSSRT	WKCTAGSCAA	ATRCTGCTAC	TGTACAAGGT	AAATAATTTA
751	MT-462_897	GSKGGGCSGR	TTSKRGMCTT	TGCTGCTACT	GTAGAGGTGA	ATTCTTAGAT
752	MT-462_897	GASKKKSSKG	TTKSKRAKSC	TTATRCTGCT	ACTGTACAAG	GTAAATTCTT
753	MT-462_898	GASTKKSRKK	TWKSTRAGRC	AATGCTGCTA	TTGTACAGGG	TGAATTATTT
754	MT-462_898	AMGKKKSSRT	WTCTRGGCTT	ATGCTGCTAC	TGTACAAGGT	GAATTATTTA
755	MT-462_898	CWTTTCGKGAK	ACAAAATGCW	TGCTAATWAA	TACRGGCTAA	ATAATTTACC
756	MT-462_898	AAAMGKKSCG	KTWKSWRAGA	AAWATGCATG	CTATTGTACA	GKCTAAATAA
757						
758						
759		65	75	85	95	105
760	MT-462_897	AGACWCACTA	CTGCCAACGG	GTGGYGTGTA	CWAAGGGCAG	GGACCWAGTC
761	MT-462_897	CACACACTAC	TGCCAACGGG	TGGYGTGTAC	TAAGGGCAGG	GACGTAATCA
762	MT-462_897	CACACTACTG	CCAAAGGGTG	GGTGTGCTAA	GGGAGGGACG	TAGTCCACGC
763	MT-462_897	CAGACACACT	ACTGCCAACG	GGTGGTGTGT	GCTAAGGGCA	GGGACCTAGT
764	MT-462_898	CTGACTCACT	ACTGCCAACG	GGTGGTGTGT	ACWAAGGGCA	GGGACGTAAT
765	MT-462_898	GACTCACTAC	TGCCAACGGG	TGGTGTGTAC	WAAGGGCAGG	GACGTAATCA
766	MT-462_898	ATCACTACTG	CCAACGGGCG	GTGTGTACAA	TGTTCAAGGA	CCWAGAAAAC
767	MT-462_898	CACTCAATCG	GACTGCCWAC	GGGTGGTGTG	TACWAAGGGC	AGGGACGTAA
768						
769						
770		125	135	145	155	165
771	MT-462_897	GATGACTTGC	GCTTACTAGG	CATTCCTCGT	TAAAGATTAA	TAATTACAAT
772	MT-462_897	ATGACTTGCG	CTTACTAGGC	ATTCCTCGTT	AAAGATTAA	AATTACAATA
773	MT-462_897	CTTGCGCTTA	CTAGGCATTC	CTCGTTAAAG	ATTAATAATT	ACAATAATCT
774	MT-462_897	TGATGACTTG	CGCTTACTAG	GCATTCCTCG	TTAAAGATTA	ATAATTACAA
775	MT-462_898	TGATGACTTG	CGCTTACTAG	GCATTCCTCG	TTAAAGATTA	ATAATTACAA
776	MT-462_898	ATGACTTGCG	CTTACTAGGC	ATTCCTCGTT	AAAGATTAA	AATTACAATA
777	MT-462_898	TCTTGCGCTT	ACTAGGCATT	CCTCGTCWAA	GATTAATAAT	TACGATAATC
778	MT-462_898	CTGATGACTT	GCGCTTACTA	GGCATTCTCT	GTTAAAGATT	AATAATTACA
779						
780						
781		185	195	205	215	225
782	MT-462_897	CATCACAATG	CACATTCAAA	AGATTACCTA	AGCTTACCAG	CCAAGGYTAT
783	MT-462_897	ATCACAATGC	ACATTCAAAA	GATTACCTAA	GCTTACCAGC	CAAGGTTATA
784	MT-462_897	CAATGCACAT	TCAAAAGATT	ACCTAAGCTT	ACCAGCCAAG	GTTATAAACT
785	MT-462_897	CCATCACAAT	GCACATTCAA	AAGATTACCT	AAGCTTACCA	GCCAAGGTTA
786	MT-462_898	CCATCACAAT	GCACATTCAA	AAGATTACCT	AAGCTTACCA	GCCAAGGTTA
787	MT-462_898	ATCACAATGC	ACATTCAAAA	GATTACCTAA	GCTTACCAGC	CAAGGYTATA
788	MT-462_898	ACAATGCTTT	TTCAAAAGAT	TACCTAAGCT	TACCAGCCAA	GGCTATRAAC
789	MT-462_898	CCCATCACAA	TGCACATTCA	AAAGATTACC	TAAGCTTACC	AGCCAAGGTT
790						
791						
792		245	255	265	275	285
793	MT-462_897	GATGCATCAT	TGTTGCGCGC	GWGCMGCCCC	CAACATCTAA	GGGCMTCACA
794	MT-462_897	ATGCATCATT	GTTGCGCGCG	TGCMGSCCAG	AACATCTAAG	GGCMTCACAG
795	MT-462_897	ATCATTGTAG	CGCGCGTGCM	GSCCAGAACA	TCTAAGGGCA	TCACGGACCT
796	MT-462_897	GGATGCATCA	TTGTTGCGCG	CGTGCMGCCC	ACAACATCTA	AGGGCATCAC
797	MT-462_898	GGATGCATCA	TTGTTGCGCG	CGTGCMGCCC	AGAACATCTA	AGGGCATCAC
798	MT-462_898	ATGCATCAWT	GTAGCGCGCG	AGCMGSCCAG	AACATCTAAG	GGCMTCACAG
799	MT-462_898	CATCATTTGTA	GCKCGCRAGG	ATGACACAAC	ATCTAAGGGC	ATCACAGACC

799 MT-462_898 TGTYATTGCC

800	MT-462_898	TGGATGCATC	ATTGTAGCGC	GCGWGC MGCC	CAGAACATCT	AAGGGCATCA	CAGACCTGTY
801							
802							
803		305	315	325	335	345	355
804	MT-462_897	TGCCTCAAAC	TTCTTTCGCT	TAAACACGCA	AAGYCCTTCT	AAGAAGYAAT	TCAAAAACAA
805	MT-462_897	GCCTCAAAC	TCCTTTCGCT	AAACACGCAA	AGTCCTTCTA	AGAAGTAATT	TAAAAACAAA
806	MT-462_897	CGAACTTCCT	TGCGTTAAAC	ACGCAAAGTC	CTTCTAAGAA	GTAATTTAAA	AACAAATGTT
807	MT-462_897	TTGCCTCAAA	CTTCCTTGCG	TTAAACACGC	AAAGTCCTTC	TAAGAAGTAA	TTTAAAAACA
808	MT-462_898	TTGCCTCAAA	CTTCCTTGCG	TTAAACACGC	AAAGTCCTTC	TAAGAAGTAA	TTTAAAAACA
809	MT-462_898	GCCTCAAAC	TCCTTTCGCT	AAACACGCAA	AGTCCTTCTA	AGAAGYAATT	CAAAAACAAA
810	MT-462_898	TCAAAC	TTGCGTTAAA	CACGCAAAGY	CCTTCTAAGA	AGYAATTTAA	AAACAAATGT
811	MT-462_898	ATTGCCTCAA	ACTTCCTTGC	KWWWAACACG	CAAAGYCCTT	CTAAGAAGYA	ATTCAAAAAC
812							
813							
814		365	375	385	395	405	415
815	MT-462_897	ATGTGTTTTAA	CCCTATTTAG	CAGGCTAAGG	TCTCGCTCTG	TAACGGAATT	AACCAGACAA
816	MT-462_897	TGTTTTTTAAC	CCTATTTAGC	AGGTAAAGGT	CTCGCTCGTT	AACGGAATTA	ACCAGACAAA
817	MT-462_897	TTTAACCCCTA	TTTAGCGGGT	TAAGGTCTCG	CTCGTTAACG	GAATTAACCA	GACAAATCAC
818	MT-462_897	AATGTTTTTTA	ACCCTATTTA	GCAGGCTAAG	GTCTCGCTCG	TTAACGGAAT	TCACCAGACA
819	MT-462_898	AATGTTTTTTA	ACCCTATTTA	GCAGGCTAAG	GTCTCGCTCG	TTAACGGAAT	TAACCAGACA
820	MT-462_898	TGTTTTTTAAC	CCTATTTAGC	AGGCTAAGGT	CTCGTTTCGT	AACGGAATTC	ACCAGACWAA
821	MT-462_898	TTTTAACCCCT	ATTTAGCACG	CTAAGGTCTC	GCTCGGGAAC	GGAATTCACC	AGACWAATCA
822	MT-462_898	AAATGTGTTT	AACCCTATTT	AGCAGGCTWA	GGTCTCGTTC	GGKAACGGAA	TTCACCAGAC
823							
824							
825		425	435	445	455	465	475
826	MT-462_897	ATCACTCCAC	CAACTAAGAA	CGGCCATGCA	CCACCRCCCA	YAGAATTGAG	AWAGAGCTGT
827	MT-462_897	TCCTCCACC	AACTAAGAAC	GGCCATGCAC	CACCRCCCA	AGAATTRAGA	AAGAGCTGTC
828	MT-462_897	TCCACCAACT	AAGAACGGCC	ATGCACCACC	ACCCATAGAA	TTAAGAAAGA	GCTGTCAATC
829	MT-462_897	AATCACTCCA	CCAACTAAGA	ACGGCCATGC	ACCACRCCC	AYAGAATTAA	GAAAGAGCTG
830	MT-462_898	AATCACTCCA	CCAACTAAGA	ACGGCCATGC	ACCACRCCC	AYAGAATTRA	GAAAGAGCTG
831	MT-462_898	TCCTCCACC	AACTAAGAAC	GGCCATGCAC	CACCRCCCA	AGAATTRAGA	WAGAGCTGTC
832	MT-462_898	CTCCACCAAC	TAAGTACGGC	CAGKCACCAC	CACCMAYAGA	AGTRAGAAAG	AGCTGTCAAT
833	MT-462_898	AAATCACTCC	ACCRAC	TAAG	AACGGCCATG	CACCACRCC	CAYAGAAKTR
834							
835							
836		485	495	505	515	525	535
837	MT-462_897	CAATCTGTCA	ATCCTWTCTA	TGTCTGGACC	TGGCGAGTTT	TCACGTGTTG	AGTCAAATTA
838	MT-462_897	AATCTGTCAA	TCCTTTCTAT	GTYTGGACCT	GGCGAGTTTT	CACGTGTTGA	GTCAAATTAA
839	MT-462_897	TGTCKATCCT	TTMTATGTCT	GGACCTGGCG	AGTTTTCCCG	TGTTGGGTCA	TATTAAGCCG
840	MT-462_897	TCAATCTGTC	AATCCTTTCT	ATGTYTGGAC	CTGGCTTGTT	TTCCCGTGTT	GAGTCAAATT
841	MT-462_898	TCAATCTGTC	AATCCTTTCT	ATGTCTGGAC	CTGGCGAGTT	TTCCCGTGTT	GAGTCAAATT
842	MT-462_898	AATCTGTCAA	TCCTTTCTAT	GTCTGGACCT	GGCGAGTTTT	CCCGTGTTGA	GTCAAATTAA
843	MT-462_898	CTGTCAWTCC	AATCTATGTC	TGGACCTGGC	GAGTTTTCCC	GACTTGAGTC	AAATTAACGC
844	MT-462_898	GYCAATCTGT	CAATCCTTTC	TATGTCTGGA	CCTGGCGAGT	TTTCCCGTGT	TGAGTCAAAT
845							
846							
847		545	555	565	575	585	595
848	MT-462_897	AGCMAGGGAK	TYTGACGTGT	AACAGGYCTG	TGACGCTTCY	AGATAGTCTC	AGCCTCGCGC
849	MT-462_897	GCAGGAGAGC	TTGAGGCGWG	TGGTGCCCTT	CCGTCAATTC	YTGATGGTCT	GGGCCTKMCG
850	MT-462_897	GGGGCTCTTG	GGCGTGGTGA	CRGCCCTTCC	GTCAC	TTTCT	GGCCTCGCGC
851	MT-462_897	AAGCCGGGGA	AGTTTGGCGY	GGTGRCGCGC	TTCCGTCGCT	CCTTTATAGT	CTGGGCTTKG
852	MT-462_898	AAGCCGGGGG	AGCTTGGGCG	CGGTGACRGC	CCCTGTGTCA	CTTTYAGAAA	GTCTGGGCCT
853	MT-462_898	GCCGCAGACG	CYTGACGYGG	TGGTGCGYCT	CCCTCGCCCT	YAGTAGGTC	GGGCTGCGCG
854	MT-462_898	CAGAGAGCY	GGCGTGWTGA	CACCCCTGTG	ACGMTCCYAG	AAAGTCTGGG	CTGYGCGMGC
855	MT-462_898	TAAGCCGCAG	GCGCTTGRCG	TAATRACACG	YCTGTGACGC	TCTYAGAAGG	TCTGGGCCGC
856							
857							

858		605	615	625	635	645	655
859	MT-462_897	CCRTWCTCMT	SCTGSATCCC	ACAGAYTTTA	TATTCCTGGC	WGGTGMGCKA	AGGRGWMTC
860	MT-462_897	CGCRTWCCCA	CGATGGAACC	CAAAGAYTTT	WTATTCCTTG	GCTGGKACGC	TWAGGAGWAT
861	MT-462_897	CRTMCTCMTG	CTGCATCCCA	AMAAGTTTWT	ATTTCTTCGG	MTGGTAMGGA	AGGRKWATCT
862	MT-462_897	CGAGCRTMAT	CCCCCTGGAA	CCCAAAAAYT	TTKTATTCTT	GGMTGGTGCG	CTAGGGTWAT
863	MT-462_898	CGCGCCCRW	CTCCCCCTGC	AACCCAAAGA	YTTTKTATTC	TTGGCWGGTG	CGGAAGGGGT
864	MT-462_898	CCRCACYCC	CTGCTGCATC	CCAAAGACTT	TGATTCCTTG	GCTGGTGCGC	TWGGGGWATC
865	MT-462_898	RTWCTCMTSA	TRGATCCCAA	CAGACTTATA	ACCTTGGCAG	GGAAGCTTAG	GAGWCKCTTT
866	MT-462_898	GCGCSCRTWC	YCMTSCTGSA	TCCCAMAAGT	TTATATTYTT	GGMTGGTGMG	CTTAGGRKWA
867							
868							
869		665	675	685	695	705	715
870	MT-462_897	TTWTGAAGGC	GCCTTGYPAT	CKSKATAGRK	YATAGTWAWT	AGTTAATCTT	TAACGRGTAT
871	MT-462_897	CTTTATGAAG	ACRCCTTCYA	ATGKGGAGWG	GKYATWGTWA	WTAGTAAAGC	TTACACGRGG
872	MT-462_897	TTATAAAGAC	GAMTTGYGAT	CKCKATSGAG	CATAGTTATT	AGTTAAKCTT	TACACGRGGT
873	MT-462_897	CTTTATGAAT	RCGCCTTGYG	ATCTSTAGTM	GGKYATWGTW	AATAGTAAAG	AYTTCACGGG
874	MT-462_898	CTCTTTATGA	AGGCGCCTTG	YGATCKSKAG	WGGKYATWGK	TAATTAGTTA	ATCTTTAAAC
875	MT-462_898	TTTTGAATRC	GAMTTGYGAT	GTSTATAGAK	YATWGTWATA	GTTAAGATTA	CACGRGTATY
876	MT-462_898	ATGAAGACGA	CCTGYGATCK	GKAGAGAKYA	TWGTWATTAG	TTAATCTTAC	RMGRGGTATC
877	MT-462_898	TCTTTATGAA	TGYGACTTGY	GATSKSKAGT	CGAKYATWGT	TAATAGTTAA	KCTTTACACG
878							
879							
880		725	735	745	755	765	775
881	MT-462_897	CYSATCGTAT	GCGATCSYCA	TACCTYTCGY	KCTGGATTAC	RTSMCWRCMY	CTTTGKRCAC
882	MT-462_897	WATCKCCTCG	TMTGCGCWCC	CCAACCTCTY	GYGCTGAATT	CRTGAMWRCM	YCTTGTRCAC
883	MT-462_897	ATCGCSMTCG	TATGCGMWCG	YCTCMGCTYG	YKCTTGAWTT	CRTSMCMACC	YCTTTGKRCA
884	MT-462_897	TAAYGCMTCG	TMWGCGMAWM	GYCATCMTCT	YGCKCTGGAT	TACGTGMACR	CYCTTTGKRC
885	MT-462_898	GGGTAAACKCC	TCGTMTGCGC	WCGCCAWCMT	CTYGCKCTKA	WTACATSMMM	TRCMYCTTTG
886	MT-462_898	GCATCGTMWG	CGCWCGYCW	CCGCTYGYKY	TGATTACRTS	MCAACMYCTT	TGKACACAYS
887	MT-462_898	GCMTTCGTATG	CGCWCSYCAT	CMGCTYGYKY	TGATTACGTG	CAMWGCCTCT	TTGTAAMACC
888	MT-462_898	RGKAACKSMT	MGTMTGCGMT	MSYCATCAK	CTYGYKYTGA	ATACRTGMMA	WGCMTCTTGT
889							
890							
891		785	795	805	815	825	835
892	MT-462_897	ACCSTCYCGC	AGCTCCTWCT	SATTGASWGA	TCTGGKAAAT	TATCTCGACW	GWRTTTAATA
893	MT-462_897	ACCGTCYCGC	GCTCCTACSK	ATTGASWRAT	CTRAGAAATT	MATCTAGACW	GWRTTTAATA
894	MT-462_897	CACCKYYCC	GYCGCTSCTW	CTSWTTGASW	GATCTGRGAA	WTTCACTAG	RCWGWRTTTA
895	MT-462_897	AMAYSCKCCC	GYMGCTSCYT	WCTSATTGAS	WRATCTGRGA	AWTTCATCTC	GACWGKWTWA
896	MT-462_898	KACACACCGC	YCGCGCWST	WCTSWTTGAS	WRATCTRRKA	AWTTCATCTC	GACWGKATTW
897	MT-462_898	CGYYCGTAGC	TSCTWCYCAT	TGAGWGATCT	RRGAAWTTCA	YCYASKACWG	RRWTWATAGC
898	MT-462_898	GYYCGTAGCT	SCTASTGTTG	ASWRATCARG	TAATTCACT	MGRMCRGWTT	ATASCAGTRC
899	MT-462_898	ACAMATSCKY	CCGYAGCWGC	TTASTSATTR	ASWGATCTAR	GTAAWTCAYY	TACKAMWGRT
900							
901							
902		845	855	865	875	885	895
903	MT-462_897	GCAGTGCIYC	GCATCWGMTM	CTGWAAGTCT	GAGATCTCTY	TYMCCWCAGM	ARRARAAAG.
904	MT-462_897	CAAGTRCTCG	YATCWGCYMY	WGWMAGTCTR	AGATCGCTCT	CTMYCIYAKC	CSGAGGAGAG
905	MT-462_897	TAGCAGTRCT	CSYAYAGCTC	TAKMAGTCTA	GTRAWCKTCT	MTTCACTCAA	RGAGAGAAGA
906	MT-462_897	TARCAAGTRC	TYGYAWCWGC	YCTARTMAGT	ATRWRAACTC	TTYTTMTMTA	KMAGAGAAAA
907	MT-462_898	AATAGCAAGT	RYICYAYWGC	TMTAGWMAGT	CTGTGATGAT	CTCTCWCTCY	ACAAGGAAGG
908	MT-462_898	AAGTRCYCST	ATCWGCMYMT	AGTAAGTCAT	RWGAAYGCTC	YTTYWCATAT	AAAARAGAAG
909	MT-462_898	TCSTAYTAGC	WCTAKMAGYA	TARTGAWCGT	TCWTCAMTCA	AGAKRAGAGG	GAGWAGRATT
910	MT-462_898	ATAATASCAG	TACYYCSTAT	YAGCATCATA	KCAAGTCWTA	RWGTACTTCT	WATCATCAGT
911							
912				..			
913		905	915				
914	MT-462_897			..			
915	MT-462_897			..			

916 MT-462_897 GAGRGRTTTC
917 MT-462_897 ARGGAARAGA TCTG..... ..
918 MT-462_898 GAGGGGAGAR
919 MT-462_898 GGAGRAGGTT T..... ..
920 MT-462_898 T..... ..
921 MT-462_898 ATRARGACTT GGAAGAGATC TG

922
923
924 Alinhamento: primer HEMO2
925

						
	5	15	25	35	45	55
928 MT-462_897	CKKCRRTWKS	TRGKMCTTTG	CATGCTACTG	TCCGAGGTGA	ATTCTTTAGA	TTTATCAAAG
929 MT-462_897	GKKYRRKTTG	SGTRGGCTAA	TGCATGCTAC	TGTCCGAGGT	GAATTCTTTA	GATTTGTCAA
930 MT-462_897	AYSSYSCSRW	KTGSGGAGGC	TAATGCTGCT	ACTGTCCGAG	GTGAAATTCT	TAGATTTGTT
931 MT-462_898	AAARGGKSSR	RTWKSTGGKS	CTTATGCTGC	TACTGTACAG	KGTAATTCT	TTAGATGGAT
932 MT-462_898	GKKKKSWRTT	KSKRAKRCTT	ATGCTGCTAT	TGTACGGGGT	GAATTCTTTA	GATGTATCAC
933 MT-462_898	TKKKKRRRTT	TCKRAGRCTA	ATGCATGCTA	CTGTCCGAGG	TGAATTCTTT	AGATTTATCA
934 MT-462_898	ASKKKGCCKW	TWTCTKAKSA	AATGCWTGCT	ATTGATACAG	KCTAAATTAT	TTAGCGGATC
935 MT-462_898	CGSYKTCAAT	TTTCMGAGAA	AAATGCWTGC	TAATAAGTMC	GGKSTGAAAT	TATTTACCGG
936						
937						
938	65	75	85	95	105	115
939 MT-462_897	ACTCACTACT	GCCAACGGGT	GGTGTGTGCT	AAGGGCAGGG	ACCTAGTCAA	CGCAAGCTGA
940 MT-462_897	AGACTCACTA	CTGCCAACGG	GTGGYGTGTA	CTAAGTTCAG	GGACCTAGTA	CACGCAAGCT
941 MT-462_897	AAAGACWCAC	TACTGCCAAA	GGGYGGKGTG	TGCTAAGGGC	AGGGACGTAA	TCAACGCAAG
942 MT-462_898	CAAAGACACA	CTACTGCCGG	GCGGTGGTGT	GTGCWAAGGG	CAGGGACCWA	GTCAACGCAA
943 MT-462_898	AGACTCACTA	CTGCCAACGG	GTGGTGTGTG	CTAAGGGCAG	GGACCTAGTC	AACGCAAGCT
944 MT-462_898	AAGACTCACT	ACTGCCAACG	GGTGGYGTGT	ACTAAGGGCA	GGGACCTAGT	CAACGCAAGC
945 MT-462_898	ACTCAAWCGG	TACTTGCGAC	GGGYGGTGTG	TACWAAGGGC	AGGGACGTAA	TCMACGCAAG
946 MT-462_898	ATCACTCAAT	CGGTACTRGC	GACGGGCGGY	GTGTRCWAAG	GGCAGGGACG	WAATCMACGC
947						
948						
949	125	135	145	155	165	175
950 MT-462_897	TGACTTGCGC	TTACTAGGCA	TTCCTCGTTA	AAGATTAATA	ATTACAATAA	TCTATCCCCA
951 MT-462_897	GATGACTTGC	GCTTACTAGG	CATTCCTCGT	TAAAGATTAA	TAATTACAAT	AATCTATCCC
952 MT-462_897	CTGATGACTT	GCGCTTACTA	GGCATTTCGT	GTTAAAGATT	AATAATTACM	ATAATCTATC
953 MT-462_898	GCTGATGACT	TGCGCTTACT	AGGCATTCCCT	CGTTAAAGAT	TAATAATTAC	AATAATCTAT
954 MT-462_898	GATGACTTGC	GCTTACTAGG	CATTCCTCGT	TAAAGATTAA	TAATTACAAT	AATCTATCCC
955 MT-462_898	TGATGACTTG	CGCTTACTAG	GCATTCCCTCG	TTAAAGATT	ATAATTACAA	TAATCTATCC
956 MT-462_898	CTGATGACTT	GCGCTTACTA	GGCATTCCCTC	GTTAAAGATT	AATAATTACA	ATAATCTATC
957 MT-462_898	AAGCTGATGA	CTTGCGCTTA	CTAGGCATTC	CTCGTTAAAG	ATTAATAATT	ACAATAATCT
958						
959						
960	185	195	205	215	225	235
961 MT-462_897	TCGCAATGCA	CATTCAAAAAG	ATTACCTAAG	CTTACCAGCC	AAGGTTATAA	ACTTGTTGGA
962 MT-462_897	CATCGCAATG	CACATTCAAA	AGATTACCTA	AGCTTACCAG	CCAAGGYTAT	AAACTTGTTG
963 MT-462_897	CCCATCACAA	TGCACATTCA	AAAGATTACC	TAAGCTTACC	AGCCAAGGTT	ATAAACTTGT
964 MT-462_898	CCCCATCACA	ATGCACATTC	AAAAGATTAC	CTAAGCTTAC	CAGCGAAGGT	TATAAACTTG
965 MT-462_898	CATCACAAATG	CACATTCAAA	AGATTACCTA	AGCTTACCAG	CCAAGGYTAT	AAACTTGTTG
966 MT-462_898	CCATCACAAAT	GCACATTCAA	AAGATTACCT	AAGCTTACCA	GCCAAGGTTA	TAAACTTGTT
967 MT-462_898	CCCATCACAA	TGCACATTCA	AAAGATTACC	TAAGCTTACC	AGCCAAGGTT	ATGAACTTGT
968 MT-462_898	ATCCCCATCA	CAATGCACAT	TCAAAAAGATT	ACCTAAGCTT	ACCAGCCAAG	GTTATRAACT
969						
970						
971	245	255	265	275	285	295
972 MT-462_897	TGCATCATTG	TAGCGCGCGT	GCAGCCCAGA	ACATCTAAGG	GCATCACAGA	CCTGTYATTG
973 MT-462_897	GATGCATCAT	TGTTGCGCGC	GWGGMGGCCA	GAACATCTAA	GGGCATCACA	GACCTGTYAT

974	MT-462_897	TGGATGCATC	ATTGTAGCGC	GCGTGCMGCC	CAGAACATCT	AAGGGCATCA	CAGACCTGTY
975	MT-462_898	TTGGATGCAT	CATTGTAGCG	CGCGTGCAGC	CCAGAACATC	TAAGGGCATC	ACAGACCTGT
976	MT-462_898	GATGCATCAT	TGTTGCGCGC	GWGCMGSCCA	CAACATCTAA	GGGCATCACA	GACCTGTYAT
977	MT-462_898	GGATGCATCA	TTGTAGCGCG	CGWGCMGGCC	AGAACATCTA	AGGGCATCAC	AGACCTGTYA
978	MT-462_898	TGGATGCRTC	AWTGTTGCGC	GCGTGCMGSC	CASAACATCT	AAGGGCATCA	CAGACCTGTY
979	MT-462_898	TGTTGGATGC	ATCATTGTWG	CGCGCGWGCM	GSCCAGAACA	TCTAAGGGCA	TCACAGACCT
980							
981							
982		305	315	325	335	345	355
983	MT-462_897	CCTCAAACCT	CCTTGCGTTA	AACACGCAAA	GTCTTCTTAA	GAAGTAATTT	AAAAACAAAT
984	MT-462_897	TGCCTCAAAC	TTCTTTCGCT	TAAACACGCA	AAGTCCTTCT	AAGAAGTAAT	TTAAAAACAA
985	MT-462_897	ATTGCCTCAA	ACTTCCTTGC	GTTAAACACG	CAAAGTCCTT	CTAAGAAGTA	ATTTAAAAAC
986	MT-462_898	YATTGCCTCA	AACTTCCTTG	CGTTAAACAC	GCAAAGTCCT	TCTAAGAAGT	AATTTAAAAA
987	MT-462_898	GGCCTCAAAC	TTCTTTCGCT	TAAACACGCA	AAGTCCTTCT	AAGAAGYAAT	TCAAAAAACAA
988	MT-462_898	TTGCCTCAAA	CTTCCTTTCG	TAAACACGCG	AAAGTCCTTC	TAAGAAGTAA	TTTAAAAACA
989	MT-462_898	ATTGCCTCAA	ACTTCCTTGC	GTWAAACACG	CAAAGYCCTT	CTAAGAAGYA	ATTTAAAAAC
990	MT-462_898	GTYATTGCCT	CAAACCTTCT	TGCGTTAAAC	ACGCAAAGYC	CTTCTAAGAA	GYAATTYAAA
991							
992							
993		365	375	385	395	405	415
994	MT-462_897	GTTTTTAACC	CTATTTAGAA	GGCTAAGGTC	TCGYTCGKTA	ACGGAATTCA	CCAGACAAAT
995	MT-462_897	ATGTTTTTAA	CCCTATTTAG	CAGGCTAAGG	TCTCGTTCGT	TAACGGAATT	CACCAGACAA
996	MT-462_897	AAATGTTTTT	AACCCTATTT	AGCAGGCTAA	GGTCTCGTTC	GGTAACGGAA	TTAACCAGAC
997	MT-462_898	CAAATGTTTT	TAACCCTATT	TAGCAGGCTA	AGGTCTCGTT	CGTTAACGGA	ATTCACCAGA
998	MT-462_898	ATGTGTTTTA	CCCTATTTAG	CAGGCTAAGG	TCTCGTTCGT	TAACGGAATT	CACCAGACAA
999	MT-462_898	AATGTTTTTT	ACCCTATTTA	GCAGGCTAAG	GTCTCGCTCG	TTAACGGAAT	TAACCAGACA
000	MT-462_898	TAATGTTTTT	AACCCTATTT	AGCAGGCTAA	GGTCTCGYTC	GGGAACGGAA	TTAACCAGAC
001	MT-462_898	AACAAATGTT	TTTAACCCTA	TTTAGCAGGC	TAAGGTCTCG	TTCGKKAACG	GGATTMACCA
002							
003							
004		425	435	445	455	465	475
005	MT-462_897	CACTCCACCA	ACTAAGAACG	GCCATGCACC	ACCRCCCAYA	GAATTGAGAA	AGAGCTGTCA
006	MT-462_897	ATCACTCCAC	CAACTAAGAA	CGGCCGTKCA	CCACCACCCA	YAGAATTRAG	AAAGAGCTGT
007	MT-462_897	AAATCACTCC	ACCAACTAAG	AACGGCCATG	CACCACCRCC	CAYAGAATTA	AGAWAGAGCT
008	MT-462_898	CAAATCACTC	CACCAACTAA	GAACGGCCRT	KCACCACCAC	CCAYAGAAKT	RAGCAAGAGC
009	MT-462_898	ATCACTCCAC	CAACTAAGAA	CGGCCATKCA	CCACCRCCCA	YAGAATTRAG	AWAGAGCTGT
010	MT-462_898	AATCACTCCA	CCAACTAAGA	ACGGCCAGKC	ACCACCACCC	AYAGAATTAA	GAAAGAGCTG
011	MT-462_898	AAATCACTCC	ACCAACTAAG	AACGGCCATG	CACCACCRCC	CAYAGAATTR	AGAAAGAGCT
012	MT-462_898	GACAAATCAC	TCCRCCAAC	AAGAACGGCC	ATGCACCACC	RCYMAYAGAA	TTRAGAWAGA
013							
014							
015		485	495	505	515	525	535
016	MT-462_897	ATCTGTCAAT	CCTATCTATG	TYTGGACCTG	GCGTGTTTTT	CCGTCTTGAG	TCAAATTAAG
017	MT-462_897	CAATCTGTCA	ATCCTTTCTA	TGTYTGGACC	TGGYGAGTTT	TCACGTGTTG	AGTCAAATTA
018	MT-462_897	GTCAATCTGT	CAATCCTTTC	TATGTYTGGA	CCTGGCTAGT	TTTCCCGGAC	TTGAGTCAAA
019	MT-462_898	TGTCAATCTG	TCAATCCTTT	CTATGTCTGG	ACCTGGCGAG	TTTTCCCGGA	CTTGGGTCAA
020	MT-462_898	CAATCTGTCA	ATCCTWTCTA	TGTCTGGACC	TGGCGAGTTT	AGAAGGACTT	GAGTCAAATT
021	MT-462_898	TCAATCTGTC	AATCCTWTCT	ATGTCTGGAC	CTGGYGAGTT	TTCCCGTGTT	GAGTCAAATT
022	MT-462_898	GTCAATCTGT	CAWTCCTTTC	TATGTTTGGA	ACTGGCGAGT	TTTCACGTGT	TGAGTCAAAT
023	MT-462_898	GCTGYCAATC	TGTCWATCCT	TTCTATGTCT	GGACCTGGYG	AGTTTTCCCG	TGTTGAGTCA
024							
025							
026		545	555	565	575	585	595
027	MT-462_897	CCGGAGAGCY	MGAGCWGGTG	GKGCCCTGCC	GTCAATTCCA	GATGGTTTGG	GCCTKMCGAC
028	MT-462_897	ACGCCGGAGA	CGCTTGACGT	GGTGGKGCY	CTGTGATGCT	TCCTTATGTT	TTGGGCCTCM
029	MT-462_897	TTAAGCCGGA	GAAGCYTGAC	GCAATAACAG	CCCCCTCCGTC	AWTTCYTTAT	GGTCTGGGCT
030	MT-462_898	ATTAAGCCGC	GGACGCTTGA	CGTGGTGKG	CCCTTCCGTC	AWTTCCTGAT	AGTCTGGGCT
031	MT-462_898	AAGCCGCAGG	AGCYAGGCGC	AATAACAGCG	YCTGTGACGC	CCTYAGATAG	TCTCAGCTTC

032	MT-462_898	AAGCCGGAGA	AGTTTGACGC	AATRGGKGCC	CTTCCGTCGC	CCTCYTGAAA	GTCTGGGCTG
033	MT-462_898	TAAGCCGGGG	AYTTTGACGW	GTRGCAGCCT	TCCGACACTT	CTTGAAAGTT	TGAGCCGKGC
034	MT-462_898	AATTAAGCCG	GAGRCGCTTG	ACGTAATGAC	AGGYTTCCGT	CGCCCCWGA	TAGTCTGGGC
035							
036							
037		605	615	625	635	645	655
038	MT-462_897	CRTWAYCMTG	CTGGAACCCA	AAAATTTTKW	ATCCTTGGCT	GGTGCTGAAG	GRGWATCTTT
039	MT-462_897	CGACCRTWCT	CACGCTRCAA	CCCAAAGACT	TTWTAATCCT	TGGCTGGTAS	TGAAGGGKWA
040	MT-462_897	GKRCGCCCRT	WCCCCCSCTG	RAACCCAAAG	AYTTTATAAC	TTTCGCTGGG	AAGCTTAGGA
041	MT-462_898	YGCGCCCCWC	WCTCCCCCTG	GAACCCAAAG	AYTTTWTATT	TCTTGGCTGG	TGCGKWWGGG
042	MT-462_898	GCGCCRCRCW	YCMCSCYGCA	TCCCACAGAC	TTTATAACYC	TGGCWGGTRM	GCTTAGGRKW
043	MT-462_898	KMCGCCWCW	CCCMTCCYRG	AACCCAAMAG	AYTTTATATT	CCTTGGCTGG	TGCTGWKGGG
044	MT-462_898	GCCRCYWC	CTCAMGCAAC	CCAAAGGYTT	TTATTCCTSG	GMTGGTGMGG	AAGGGTWATC
045	MT-462_898	TTCGCGGCR	TACCCMCSCY	GSAACCCAAA	GATTTATAAT	CCTSGKARGG	KGCGGAAGGR
046							
047							
048		665	675	685	695	705	715
049	MT-462_897	TTGAATGYGA	CTTGYGATCK	GKAGWGAKYA	TAGTTAATAG	TAAATCTTTA	ACGRGGAATC
050	MT-462_897	TCTTTTGAAG	MCGCCTTGYG	ATCKCKAGWG	RGYATWGTWA	WTAGTTAATC	TTTAACGGGT
051	MT-462_897	GWATCTTTAT	GAAGGCGACT	TTGYGATCTC	KATAGGKTAT	WGTTAATTAK	TTAATCTTTC
052	MT-462_898	TWATCTTTAT	GAATACGAMT	TCYGATCKGK	AGWGAKTATT	GTTATTAGTA	AATCTTACAC
053	MT-462_898	MTCTTTTTGA	AKRCGCCTTG	YGATCKCKAG	AGRKYATWGT	WAATATTAAT	CTTACACGGG
054	MT-462_898	TWATCTTTAT	GAAGGCGACT	TGYGATCKCT	AGYCGAKYAT	WGTTAATAGT	AAAGACTAAA
055	MT-462_898	TTTATGAAGA	CGCCTTCYGA	TCTSGATWGA	TTATWGGTAA	TTAGTTAATC	TTTCAMGGGK
056	MT-462_898	KWMKCTTTTG	AAGGCGACCT	CTGATCKCKA	TAGATTATTG	TAATTAGTAA	AGCTTTCACS
057							
058							
059		725	735	745	755	765	775
060	MT-462_897	KCATCGTAWG	CGAWCGYCAT	MAGCTYGC GC	TGAATACRTC	AATRCYCTTT	GGCACACSST
061	MT-462_897	ATCYCATCGT	AWGCGCWCCC	CATCACGCTY	GYKTGAATA	CATSCCTRCM	YCTTTGKRCA
062	MT-462_897	ACGGGTAAAYG	SATCGTMWGC	GCWCGYCAWC	MTYTTYGCKC	TTGAATTACA	TSMCCACYCT
063	MT-462_898	GGGTATCYGA	TCGTMTGCGC	WCGCCATCAG	YTYGYGCTGA	ATACRTCMAA	ACMYCTTTTG
064	MT-462_898	TAACKCCTCG	TATGCGCTCG	CCATMAGCTC	GYKCTGATTA	CGTSAMACMY	CTTGTGCACA
065	MT-462_898	CGGGTAAAYG	CTCGTMWGC	ATCGYCAWCM	TCTYGCGCTG	AATACGTGAA	TGCMYCTTTT
066	MT-462_898	AAYGCCTCGT	MWGCCTCGY	CAWCMKCTY	CKYTGATTAC	ATMAMARCCC	TTTTGGAAAA
067	MT-462_898	AGTAAAYGCM	MGTMTKCGCW	CGYCAWCMKC	TTGYKYTGGA	TTACGTSAMT	RCMTCTTTTG
068							
069							
070		785	795	805	815	825	835
071	MT-462_897	CYCGCGCTCC	TWCTCWTTGA	SWGATCTRAG	AAATTATCTC	GACWGWRTAA	ATAGCAARTG
072	MT-462_897	CAYSCTCYCG	CGCTCCTWCT	CATTGASWGA	TCTGRKAAAT	TCATCAGACW	GWATAATACA
073	MT-462_897	TTGKACACAY	SCKYCCGYMG	CTSCTTCYSW	TTGAMWRATC	TGRKAAWTTA	TCTAGACWGT
074	MT-462_898	TACAMAYCCG	CYCGYMGCTS	CTWCTSATTG	ASWGATCTRR	GAAWTTCAYC	TAGACWGKAT
075	MT-462_898	YCCKYYCGYM	GCTSCTASCS	WTTGASWGAT	CTRGAATTC	ATCTACGACW	GKATTAATAG
076	MT-462_898	GTACACACCG	YCCGCGCWSC	TACTGWTTGA	SWGATCTRRK	AAWTCATCTA	GACWGWKTWA
077	MT-462_898	YSCKCCCGYA	GCWSCTWCCG	ATTRASWRAT	CTRAGAAAAT	CAYYYTMGAC	TGTWTWAATA
078	MT-462_898	TACACAYSCG	YCCGTAGCTG	CTTACYGWTT	GASAGATCWG	AGTAAWTCAY	YYTCGKACWG
079							
080							
081		845	855	865	875	885	895
082	MT-462_897	CTYGYATCWG	MTMYWGWAA	TCTRTRACGY	TTCTCWMMAC	WAACAAAAAA	AGAGGGGG..
083	MT-462_897	AGTGCGYCYA	TCWGCYCCTG	AMAGTCTGAG	ATCGCTCTYY	WMMMTCACCA	GAAAAA....
084	MT-462_897	ATWWATAGCA	GTRCYGYAT	YAGMYCTAGW	AAGTCWTAGW	RWACKTYYYT	TYTMTAGAGA
085	MT-462_898	TTAATACAAG	TRCYYSTATC	WGCYMTARTA	AAGTCTAAGA	WCGYYTYTYT	CTAGCAAGAG
086	MT-462_898	CAGTRCTCSY	AYTGCMYMTA	TAAGTATGGA	CGYTCTTYTC	ATAGCGAGAG	GGAGAGGGAG
087	MT-462_898	TASMAGTRYC	CSTATCWGCA	YMTAGTAAGT	CATAGWRTCG	TCTYYTYWMA	TCAYAAGARA
088	MT-462_898	GMAGTRCYYC	STATTAGCAY	MTAKMAAGYA	TAGAKAACTC	TCTYTCACCT	ATAAGGAAGA
089	MT-462_898	GTWTAATAGC	AGTRCTYCGT	ATTAGCATCT	AKMAGYYWTA	RWGWASTYTY	WTYAATCAAT

090
091 |.|.|.| ...
092 905 915
093 MT-462_897
094 MT-462_897
095 MT-462_897 RARGRGRGAG ARAAGCCTCT C..
096 MT-462_898 GGAGGGRAGA GAGRARATCC T..
097 MT-462_898 GARTCT....
098 MT-462_898 GARGRGGAGG AAGAGGYTTT T..
099 MT-462_898 GGGAGAGGA.
100 MT-462_898 AGKRRAARAG GGAGRAAGAA CTG

101
102
103
104 Alinhamento: primer HEPF300
105

106 |.|.|.|.|.|.|.|
107 5 15 25 35 45 55
108 MT-461_887 AGGKTTTGGC CTTCCGGGGC AGTWTCGGTT AACGGGGGAT AGGGWTCGAC TCCGGAKAGG
109 MT-461_887 GGGGGATTGG GGCTACCGGG GGCAGTGTCT GTTAACGGGG GATAGGGWTC GATTCCGGAG
110 MT-461_887 AGGATTTTGG GCCTTCCGGT GGGCAGTGAG GGTTAACGGG GGATAGGGTT CGATTCCGGA
111 MT-461_887 CKWRRTTKYS GCCTACKGCG CCTATCAATC ATTAATTTAG TTCTTAAAAC CAATAACGTA
112 MT-461_888 TATTGAATTG GGGCCTAACC GGKGGCAGTR TCGGTTAACG GGGGAKTAGG GWTCGATTCC
113 MT-461_888 GGGWATTTGG GCTTACCGTG GGCAGTGACG GTTAACGGGG GAKTAGGGWT CGATTCCGGA
114
115 |.|.|.|.|.|.|.|
116 65 75 85 95 105 115
117 MT-461_887 AGCTGAGAAC TGTTATCACA TCTAACTGGG GAATTGGAAA GGTTAGCCCG AATTAAACAC
118 MT-461_887 AGAAGCCTGA GAAACGGCTA CCACATCTTG CGAAGGCAGT TGGAGACGAA TYACCGAATT
119 MT-461_887 GAGGGAGCCT GAGAAACGGC TACCACATCT WAGGAAGGCA GCWGGMGACG AATYACCCAA
120 MT-461_887 GAACTAAAAT CCTATTTTAT TATTCCATGC TGCAGTATTC AAAACGTTAG CCTGCTTGAA
121 MT-461_888 GGAGAGGGAG CCTGAGAMAC GGCTACCACA TCTAAGGAAG GSAGCAGGAM ACRAATKACC
122 MT-461_888 GAGGGAGCCT GAGAAACGGC TACCACATCT AAGGAAGCAG CTGGAACGCT TATTACCCAA
123
124 |.|.|.|.|.|.|.|
125 125 135 145 155 165 175
126 MT-461_887 TCTAATTTTC TCAAGTAAAA GTCCTGAAAT TTGCTTTTAA CAATAAAGTA AAATGCATTT
127 MT-461_887 CAAACAGCTT ATTATAGGAA GTGACAAGAA ATAACAATTC GAGTTAGACA ATAAGGGAAA
128 MT-461_887 TTCTAACAGC ATATGATAGG TAGGGACAAG TAATAACAGT CGAGGTAGAC AATATGGGAA
129 MT-461_887 ACACTCTAAT TTTCTCAAAG TAAAAATCCT GAAATTTGCT TTTAACAATA AAGTAAAATG
130 MT-461_888 CAATTCTAAC AGCACAAAGAG AGGTAGTGAC AAGAAATAAC AATACGAGGY AGACAATAAG
131 MT-461_888 TTCTAACATC ATATTAGAGG WAAGGAAAAG AAATAACAAT TTGAGTTAGA CAATAAAGTA
132
133 |.|.|.|.|.|.|.|
134 185 195 205 215 225 235
135 MT-461_887 CARAGGACAT TATTGCTAGA AACACACGAA GATACCGCTT TTATTAATAA AAGCMGACCG
136 MT-461_887 ATGCTTTTAT GAGGACATTA TTGCTAGAAA CTCAACAAGA TACCACTGTT ATTAATAAAA
137 MT-461_887 GTAGTTTTTA TGAGAAAAAT TTTGCTACTT ATACAAGAAG ATACCGCTGT TATTAATAAA
138 MT-461_887 CWTTTCAAAG GACATTATTG CTAGAAACAC ACCAAGATAC CACTTTTATT AATAAAAGCM
139 MT-461_888 GGAAAAAATT TTTCTGAGGA CATTTTGTCT AGAAACACAC GAAGATACCA CTGTTATTAA
140 MT-461_888 AAATGCTTTT CTGAGGACAT TATTGCTAGA AATACACGAA GATACCGCTT TTATTAATAA
141
142 |.|.|.|.|.|.|.|
143 245 255 265 275 285 295
144 MT-461_887 GTTATTTTTTA GCAAAAATTC AACTACGAGC TTTTAACTG CGACGATTTT AATATACGCT
145 MT-461_887 GCCGACCGGY TATTTTTTAGC CAGAATTCAA CTACGAGCTT TTAACTGCG ACGATTTTAA
146 MT-461_887 AGCCGACCGG YGATTTTTAG CAAAATTC AACTACKAGCT TTTTAACTGC GACGATTTTA
147 MT-461_887 GACCGGTTAT TTTTAGCAAA AATTCAACTA CGAGCTTTTT AACTGCRACA ATTTTAATAT

148	MT-461_888	TAAAAGCCGA	CCGGTTATTT	TTAGCAAAAA	TTWAACTACK	AGCTTTTTTAA	CTGCGACAAT
149	MT-461_888	AAGCAGACCG	GYTATTTT	GCAAAAATTC	AACTACKAGC	TTTTTAACTG	CGACAATTTT
150							
151							
152		305	315	325	335	345	355
153	MT-461_887	ATTGGAGCTG	GAATTACCGC	GGCTGCTGGC	ACCAGACTTG	CCCTCCAATT	GATACTTTAA
154	MT-461_887	GATACGCGAT	TGGAGCTGGA	ATTACCGCGG	CTGCTGGCAC	CAGACTTGCC	CTCCAATTGA
155	MT-461_887	ATATACGCTA	TTGGAGCTGG	AATTACCGCG	GCTGCCGGCA	CCAGACTTGC	CCTCCAATTG
156	MT-461_887	ACGCTATTGG	AGCTGGAATT	ACCGCGGCTG	CYGGCACCAG	ACTTGCCCTC	CAATTGATAC
157	MT-461_888	TTTAATATAC	GCTATTGGAG	CTGGAATTAC	CGCGGCTGCC	GGCACCAGAC	TTGCCCTCCA
158	MT-461_888	AATATACGCT	ATTGGAGCTG	GAATTACCGC	GGCTGCTGGC	ACCAGACTTG	CCCTCCAATT
159							
160							
161		365	375	385	395	405	415
162	MT-461_887	AAAGTATTTA	AATTTCTATC	AGTCCAATTA	CWACGCATTT	TAAGTGCCTT	GWACTGTWAT
163	MT-461_887	TACTTTAAAA	AGTATTTAAA	TTTCTATCAG	TCCAATTACT	ACGCATTTTA	ACTGCCTYGW
164	MT-461_887	ATACTTTAAA	AAGTATTTAA	ATTTCTATCA	GTCCAATTAC	TACGCATTTT	AACTGCCTYG
165	MT-461_887	TTTAAAAAGT	ATTTAAATTT	CTATCAKTCC	AATTACAACG	CATTTTAACT	GCCTTGWACT
166	MT-461_888	ATTGATACTT	TAAAAAGTAT	TTAAATTTCT	ATCATTTCAA	TTACTACGTT	TTTTAACTGC
167	MT-461_888	GATACTTTAA	AAAGTATTTA	AATTTCTATC	ATTCCAATTA	CWACGCATTT	TAAGTGCCTY
168							
169							
170		425	435	445	455	465	475
171	MT-461_887	TTCTTGTCWC	TACCTCTMTT	ATGCTGTTAG	AAGTGGGYAA	WTKGCGCGCC	TRCTGCCTTC
172	MT-461_887	ACTGYWATTT	CTTGTCACTA	CCTCTCTTAT	GCTGTTAGAA	GTGGGYWAWT	KGCKCGCCTR
173	MT-461_887	AACTGTWATT	TCTTGTCACT	ACCTCTCTTA	TGCTGTTAGA	AGTGGGYWAW	TKGCGCGCCT
174	MT-461_887	GTWATTTCTT	GTCACTACCT	CTMTTATGCT	GTTAGAATTG	GGYAATTTGC	GCGCCTGCTG
175	MT-461_888	CTYGTACTGT	WATTTCTTGT	CACTACCTCT	CTTGTGCTGT	TAGAAGTGGG	YWAWTKGCGC
176	MT-461_888	GWACTGTWAT	TTCTTGTCAC	TACCTCTCTT	ATGCTGTTAG	AATTGGGYWA	WTKGCKCGCC
177							
178							
179		485	495	505	515	525	535
180	MT-461_887	CTTAGATGTG	GWAGCCGWT	CTCAGGCTCC	CTCTCCGGAA	TCGAACCCTA	ATCCCCCGWT
181	MT-461_887	CTGCCTTTCT	TAGATRTGGW	AGCCGWTTC	CAGGCTCCCT	CTCCGGAATC	GAACCCTAAT
182	MT-461_887	RCTGCCTTCC	TKAGATGTGG	WAGCCGWTTC	TCAGGCTCCC	TCTCCGGAAT	CGAGCCCTAA
183	MT-461_887	CCTTCCTTAG	ATGTGGWAGC	CGWTTCTCAG	GCTCCCTCTC	CGGAATCGAA	CCCTAATCCC
184	MT-461_888	GCCTRCTGCC	TTCTCTKAGAT	GTRGWAKCCG	WTTCTCAGGC	TCCCTCTCCG	GAATCGAACC
185	MT-461_888	TRCTGCCTTC	CTTAGATGTG	GWAGCCGWT	CTCAGGCTCC	CTCTCCGGAA	TCGAACCCTA
186							
187							
188		545	555	565	575	585	595
189	MT-461_887	AACCGTSACT	GCCACGGKRM	GYCWATACCA	TACCGTCGAA	AGCTGATAGG	YYAGAAACAG
190	MT-461_887	CCCCCGWTAA	CCGKSACTGC	CACGGKRAGY	YAATATCATA	CCGTCRAAAG	CTGATATGTY
191	MT-461_887	TCCCCGWTAA	ACCGTSACTG	CYACGGTAMG	YYAATACCAT	ACCGTCGAAA	GCTGATAGTY
192	MT-461_887	CCGWTAAACCG	KCACTGCCAC	GGKAAGCCAA	TACCATACCG	TCGAAAGCTG	AAGTTTARRR
193	MT-461_888	CTAATCCCCC	GWTWACCGKC	ACTGCIYACGG	KRMGCYAATA	CCWTACCGTC	RAAAGCTGAT
194	MT-461_888	ATCCCCCGWT	AACCGTCACT	GCCACGGKRA	GYCAATACCW	TACCGTCGAA	AGCTGATAGT
195							
196							
197		605	615				
198	MT-461_887	AGA.....					
199	MT-461_887	ARAAACAGAG	A.....				
200	MT-461_887	YAGGAAACAG	A.....				
201	MT-461_887	AAACARAGA.					
202	MT-461_888	ATGTYWAGAA	WACAAGA				
203	MT-461_888	YYARRAWACA	GAGA...				
204							
205							

206
207 Alinhamento: primer HEP900
208
209

210							
211		5	15	25	35	45	55
212	MT-461_887	GTGGATSTGG	GKTTACCGGG	GGCAGTRTCG	GTCAAATGGG	GGAGTAGGGW	ACGATTCCGG
213	MT-461_887	AGAGGTATTT	GGCCTACCCG	TGGGCAGTGT	CGGTTAACGG	GGGATAGGGW	WCGATTCCGG
214	MT-461_887	ATGGTTTGGG	CTTCCGTGGC	AGTGAGGTTA	ACGGGGGATA	GGGTTCGATT	CCGGAGAGGA
215	MT-461_888	CATTCKKGTG	CCCCCTACTG	CCCCTATCAA	TCATTAATTT	AGTTCTTAAA	ACCAATAACG
216	MT-461_888	AGGAATTGGG	CTTACCGGTG	GCAGTRTCGG	TTAACGGGGG	AKTAGGGWTC	GATTCCGGAG
217	MT-461_888	CGGAATTTGG	GCTTCCGKGG	GCAGTRTCGG	TTAACGGGGG	AKTAGGGWTC	GATTCCGGAG
218							
219							
220		65	75	85	95	105	115
221	MT-461_887	AGAGAAGCCT	GAGAAAAAGC	TATACATCTT	GCTGCAGAGC	AGGAGACGAA	GCCTGAATTC
222	MT-461_887	AGAGGGAGCC	TGAGAAACGG	CTACCACATC	TTGGAAGGCA	GCAGGAGACG	TTYACCGAA
223	MT-461_887	GCCTGAGAAA	ATGTTATTCA	TCTTGCTGCA	GAGTTCAAAA	CGTTAGCATG	AATTAAACAC
224	MT-461_888	TAGAASTAAA	ATCCTATTTT	ATTATTCCAT	GCTGCAGWRT	TCAAAACGTT	AGCCTGCTTG
225	MT-461_888	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT	ACCACATCTA	AGGAAGGGAG	CAGGAAACRA	ATGACCCAAT
226	MT-461_888	AGGGAGCCTG	AGAAACGGTT	ACCACATCTA	AGGAAGGCAG	CTGGAGACGT	TATYACCCAA
227							
228							
229		125	135	145	155	165	175
230	MT-461_887	AAACATCTAA	TTATCTCAAA	GGAAAAATCC	TGAAATTTGC	TTTTAACAAT	AAAGGAAAAT
231	MT-461_887	TTCTAACATC	TTATGATAGG	AAGGGAAAAG	AAATGAAATT	CGCGTTTGAC	AATAAGGTAA
232	MT-461_887	TCTAATTTTC	TCAAAGKAAA	AATCCTGAAA	TTTGCTTTTA	ACAATAAAGT	AAAATGCTTT
233	MT-461_888	AAACACTCTA	ATTTTCTCAA	AGTAAAAATC	CTGAAATTTG	CTTTTAACAA	TAAAGTAAAA
234	MT-461_888	TCTAACAGCA	CAAGAGAGGT	AGTGAAAGAA	ATAAAAATAC	GAGGYAGACA	ATAAGGGAAA
235	MT-461_888	TTCTAACATC	ATAAGATAGG	AAAGGAAAAG	AAATAACAAT	TTGAGTTTGA	CAATAAAGGA
236							
237							
238		185	195	205	215	225	235
239	MT-461_887	GCTTTTCAAA	GGACATTATT	GCTAGAAACA	CAACAAGATA	CCACTTTTAT	TAATAAAAGC
240	MT-461_887	AATGCTTTTT	AGAGGACATT	ATTGCTAGAA	ACACACGAAG	ATACCACTGT	TATTAATAAA
241	MT-461_887	TCAAAGAACA	TTATTGCTAG	AAACACACGA	AGATACCACT	GTTATTAATT	AAAGCCGACC
242	MT-461_888	TGCWTTTCAA	AGGACATTAT	TGCTAGAAAC	ACACCAAGAT	ACCACTTTTA	TTAATAAAAG
243	MT-461_888	AAACATTTCT	GAGGAAATTA	TTGCTACTTT	TTCAAGAAGA	TACCACTTTT	ATTAATAAAA
244	MT-461_888	AAAAGCATT	CAAAGGACAT	TATTGCTAGA	AACACACGAA	GATACCACTT	TTATTAATAA
245							
246							
247		245	255	265	275	285	295
248	MT-461_887	AGACCGGTTA	TTTTTAGCAA	AAATTCAACT	ACGAGCTTTT	TAAGTGCRA	AATTTTAATA
249	MT-461_887	AGCMGACCGG	YKATTTT	CAAAAATTCA	ACTACGAGCT	TTTAACTGC	GACGATTTTA
250	MT-461_887	GGYTATTTT	AGCAAAAATT	CAACTACKAG	CTTTTAACT	GCGACGATT	TAATATACGC
251	MT-461_888	CAGACCGGTT	ATTTT	AAAATTCAAC	TACGAGCTTT	TTAACTGCRA	CAATTTTAAT
252	MT-461_888	GCAGACCGGT	TATTTT	AAAAATTMAA	CTACKAGCTT	TTTAACTGCG	ACAATTTTAA
253	MT-461_888	AAGCAGACCG	GYTATTTT	GCAAAAATTC	AACTACKAGC	TTTTTAACTG	CRACAATTTT
254							
255							
256		305	315	325	335	345	355
257	MT-461_887	TACGCTATTG	GAGCTGGAAT	TACCGCGGCT	GCTGGCACCA	GACTTGCCCT	CCAATTGATA
258	MT-461_887	ATATACGCTA	TTGGAGCTGG	AATTACCGCG	GCTGCTGGCA	CCAGACTTGC	CCTCCAATTG
259	MT-461_887	TATTGGAGCT	GGAATTACCG	CGGCTGCTGG	CACCAGACTT	GCCCTCCAAT	TGATACTTTA
260	MT-461_888	ATACGCTATT	GGAGCTGGAA	TTACCGCGGC	TGCTGGCACC	AGACTTGCCC	TCCAATTGAT
261	MT-461_888	TATACGCTAT	TGGAGCTGGA	ATTACCGCGG	CTGCCTGCAC	CAGACTTGCC	CTCCAATTGA
262	MT-461_888	AATATACGCT	ATTGGAGCTG	GAATTACCGC	GGCTGCTGGC	ACCAGACTTG	CCCTCCAATT
263							

264							
265		365	375	385	395	405	415
266	MT-461_887	CTTTAAAAAG	TATTTAAATT	TCTATCAGTC	CAATTACWAC	GCATTTTAAAC	TGCCTYGWAC
267	MT-461_887	ATACTTTAAA	AAGTATTTAA	ATTTCTATCA	GTCCAATTAC	AACGCATTTT	AACTGCCTYG
268	MT-461_887	AAAAGTATTT	AAATTTCTAT	CAGTCCWATT	ACAACGCATT	TTAACTGCCT	YGWACTGTWA
269	MT-461_888	ACTTTAAAAA	GTATTTAAAT	TTCTATCAKT	CCAATTACAA	CGCATTTTAA	CTGCCTTGWA
270	MT-461_888	TACTTTAAAA	AGTATTTAAA	TTTCTATCAG	TCCAATTACA	ACGCATTTTA	ACTGCCTYGT
271	MT-461_888	GATACTTTAA	AAAGTATTTA	AATTTCTATC	AGTCCWATTA	CWACGCATTT	TAAGTGCCTY
272							
273							
274		425	435	445	455	465	475
275	MT-461_887	TGTWATTTCT	TGTCWCTACC	TCTMTTATGC	TGTTAGAAGT	GGGYAAWTTG	CKGCGCTRCT
276	MT-461_887	WACTGYWATT	TCTTGTCWCT	ACCTCTMTTA	TGCTGTTAGA	AGTGGGYWAW	TKGCKGCGCT
277	MT-461_887	TTTCTTGTC	CTACCTCTCT	TATGCTGTTA	GAAGTGGGYW	AWTKGCKKCG	CTRCTGCCTT
278	MT-461_888	CTGTWATTTT	TTGTCACTAC	CTCTMTTATG	CTGTTAGAAT	TGGGYAAWTT	GCGCGCCTRC
279	MT-461_888	ACTGYWATTT	CTTGTCACTA	CCTCTCTTGG	GCTGTTAGAA	GTRGGYWAWT	KGCKGCGCTR
280	MT-461_888	GWACTGTWAT	WTCTTGTCWC	TACCTCTCTT	ATGCTGTTAG	AATTGGGYAA	WTGCKGCGCC
281							
282							
283		485	495	505	515	525	535
284	MT-461_887	GCCTTCCTTA	GATGTGGWAG	CCGWTTCTCA	GGCTCCCTCT	CCGGAATCGA	ACCCTAATCC
285	MT-461_887	RCTGCCTTCC	TKAGATGTGG	WAGCCGWTTT	TCAGGCTCCC	TCTCCGGAAT	CGAGMCCTAA
286	MT-461_887	CCTKAGATGT	GGWAGCCGWT	TCTCAGGCTC	CCTCTCCGGA	ATCGAACCCCT	AATCCCCCGW
287	MT-461_888	TGCCTTCCTT	AGATGTGGWA	GCCGWTTCTC	AGGCTCCCTC	TCCGGAATCG	AACCCTAATC
288	MT-461_888	CTGCCTTCCT	KAGATGTGGW	AGCCGWTTCT	CAGGCTCCCT	CTCCGGAATC	GAGMCCTAAT
289	MT-461_888	TRCTGCCTTC	CTTAGATGTG	GWAGCCGWTT	CTCAGGCTCC	CTCTCCGGAA	TCGAACCCTA
290							
291							
292		545	555	565	575	585	595
293	MT-461_887	CCCGTTAACC	GKSASTGCCA	CGGKRAGYYA	ATACCATACC	GTCRAAAGCT	GATAGGTYAR
294	MT-461_887	TCCCCCGWTW	ACCGTCACTG	CCACGGKRMG	CCAATACCAT	ACCGTCGAAA	GCTGATAGTY
295	MT-461_887	TAACCGKCAC	TGCCACGGKR	AGYCAATACC	ATACCGTCRA	AAGCTGAAGT	TTARRAAAYG
296	MT-461_888	CCCCGWTAAC	CGTCACTGCC	ACG GTAAGCC	AATACCATAC	CGTCGAAAGC	TGAAGTTWAA
297	MT-461_888	CCCCCGWTAA	CCGTCACTGC	CWCGGKRAGC	CAATATCATA	CCGTCRAAAG	CTGAAGTYYA
298	MT-461_888	ATCCCCCGWT	WACCGTCACT	GCCACGGKRA	GYCAATACCA	TACCGTCGAA	AGCTGAAGTT
299							
300			.				
301		605					
302	MT-461_887	AAAACAGAGA	.				
303	MT-461_887	YAGAAACAGA	.				
304	MT-461_887	A.....	.				
305	MT-461_888	AAAAMMA...	.				
306	MT-461_888	ARAAACAAA.	.				
307	MT-461_888	WRRRAAACAR	A				
308							