

Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS

***HEPATOZOON CAIMANI* (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) NO
JACARÉ *CAIMAN YACARE* NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE:
PREVALÊNCIA E TRANSMISSÃO NATURAL**

Tese apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADOR: DR. RICARDO LOURENÇO DE OLIVEIRA

RIO DE JANEIRO

2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D541

Dias, Lúcio André Viana

Hepatozoon caimani (Apicomplexa: Hepatozoidae) no jacaré *Caiman yacare* no Pantanal Sul Mato-Grossense : prevalência e transmissão natural / Lúcio André Viana Dias . – Rio de Janeiro, 2010.
x, 139 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2010.
Bibliografia: f. 132-139.

1. *Hepatozoon caimani*. 2. *Caiman yacare*. 3. Pantanal. 4. *Culex*
(*Melanoconion*) spp. I. Título.

CDD 616.962

AUTOR: LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS

***HEPATOZOON CAIMANI* (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) NO
JACARÉ *CAIMAN YACARE* NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE:
PREVALÊNCIA E TRANSMISSÃO NATURAL**

ORIENTADOR: DR. RICARDO LOURENÇO DE OLIVEIRA

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. ANA MARIA JANSEN-FRANKEN (PRESIDENTE DA BANCA)

Dr^a. LÚCIA HELENA O'DWYER (MEMBRO E REVISORA)

Dr^a. MARIA ANICE MUREB SALLUM (MEMBRO)

Dr^a. NÁDIA REGINA PEREIRA ALMOSNY (SUPLENTE)

Dr. HEITOR MIRAGLIA HERRERA (SUPLENTE)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz e para a realização do mesmo foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT).

Dedico esta tese as duas mulheres mais importantes da minha vida. Minha amada mãe, que desde o início dos meus estudos me ensinou o amor e cuidado pelos livros, e minha avó, Dona Lia, pelo exemplo de força de vontade na solitária criação de nossa família, refletida em suas mãos e pés calejados no dia a dia duro da enxada em roças de algodão e café.

Foram muitos, os que me ajudaram na realização deste trabalho. Agradecimentos...

Primeiramente ao meu orientador, Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, pelas maravilhosas lições de ciência e agilidade no trabalho diário. Mas, sobretudo, pela paciência e companheirismo com esse seu orientando.

Ao Prof^o Dr. Fernando Paiva, do Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFMS, pela forte parceria e colaboração nos trabalhos.

Ao Dr. Marcos Eduardo Coutinho pela grande confiança e parceria nos trabalhos da tese e pela enorme ajuda logística de sua esposa, Débora Coutinho.

Ao técnico de campo Joilson Barros (o Birro), pela fantástica ajuda nos trabalhos de captura dos jacarés *C. yacare* no Pantanal. Também ao grande Átila do Lab. Parasitologia da UFMS, pela força no laboratório, amizade e ótimas conversas.

À Érica Modena, esposa querida, mão segura e cheia de apoio em todos os momentos alegres e difíceis da tese.

Aos meus irmãos Júnior, Paulinha e Ricardo pelo incentivo e boas risadas. Também aos iniciantes no grupo, Tuco e Isabela.

Ao Tônico e Marileide pelo companheirismo e incentivo sempre.

Ao pessoal do Lab. Transmissores de Hematozoários, companheiros fantásticos, nos momentos ótimos e duros. Em especial ao Marcelo Quintela, pela ajuda e ensinamentos para criação dos *Cx. (Melanoconion)* spp. Ao Glauber, pelo cuidado, quase amoroso com os peixes. A Teresa Fernandes e Quedes, pela eterna gentileza e apoio.

À Ester, pela força nos momentos difíceis e pela alegria inspiradora quase infinita. Ao Felipe Ferreira pela enorme ajuda com a figura do olho do caiman, em um momento estratégico da tese.

A todos os graduandos em Biologia que participaram dos estudos, em especial a Stephani Dal Bem Denzkuk (minhas eternas desculpas !!!), Olívia Dias, Karla Campião, Johnatan Eber, Gudryan e Clarissa Araújo.

A Priscilla Soares, meu braço e perna direita, pela responsabilidade, carinho no trato dos jacarés, companheirismo e, sobretudo pela empolgação com os parasitos do gênero *Hepatozoon*.

Ao Sr. Gerson Zahdi, pelo companheirismo na realização dos estudos em sua propriedade, a Cacimba de Pedra.

Aos funcionários da Pousada Ararauna, pela ajuda e ótimos momentos juntos no Pantanal.

À Dra. Alexine Keuroghlian, pelo incentivo e apoio nos trabalhos no Pantanal.

Ao pessoal da Casa Amarela, minha primeira família no Rio de Janeiro, pessoas de coração de ouro, minha profunda gratidão.

Aos grandes protozoologistas “hepatozoólogos”, que tanto me inspiram: R. Lainson, Todd Smith, S.S. Desser, I. Paperna, e P.C.C. Garnham.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA	3
1.2. GÊNERO <i>HEPATOZOON</i>	11
1.2.1. Hepatozoídeos em crocodilianos.....	15
1.3. O JACARÉ <i>CAYMAN YACARE</i> - HOSPEDEIRO VERTEBRADO DO <i>HEPATOZOON CAIMANI</i>	19
1.4. <i>HEPATOZOON CAIMANI</i>	23
1.4.1. Histórico taxonômico....	23
1.4.2.A multiplicação merogônica do <i>H. caimani</i> no hospedeiro vertebrado.....	24
1.4.3. A esporogonia do <i>H. caimani</i> no hospedeiro invertebrado.....	25
1.4.4. Hospedeiros intermediários.	27
1.4.5. Prevalência do <i>H. caimani</i> em jacarés.....	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVO	33
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS	34
5. CAPÍTULO 1 – <i>HEPATOZOON CAIMANI</i> (APICOMPLEXA: HEPATIZOZOIDAE) IN WILD CAIMAN, <i>CAIMAN YACARE</i>, FROM THE PANTANAL REGION, BRAZIL	37
6. CAPÍTULO 2 – CAIMAN BITING MOSQUITOES AND THE NATURAL VECTOR OF <i>HEPATOZOON CAIMAN</i> (APICOMPLEXA: HEPATIZOZOIDAE)	44

7. CAPÍTULO 3 – ANUROS COMO HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS PARA O <i>HEPATOZOOON CAIMANI</i> E TRANSMISSÃO PARA OS JACARÉS <i>CAIMAN YACARE</i> E <i>CAIMAN LATIROSTRIS</i>.....	69
8. CAPÍTULO 4 – DINÂMICA INFRAPOPULACIONAL DO <i>HEPATOZOOON CAIMANI</i> EM JACARÉS <i>CAIMAN YACARE</i> E <i>CAIMAN LATIROSTRIS</i>.....	81
9. CAPÍTULO 5 – TRANSMISSÃO DE <i>HEPATOZOOON CAIMANI</i> (APICOMPLEXA: HEPATIZOZOIDAE) PARA O JACARÉ <i>CAIMAN YACARE</i> ATRAVÉS DO CANIBALISMO.....	92
10. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES.....	104
11. CONCLUSÕES.....	127
12. PERSPECTIVAS.....	128
13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
14. ANEXOS.....	140

RESUMO

Na presente tese, foram estudados aspectos da relação parasito-hospedeiro, constituída pelo protozoário parasito *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Adeleorina) e seu hospedeiro vertebrado, o jacaré *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae), na região do Pantanal Sul, Brasil. Com o objetivo de esclarecer os componentes epizootiológicos desta relação procuramos no primeiro momento examinar os níveis de prevalência e distribuição da parasitemia do *H. caimani* em uma população do *C. yacare*, procurando por fatores que poderiam estar associados ao maior risco de infecção, tais como gênero, tamanho/idade, e condição corporal, no período de julho de 2006 a fevereiro de 2008. Encontramos prevalência de 76% para toda a população amostrada (n=229) e o risco de infecção foi associado somente com o tamanho/idade dos jacarés, onde os animais filhotes não apresentaram infecção, os juvenis apresentaram 63%, adulto jovens e adultos foram 100% infectados. O *H. caimani* apresentou ainda uma distribuição agregada na população do *C. yacare*. De maneira a esclarecer os fatores responsáveis pela alta quantidade de jacarés infectados na região do Pantanal Sul, iniciamos estudos para investigar os possíveis fatores responsáveis por este fenômeno. Em um segundo momento, realizamos o levantamento dos culicídeos que realizam repasto sanguíneo nos *C. yacare* e verificamos infecções naturais pelo *H. caimani* somente em exemplares do gênero *Culex*, sobretudo no subgênero *Melanoconion*. Obtivemos infecções experimentais de *C. yacare* limpos após a ingestão de mosquitos *Culex* spp. com oocistos esporulados. A espécie incriminada como vetora primária do parasito foi *Cx. (Mel.) theobaldi*, devido a sua elevada abundância, preferência alimentar pelos jacarés e elevados níveis de infecção natural pelo *H. caimani*. Verificamos que alguns gêneros de anuros silvestres, e os próprios *C. yacare*, mediante o canibalismo, podem ser considerados hospedeiros intermediários do *H. caimani*, provavelmente contribuindo para a transmissão do mesmo no ambiente silvestre. Por fim, verificamos que gametócitos do *H. caimani* em jacarés *C. yacare* e *C. latirostris*, experimentalmente infectados, podem ser encontrados por períodos que variaram de três a seis meses nos crocodilianos, sugerindo que os jacarés podem servir como fonte de infecção para os vetores no campo por períodos relativamente longos.

ABSTRACT

We studied aspects of the host-parasite relation between the protozoan parasite *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Adeleorina) and its vertebrate host, the caiman *Caiman yacare*, in the Pantanal region, Brazil. We investigated the epizootiological components of this relation by surveying the prevalence and parasitemia of *H. caimani* in a population of *C. yacare* and searched for the factors that could influence the infection rates, such as sex, size/age and body condition from July 2006 to February 2008. We sampled 229 caimans and found a prevalence of 76% and the infection rate was related to caimans size/age. The young ones were not infected, the prevalence was 63% in the juveniles and 100% among the adult ones. *Hepatozoon caimani* showed an aggregated pattern of distribution. We also investigated the factors likely to have caused the high prevalence of *H. caimani* among caimans. By sampling the culicids that bite *C. yacare*, we found that the natural infection occurs only by *Culex* species, especially those belonging to the subgenus *Melanoconion*. Experimental infections of clean caimans *C. yacare* was retrieved after they ingested *Culex* spp. with sporulated oocysts. *Culex (Mel.) theobaldi* was pointed as the main vector because of its great abundance, preference for biting caimans and high natural infection levels by *H. caimani*. Some wild anuran genera may also be pointed as paratenic hosts, as well as caimans *C. yacare* themselves through cannibalism. Finally, *H. caimani* can be found in experimentally infected caimans *C. yacare* and *C. latirostris* for three up to six months, suggesting caimans as a perennial source of infection for the vectors in the environment.

1 - INTRODUÇÃO

O entendimento da complexidade da relação parasito-hospedeiro exige uma abordagem em diferentes níveis, tanto na escala individual, como é o caso da realização de infecções experimentais, quanto na populacional, mediante a determinação da prevalência e distribuição do parasito na população do hospedeiro (Dobson e Hudson 1995, McCallum e Dobson 1995). Contudo, para o estudo de sistemas parasito-hospedeiro que envolvem animais silvestres existe uma enorme defasagem de conhecimentos em comparação às pesquisas em animais domésticos ou de laboratório. Parte disso se deve a fatores como baixa densidade da espécie de hospedeiro estudada, criando dificuldades tanto no encontro e captura de exemplares, quanto para realização de infecções experimentais. Outro aspecto relevante diz respeito ao padrão agregado dos parasitos nas populações dos seus hospedeiros (Poulin 2007), o que exige amostragens robustas para contemplar a amplitude da carga parasitária da população (Gulland 1997).

Estudos observacionais e experimentais demonstram que os parasitos estão envolvidos em processos de regulação de populações silvestres (Anderson e May 1978, Scott 1990, Grenfell e Dobson 1995, Tompkins e Begon 1999) e na estruturação de comunidades ecológicas (Thomas et al. 2000, Poulin 1999, Minchella e Scott 1991). A influência dos parasitos se estende ainda a vários processos biológicos, tais como a seleção sexual dos seus hospedeiros (Ehman e Scott 2002, Zuk e McKean 1996), dinâmica de predação e competição (Prenter et

al. 2004, Minchella e Scott 1991), além de influenciar nos processos de especiação e extinção de seus hospedeiros (Renaud et al. 1996, Poulin 1999).

As poucas informações disponíveis sobre a presença de parasitos em populações naturais estão muitas vezes relacionadas à ocorrência de doenças que também infectam o homem ou animais domésticos (Gulland 1995), como é o caso de arboviroses. Conseqüentemente, o conhecimento sobre os fatores responsáveis pela persistência dos parasitos em populações de animais silvestres está muitas vezes associado a eventos epidêmicos (Tompkins e Begon 1999, Gulland 1995, Grenfell e Gulland 1995). Logo, avaliar os padrões de abundância dos parasitos dentro da população do hospedeiro e estudar seus ciclos de transmissão são tidos como pontos centrais no estudo da interação parasito-hospedeiro em animais silvestres (Bonsall 2002).

Os primeiros passos para se entender a dinâmica dos parasitos em populações naturais passam pela determinação da prevalência de hospedeiros infectados e da frequência da distribuição temporal ou geográfica da carga do parasito (Grenfell e Dobson 1995, May e Anderson 1979). A abundância dos parasitos em uma população natural de seu hospedeiro pode variar em resposta a numerosos fatores, tanto em termos de prevalência quanto de carga parasitária (Salkeld e Schwarzkopf 2005). Os fatores que podem influenciar a abundância incluem a idade ou tamanho do hospedeiro (Sandland e Minchella 2003), o estado imune do hospedeiro (Sheldon e Verhulst 1996), o gênero (Zuk e McKean 1996), a baixa condição física (Brown et al. 2000, Jokela et al. 1999), alta densidade populacional (Oppliger et al. 1998), o investimento reprodutivo

(Nordling et al. 1998, Richner et al. 1995) e a biologia do vetor (Koella 1999), além dos níveis de virulência (Anderson 1979, Lyles e Dobson 1993).

1.1. PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA

De um modo geral, grande parte do conhecimento dos protozoários do filo Apicomplexa está associado principalmente aos gêneros *Plasmodium*, *Eimeria* e *Toxoplasma*, evidentemente por conterem diversas espécies de interesse médico humano e veterinário. O gênero *Hepatozoon*, cuja espécie *Hepatozoon. caimani* é estudada neste trabalho, faz parte do filo Apicomplexa. Assim, segue-se uma breve exposição da taxonomia do filo Apicomplexa, de maneira a permitir um melhor entendimento entre as semelhanças e diferenças dos parasitos do gênero *Hepatozoon* e outros grupos do filo Apicomplexa. A caracterização dos representantes do filo Apicomplexa segue a revisão de Levine et al. (1980).

O filo Apicomplexa Levine, 1970, agrupa protozoários que apresentam um conjunto de estruturas conhecido como “complexo apical”, constituído por anéis polares, conóide, roptrias e microtúbulos subpeliculares (Levine et al. 1980). O grupo contém aproximadamente 6.000 espécies, reunidas em quatro grupos: coccídios, gregarinas, hemosporídios e piroplasmas, onde muitas das espécies são parasitos de humanos ou animais domésticos. Estes agrupamentos são baseados principalmente em características fenotípicas, tais como o tipo de hospedeiro vertebrado e vetor envolvido em seu ciclo, além de qual tecido do hospedeiro é parasitado (Morrison 2008).

Todos os membros do filo Apicomplexa são parasitos com ciclos de vida complexos, podendo apresentar duas fases assexuadas, conhecidas como merogonia e esporogonia, e uma sexuada, chamada de gametogonia. Com respeito ao seu desenvolvimento, os apicomplexa são únicos entre os eucariotos, eles apresentam uma ontogenia de reprodução cíclica (Siddal 1995), onde um gametócito masculino se diferencia em um ou mais microgametas (gametogênese), e fertiliza um macrogameta, ou gameta feminino, produzindo um zigoto. Este, por sua vez, diferencia-se em um oocisto com múltiplos esporozoítos formas alongadas que se liberam dos oocistos (esporogonia). Os esporozoítos, após invadirem uma célula hospedeira e se transformarem em merozoítos, usualmente se dividem assexuadamente por uma ou duas vezes (merogônia primária e secundária), gerando várias células filhas também chamadas merozoítos. Estes se diferenciam em gametócitos (gametogonia), que são os precursores da fase sexual.

O filo compreende a classe Sporozoea Leuckart 1879, que se caracteriza pela reprodução usualmente sexual e assexual; oocistos contendo esporozoítos infectivos resultantes da esporogonia; locomoção pela flexão do corpo, com deslizamento e ondulação; os flagelos quando presentes são encontrados nos microgametas; podem ser heteroxênicos ou monoxênicos. A classe Sporozoea é composta por três subclasses: Gregarina Dufour 1828, Piroplasmia Levine 1961 e Coccidia Leuckart 1879.

A subclasse Coccidia, encontra-se dividida em três ordens: Agamococcidiida Levine 1979, cujos indivíduos apresentam somente

esporogonia; Protococcidiida Kheisin 1956, com merogonia ausente; e Eucoccidiida Léger e Duboscq 1910, que apresenta as fases de merogonia, gametogonia e esporogonia.

As espécies da ordem Eucoccidiida estão agrupadas em três subordens: Eimeriina Léger, 1911, Haemosporina Danilewsky, 1885 e Adeleina Léger, 1911.

A subordem Eimeriina se diferencia da Adeleina pelo desenvolvimento independente dos gametas, ou seja, há ausência de sizígia, o microgamonte produz muitos microgametas, e os esporozoítos são tipicamente envoltos em esporocisto, dentro de oocistos. As espécies de Eimeriina diferenciam-se daquelas da subordem Haemosporina pela produção de oito microgametas, uma característica que os aproxima de Adeleina. Alguns dos gêneros presentes na subordem Eimeriina são *Eimeria*, *Isospora* e *Toxoplasma*.

A subordem Haemosporina também se diferencia da Adeleina por apresentar gametas com desenvolvimento independente, não ocorrendo sizígia. Além disso, difere das outras duas subordens por apresentar esporozoítos livres, além de serem sempre parasitos heteroxênicos. São exemplos de representantes da subordem Haemosporina os gêneros *Plasmodium*, *Leucocytozoon* e *Haemoproteus*.

A subordem Adeleina (Léger 1911) caracteriza-se pelo desenvolvimento conjunto de macro e microgametas no interior de uma célula do hospedeiro, fenômeno denominado de sizígia; o microgamonte produz 1-4 microgametas; a

endodiogenia é ausente e os esporozoítos encontram-se envoltos por uma membrana delgada frágil dentro do oocisto, formando conjuntos denominados esporocistos; as espécies podem ser monoxênicas ou heteroxênicas.

Entre as famílias que compõem a subordem Adeleina está a Haemogregarinidae, a qual era inicialmente composta por quatro gêneros: *Haemogregarina*, *Cyrlia*, *Karyolysus* e *Hepatozoon*. Contudo, estudos filogenéticos utilizando dados morfológicos, ultraestruturais e informações sobre o tipo de desenvolvimento, demonstraram que a subordem Adeleina é um grupo heterogêneo e polifilético (Barta 1989, Siddall e Desser 1991, Siddall 1995). Barta (1989) observou que os quatro gêneros da família Hemogregarinidae não formavam um grupo monofilético e sugeriu que fossem separados em três famílias: Haemogregarinidae Neveu-Lemaire, 1901, com os gêneros *Haemogregarina*, *Desseria* e *Cyrlia*; Karyolysidae Wenyon, 1926, com os gêneros *Karyolysus* e *Hemolivia*, e Hepatozoidae Wenyon, 1926, com o gênero *Hepatozoon*.

O termo hemogregarina é geralmente utilizado para parasitos vermiformes e largos encontrados em leucócitos e eritrócitos (Davies 2000), um termo muitas vezes associado a parasitos sanguíneos da subordem Adeleina (Jakes et al. 2003). A taxonomia de muitas das espécies de hemogregarinas pode não ser correta tanto para as espécies, quanto para os gêneros. Durante um período relativamente longo, a descrição de novas espécies de hemogregarina foi baseada somente em critérios como morfometria dos gametócitos presente nas células sanguíneas e/ou

pura e simplesmente pelo encontro de parasitos em uma nova espécie de hospedeiro e/ou numa nova localidade (Siddall 1995).

O sucesso em infecções experimentais entre diferentes espécies de hospedeiros com a mesma espécie de parasito desencorajou essa prática antiga (Ball et al. 1967, Booden et al. 1970, Landau et al. 1972). Por exemplo, Ball et al. (1967) demonstraram que *Hepatozoon rarefasciens* pode ser transmitido experimentalmente entre serpentes de diferentes espécies e mesmo entre diferentes famílias de ofídios, mediante a ingestão dos mosquitos *Culex tarsalis* e *Cx. pipiens* com esporozoítos formados. Concluiu-se portanto que até a observação de outras fases do ciclo serem realizadas não é apropriado a descrição de um novo hepatozoídeo.

Em seguida, alguns autores revelaram que os ciclos de hemogregarinas, como de *Hepatozoon*, podem ser bastante complexos, que os mecanismos de transmissão podem ser variados e que um mesmo parasito pode ou não infectar diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados. Landau et al. (1972) realizaram uma série de experimentos de transmissão cruzada do parasito *Hepatozoon domerguei* entre diferentes espécies de serpentes e também no lagarto *Oplurus sebae*, utilizando os mosquitos *Culex fatigans* e *Anopheles stephensi*. A fonte de infecção para realização dos experimentos foi a serpente *Madagascarophis colubrina*, encontrada naturalmente infectada. Mosquitos *Cx. fatigans* que realizaram repasto sanguíneo sobre a serpente foram ingeridos pelas serpentes limpas *M. colubrina* e *Lioheterodon modestus*, que por sua vez, apresentaram gametócitos, merontes e cistos com cistozoítos do parasito.

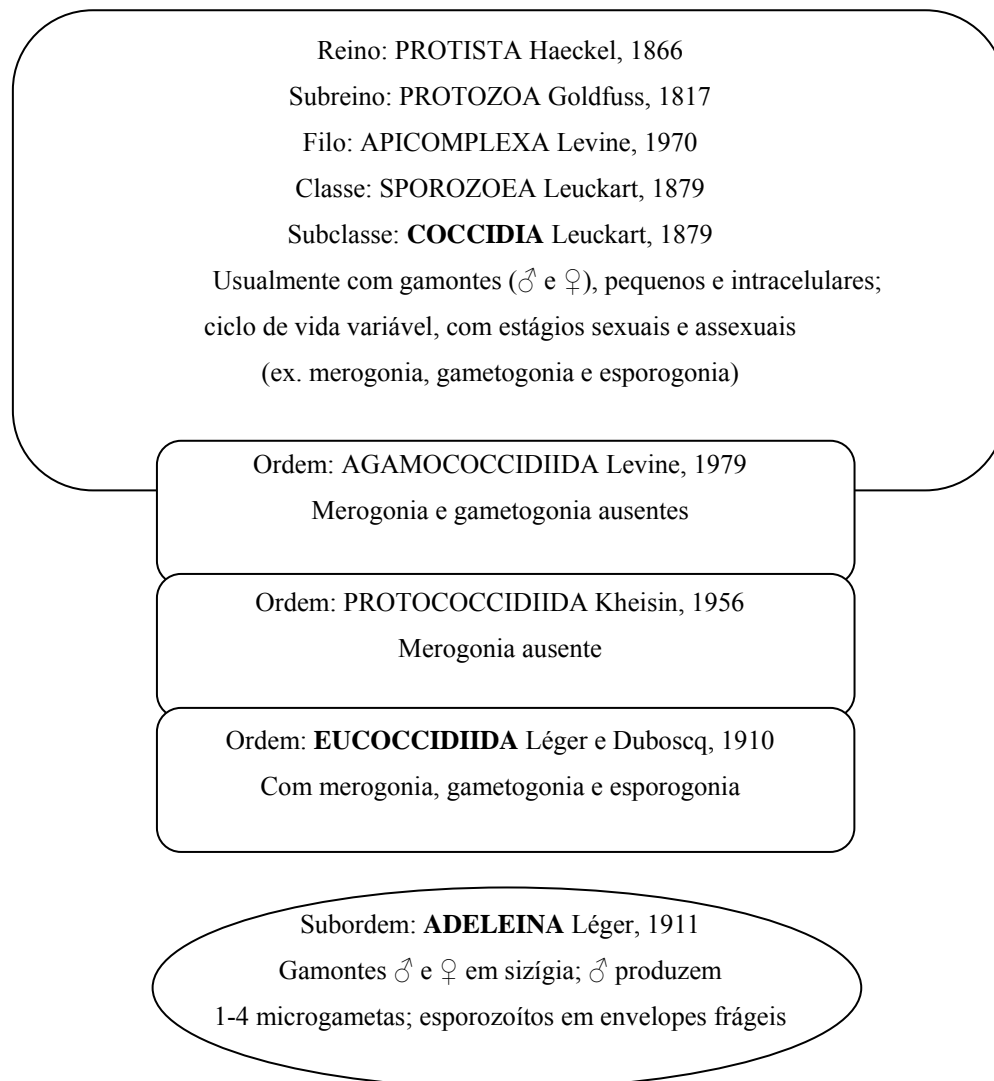
Utilizando da mesma abordagem, mosquitos *Anopheles stephensi* foram alimentados na serpente infectada *M. colubrina* e, em seguida, ingeridos pelos lagartos *Oplurus sebae* e pela serpente *Phyton sebae*. Curiosamente, em ambos hospedeiros foram observados gametócitos na circulação sanguínea, merontes e cistos semelhantes, e os mosquitos que realizavam repasto sobre estes vertebrados infectados apresentavam oocistos semelhantes. As outras duas espécies de lagarto testadas quanto à susceptibilidade do parasito foram *Lacerta muralis* e *L. viridis*. Após a ingestão de mosquitos infectados todos os onze indivíduos de *L. muralis* utilizados apresentaram somente cistos e *L. viridis* foi refratária a qualquer fase de desenvolvimento do parasito. Os lagartos com cistos formados em suas vísceras foram ingeridos por serpentes, e estas apresentaram gametócitos na circulação sanguínea posteriormente. Assim, os estudos de Landau et al. (1972) marcam a comprovação de que os cistos com cistozoítos, encontrados nas vísceras dos hospedeiros vertebrados, poderiam servir de fonte de infecção mediante a predação. Estudos posteriores reforçaram essa via de transmissão em sistemas parasito-hopedeiro onde o vertebrado não ingere comumente os vetores invertebrados, como é o caso de serpentes (Smith et al. 1994; Sloboda et al. 2008), canídeos (Johnson et al. 2008, 2009) e provavelmente de crocodilianos (Lainson et al. 2003).

Após constatação de que provavelmente muitas das espécies descritas como *Haemogregarina* pudessem, na verdade, pertencer a outros gêneros, uma nova revisão da subordem Adeleina foi realizada por Siddall (1995). O autor sugeriu a transferência dos parasitos de lagartos, de serpentes, de aves e de crocodilianos, inicialmente designados como pertencentes ao gênero *Haemogregarina*, para o

gênero *Hepatozoon*. O autor se baseou em alguns estudos em que fora observada uma elevada quantidade de esporocistos formados nos oocistos na fase esporogônica. A partir do trabalho de Siddall (1995), o critério mais aceito para a diferenciação entre os gêneros *Haemogregarina* e *Hepatozoon* é o desenvolvimento esporogônico nos vetores invertebrados (Desser 1993). No gênero *Haemogregarina* os oocistos são menores e no seu interior são produzidos cerca de oito esporozoítos. Já nos parasitos do gênero *Hepatozoon* ocorrem oocistos maiores e a formação de centenas de esporozoítos (Figura 1).

Smith (1996) realizou a revisão do gênero *Hepatozoon*, e seguindo a orientação de Siddall (1995), transferiu as espécies do gênero *Haemogregarina* registrados em lagartos, em serpentes, em aves e em crocodilianos para o gênero *Hepatozoon*, mesmo que ainda se desconheça a esporogonia de muitas das espécies destes vertebrados, que permanecem ainda caracterizados apenas pela forma dos gametócitos nas células sanguíneas dos hospedeiros vertebrados. Com efeito, muito pouco se sabe sobre os ciclos e as formas de muitas espécies ainda consideradas válidas.

Figura 1. Esquema da taxonomia do Filo Apicomplexa



Famílias

HAEMOGREGARINIDAE Neveu-Lemaire, 1901

Merogonia em células sanguíneas ou tecidos;

Oocistos relativamente pequenos (35µm de diâmetro);

Baixa quantidade relativa de esporozoítos produzidos (8-100).

Gêneros *Haemogregarina*, *Cyrlia* e *Desseria*

HEPATOZOIDAE Wenyon, 1926

Merogonia restrita aos tecidos, principalmente no fígado, baço e pulmões;

Oocistos relativamente grandes (100µm de diâmetro);

Milhares de esporozoítos produzidos.

Gênero *Hepatozoon*

1.2. GÊNERO *HEPATOZOON*

A espécie-tipo do gênero *Hepatozoon*, *H. muris*, descrita inicialmente como *H. perniciosum* por Müller (1908). O autor observou gametócitos no interior de leucócitos de um roedor e a esporogonia no ácaro *Laelaps echidninus* após o repasto destes sobre roedores infectados. O autor descreveu a associação dos gametócitos em sizígia e a entrada na parede do estômago dos invertebrados, dando origem, após várias divisões assexuais, a oocistos com centenas de esporocistos contendo esporozoítos. Os ácaros com oocistos formados foram infectivos após ingestão por ratos limpos. Foi também observada a fase merogônica nas células do fígado do rato, presumivelmente com a entrada dos esporozoítos neste órgão. O nome do então novo gênero, *Hepatozoon*, teve origem no local onde foi observado o desenvolvimento assexual nos roedores, o fígado (Smith 1996).

Segundo Smith (1996), o gênero *Hepatozoon* inclui 46 espécies de parasitos de mamíferos, 19 de aves, 42 de anuros, 121 de serpentes, 74 de lagartos, 1 de salamandras e 6 de crocodilianos.

Estes parasitos apresentam ciclos heteroxênicos, ocorrendo em células sanguíneas e nas vísceras como fígado, pulmões, baço e rim de seus hospedeiros vertebrados. Só nos hospedeiros invertebrados, tais como ácaros, carrapatos, pulgas, piolhos, hemípteros, flebotomíneos, mosquitos, mutucas e sanguessugas, ocorre a formação de oocistos contendo grupos de esporocistos abrigando esporozoítos em números variados de acordo com a espécie, quando esta fase é

conhecida, o que é bastante raro. Estes invertebrados são considerados os hospedeiros definitivos, devido ao desenvolvimento sexual do parasito no interior dos mesmos.

Diversos estudos têm demonstrado que os hepatozoídeos apresentam baixa especificidade para seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (Ball et al. 1967, Landau et al. 1972). São heteroxênicos e seus ciclos podem incluir diversas vias de transmissão (Smith 1996). Uma das características marcantes dos parasitos do gênero *Hepatozoon*, e que os diferencia de parasitos filogeneticamente próximos, tais como os hemosporídeos do gênero *Plasmodium* (Barta et al. 2001, Merino et al. 2006), diz respeito à transmissão para os hospedeiros vertebrados. Os hepatozoídeos são transmitidos pela ingestão do vetor invertebrado portando esporozoítos dentro dos oocistos. Contrariamente, em *Plasmodium* spp. os esporozoítos são injetados no sangue dos hospedeiros vertebrados juntamente com a saliva durante o repasto sanguíneo dos mosquitos. Ou seja, nos *Plasmodium*, os esporozoítos têm as glândulas salivares como destino final no seu vetor natural, podendo ser transmitido pela saliva. Já em *Hepatozoon*, os esporozoítos, até onde se conhece, não invadem as glândulas salivares, ficando dentro dos oocistos aderidos à parede externa do intestino do vetor ou livres na cavidade geral, ou hemocele.

Nas espécies de *Hepatozoon* os esporozoítos são liberados no trato digestivo dos vertebrados que os ingerem, onde atravessam a mucosa e caem na circulação sanguínea, podendo, então, invadir órgãos como o pulmão, baço e fígado. Uma vez nas vísceras, inicia-se a fase de reprodução assexuada do ciclo, denominada

de merogonia. Os merozoítos formados deixam as células da víscera parasitada e penetram em eritrócitos ou leucócitos e, finalmente, transformam-se em gametócitos, as formas infectantes para o vetor. Após serem ingeridos pelo hospedeiro invertebrado durante hematofagia, os gametócitos se diferenciam em macrogametócito e em microgametócitos na luz do intestino. Em seguida os gametas se associam em sizígia e se fundem formando o zigoto, que se desenvolve formando a partir de então, o oocisto na parede externa do intestino ou na hemocele do vetor. Dentro do oocisto ocorre a esporogonia, que culmina com a formação de centenas de esporocistos contendo grupos de esporozoítos haplóides no seu interior. O ciclo se completa quando o vetor infectado, com os esporozoítos já formados, é ingerido pelo hospedeiro vertebrado (Desser 1993). Uma interessante variação do local de desenvolvimento esporogônico nos vetores invertebrados foi observada na espécie *Hepatozoon catesbiana*, parasito do anuro *Rana catesbeiana* (Desser et al. 1995). Mosquitos *Cx. territans*, colonizados em laboratório para a realização dos experimentos, realizaram repasto sanguíneo sobre anuros *R. catesbeiana* infectados com o parasito. Após 30 dias do repasto os mosquitos foram dissecados e os oocistos com esporozoítos formados foram encontrados exclusivamente nos túbulos de Malpighi. Embora exiba estas diferenças no ciclo exemplificamos, esquematicamente, um ciclo de *Hepatozoon* na Figura 2.

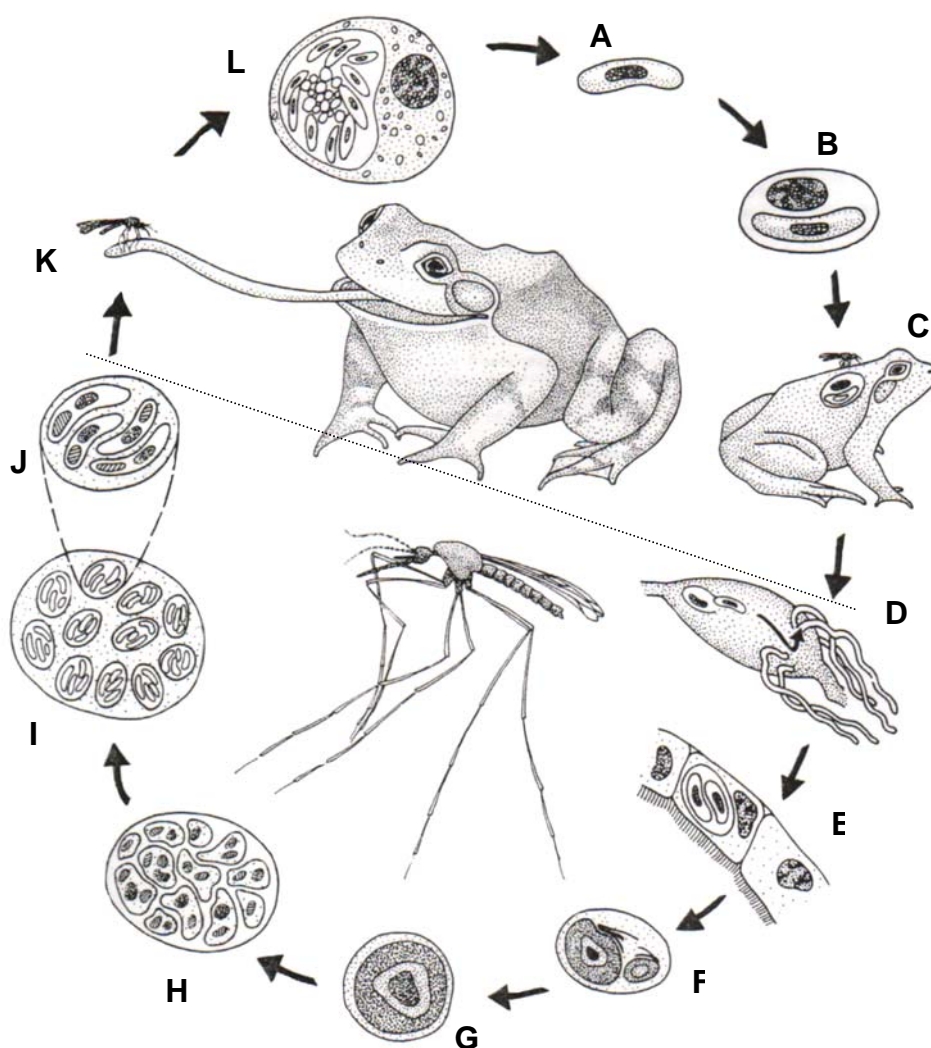


Figura 2. Representação do ciclo-de-vida do hepatozóideo *Hepatozoon catesbiana* no anuro *Rana catesbeiana* e no mosquito *Culex territans*. **A.** Merontes localizados no fígado dão origem a merozoítos que penetram nos eritrócitos. **B.** Merozoítos transformam-se em gametócitos nos eritrócitos. **C.** Mosquitos alimentam-se em sapos infectados e ingerem gametócitos. **D.** Gametócitos saem dos eritrócitos no estômago dos mosquitos e penetram nos túbulos de Malpighi. **E.** Micro e macrogametócitos se juntam dentro de um vacúolo parasitóforo comum nas células dos túbulos de Malpighi. **F.** A gametogênese resulta na formação de dois microgametas biflagelados, um dos quais fecunda o macrogameta. **G.** O zigoto se expande formando oocistos esférico dentro dos tubos de Malpighi. **H.** Oocisto se segmenta formando vários esporoblastos. **I.** Esporoblastos se transformam em esporocistos. **J.** Cada esporocisto contém quatro esporozoítos. **K.** Sapos são infectados quando ingerem mosquitos contendo esporozoítos formados. **L.** Esporozoítos entram nas células do parênquima hepático e se desenvolvem formando os merontes. (Figura adaptada de Desser et al. 1995).

Rotas adicionais de transmissão incluem hospedeiros intermediários, a transmissão congênita, como já reportada em cobras com elevada parasitemia, e provavelmente o canibalismo (de Biase et al. 1972, Lowichik e Yaeger 1987, Murata et al. 1993, Lainson et al. 2003). Mas, não se sabe se estas rotas podem ocorrer em todas ou na maioria das espécies de *Hepatozoon*. No primeiro caso, a ingestão do vetor por um hospedeiro intermediário leva somente à formação de cistos com cistozoítos em suas vísceras, onde estes podem permanecer como estágios latentes do parasito provavelmente por períodos relativamente longos. A transmissão para os hospedeiros vertebrados intermediários pode ocorrer pela predação destes hospedeiros intermediários contendo os cistos (Landau et al. 1972, Lainson et al. 2003, Sloboda et al. 2008). Por exemplo, Lainson et al. (2003) observaram cistos com cistozoítos do parasito *H. caimani* no fígado do seu hospedeiro intermediário, o jacaré *Caiman crocodilus*, após a ingestão de anuros que também apresentavam cistos do parasito. Cistos monozóicos também foram observados em esquilos e cães (Desser 1990, Baneth e Shkap 2003). Tais evidências sugerem que para alguns sistemas parasito-hospedeiro, o canibalismo possa funcionar como uma via adicional de transmissão para os hepatozoídeos.

1.2.1. HEPATOZOÍDEOS EM CROCODILIANOS

Dentre os variados grupos de hospedeiros vertebrados, os crocodilianos apresentam uma das menores quantidades de espécies descritas no gênero *Hepatozoon* (Tabela 1) (Smith 1996). Na grande maioria das espécies de hemogregarinas de crocodilianos as descrições se basearam, unicamente, na observação de gametócitos intraeritrocitários na circulação sanguínea.

Constituem exceção às espécies *Hemogregarina crocodilorum*, *Hepatozoon petiti* e *Hepatozoon caimani*.

Descrita inicialmente como *Haemogregarina petiti* Thiroux 1910, *Hepatozoon petiti* foi estudada posteriormente por Hoare (1932) na Uganda. Hoare, durante uma expedição na região, que consistia numa antiga colônia inglesa, veio a descrever uma série de hematozoários de animais silvestres. Durante os estudos, o pesquisador teve a oportunidade de amostrar exemplares do crocodilo *Crocodylus niloticus* e observou gametócitos e também merontes nos eritrócitos dos crocodilianos, além de merogonia em células do fígado. Chatton e Roubaud (1913) descreveram a esporogonia de uma espécie de *Hepatozoon* não identificada em moscas tsetse *Glossina palpalis* silvestres, que foram observadas realizando repasto sanguíneo sobre lagartos ou crocodilos. Tais evidências levaram Hoare (1972) a utilizar *G. palpalis* colonizadas em laboratório para realização de repasto sanguíneo sobre crocodilos naturalmente infectados. Posteriormente, foram encontrados oocistos com centenas de esporocistos na cavidade geral destes dípteros. Revelado o desenvolvimento esporogônico do parasito, seu nome específico foi alterado de *Haemogregarina petiti* para *Hepatozoon petiti* (Thiroux). Infelizmente, não foram realizadas infecções experimentais via ingestão das moscas *G. palpalis* infectadas para crocodilos limpos.

Em um estudo sobre a prevalência da hemogregarina *Haemogregarina crocodilorum* no aligátor norte americano *Alligator mississippiensis*, Khan et al. (1980) observaram a ocorrência de merogonia do parasito nos eritrócitos de seis

exemplares do aligátor. A fase esporogônica também foi registrada em sanguessugas removidas diretamente dos aligátors. Contudo, a transmissão do parasito não foi conseguida com a ingestão de sanguessugas infectadas para *A. mississippiensis* limpos. Com isso, a transferência da espécie *Hemogregarina crocodilinarum* para o gênero *Hepatozoon* proposta por Smith (1996) foi criticada por Lainson et al. (2003). Com isso, Lainson et al. (2003) sugeriram a manutenção da espécie do parasito no gênero *Hemogregarina* até que mais estudos possam fornecer subsídios para uma designação genérica adequada. Portanto, não são conhecidos os vetores naturais de nenhum dos *Hepatozoon* de crocodilianos.

Um terceiro grupo de vetores, desta vez culicídeos, foram experimentalmente registrados como susceptíveis ao desenvolvimento esporogônico do *H. caimani*, parasito de jacarés. O histórico do conhecimento sobre este hepatozoídeo de crocodilianos brasileiros será fornecido em um tópico mais a frente.

Na região neotropical ocorrem doze espécies de crocodilianos, distribuídas nos gêneros *Melanosuchus*, *Crocodylus*, *Paleosuchus* e *Caiman* (Martin 2008). O único gênero que não apresenta representantes no Brasil é o *Crocodylus*. As espécies de crocodilianos que ocorrem no país são: *Caiman latirostris*, *Caiman yacare*, *Caiman crocodilus*, *Paleosuchus palpebrosus*, *Paleosuchus trigonatus* e *Melanosuchus niger*.

Até o presente momento, somente duas espécies do gênero *Hepatozoon* foram descritas em crocodilianos no país. *Hepatozoon serrei*, cujo registro de infecção se restringe ao jacaré *Paleosuchus trigonatus* e *H. caimani*, registrado nos jacarés *Caiman latirostris*, *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare* (ver revisão em Lainson et al. 2003). Provavelmente, o critério para descrição das espécies *H. serrei* e *H. caimani* tenha sido apenas o encontro destes parasitos em diferentes crocodilianos na América do Sul, ou seja, acreditamos que ambos possuem na verdade a mesma identidade específica. Gametócitos intraeritrocitários semelhantes aos de *H. caimani* presentes na circulação sanguínea do jacaré *Melanosuchus niger* também foram registrados nos estados do Pará, mas não há dados sobre a esporogonia destes parasitos encontrados nestes hospedeiros, o que não permite a confirmação do diagnóstico (R. Lainson, dados não publicados). Vale ressaltar que das seis espécies de crocodilianos que ocorrem no Brasil, a única espécie sem registro de infecção por hepatozoídeos é o jacaré *Paleosuchus palpebrosus*.

Tabela 1. Espécies de hemogregarinas registradas em crocodilianos.

HEMOGREGARINA	CROCODILIANO	REGIÃO
<i>Hepatozoon hankini</i> Simond 1901	<i>Gavialis gangeticus</i>	Ásia – Índia
<i>Hepatozoon caimani</i> Carini 1909	<i>Caiman latirostris</i> <i>Caiman yacare</i> <i>Caiman crocodilus</i>	América do Sul
<i>Hepatozoon serrei</i> Phisalix 1914	<i>Paleosuchus trigonatus</i>	América do Sul
<i>Hepatozoon petiti</i> (Thiroux 1910) Hoare 1932	<i>Crocodilus niloticus</i>	África
<i>Hepatozoon sheppardi</i> Santos Dias 1952	<i>Crocodilus niloticus</i>	África
<i>Haemogregarina crocodilinarum</i> Börner 1901	<i>Alligator mississippiensis</i> <i>Crocodilus frontatus</i>	América do Norte

1.3. O JACARÉ *CAYMAN YACARE* - HOSPEDEIRO VERTEBRADO DO *H.CAIMANI*

Os crocodilianos atuais pertencem à ordem Crocodylia, a qual é composta por três famílias: Crocodylidae, Gavialidae e Alligatoridae (Martin 2008). Os crocodilianos são muito mais adaptados ao ambiente aquático do que terrestre, podendo ser encontrados em áreas tropicais e subtropicais. Observados sobre a ótica evolutiva, esses vertebrados mudaram relativamente pouco, mantendo de modo geral sua morfologia conservada desde a era mesozóica (Brochu 2003). São considerados predadores generalistas e oportunistas, cuja dieta depende da diversidade de organismos presentes no ambiente e do tamanho dos próprios crocodilianos (Santos et al. 1996, da Silveira e Magnusson 1999). Podem se alimentar de animais vivos ou em decomposição, e até mesmo da mesma espécie, especialmente quando as presas são filhotes ou animais muito debilitados ou mortos.

Magnusson et al. (1987), estudando a dieta das espécies de jacarés amazônicos: *C. crocodilus*, *M. niger* e *P. palpebrosus*, verificaram que a composição da mesma foi praticamente idêntica para as três espécies, sugerindo que a obtenção dos alimentos esteve diretamente relacionada com os ambientes, rios e lagoas, ocupados pelos jacarés. A dieta também variou em relação ao tamanho dos animais, com indivíduos jovens alimentando-se principalmente de pequenos invertebrados, especialmente insetos e crustáceos, e com animais maiores foi observado um aumento gradual da frequência de vertebrados, tais como peixes, aves, anfíbios, e répteis. Contrariamente, animais maiores tenderam

a apresentar uma diminuição da frequência da ingestão de invertebrados. São animais que conseguem sobreviver por meses sem se alimentar em temperaturas baixas, um fato que também se deve às taxas metabólicas relativamente baixas exibidas por indivíduos de maior porte (Lang 1987).

O jacaré-do-Pantanal, *C. yacare* é uma das seis espécies de crocodilianos que ocorrem no Brasil. O *C. yacare* apresenta-se distribuído na Bacia do Rio Paraguai, sendo um animal muito comum no Pantanal dos estados brasileiros do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul, em áreas correspondentes da Bolívia e Paraguai, bem como na Argentina (Goombridge 1987). Apesar de ter sido um dos crocodilianos mais explorados no mundo pela caça ilegal, hoje o *C. yacare* é uma das espécies de maior densidade (>100 ind/km²) (Coutinho e Campos 1996).

A biologia do *C. yacare* está grandemente associada à dinâmica sazonal de secas e inundações do Pantanal, e a ocupação das diversas formações aquáticas, tais como rios e lagoas, pelos jacarés reflete estes processos a cada ano. O Pantanal é uma planície inundável de aproximadamente 138 mil Km², que faz parte da bacia do Rio Paraguai e que se situa na porção central da América do Sul. A parte alta da bacia do Rio Paraguai está em altitudes superiores a 200m e aproximadamente neste nível, em toda curva de nível, há uma queda brusca que vem a formar o Pantanal, correspondendo às terras baixas e região central da bacia, com altitudes inferiores a 80m (Carvalho 1986).

O Rio Paraguai recebe águas de numerosos afluentes que chegam ao Pantanal trazendo enorme quantidade de sedimentos, que se espalham pela

planície com as inundações dos rios que ocorrem na região (Carvalho 1986). Com a chegada do fim da época da cheia, parte da água regressa aos rios por canais e/ou o solo.

Desta maneira, o Pantanal apresenta uma alternância de estações chuvosas e secas, que variam plurianualmente, alternando ciclos de anos mais chuvosos ou mais secos (Adámoli 1986). Evidências da história da região do Pantanal sugerem que a mesma sempre apresentou um caráter instável, sujeita ora a extensas inundações permanentes, ora a secas prolongadas, com geadas frequentes durante o inverno a temperaturas que chegam a 40°C no verão (Brown Jr. 1986). Segundo o mesmo autor, a duração da estiagem é imprevisível, variando de ano a ano, fazendo com que exista uma forte pressão ambiental sobre as populações animais e vegetais na região.

Na estação das chuvas, que vai de março a outubro, ocorre o surgimento de novas áreas alagadas, especialmente pelo transbordamento dos rios. Nesse momento os animais iniciam um movimento de dispersão, com o surgimento de novas áreas para ocupação dos jacarés. Com o início da estação seca (maio a setembro), as áreas alagadas vão diminuindo e em muitos locais são formadas lagoas temporárias onde gradualmente concentram-se animais que ocupam o ambiente aquático, tais como capivaras, anuros, peixes, e o que nos interessa especificamente, os *C. yacare*. Esta situação provavelmente leva a um aumento da possibilidade de predação de anuros e peixes por jacarés *C. yacare*. Segundo Campos et al. (2003), a pressão ambiental pela diminuição drástica das coleções de água temporárias leva a movimentação de indivíduos entre áreas de lago e de

rio, devido à diminuição de alimentos, o estresse causado pelo aumento da densidade dos jacarés, ou perturbações antrópicas. Não se sabe se estes fatores influenciam a dinâmica de transmissão de parasitos, como o *H. caimani*, uma vez que podem aumentar o consumo de hospedeiros intermediários, como sapos ou até mesmo o canibalismo de animais mortos ou muito enfraquecidos por disputas por recursos, como território.

Ou seja, ao mesmo tempo, o período de seca leva a agregação dos jacarés e determina as atividades iniciais de corte e cópula, que atingem uma frequência maior em novembro, no início das chuvas. Todos os crocodilianos apresentam um comportamento reprodutivo, onde os machos competem entre si para manterem um grupo de fêmeas para cruzamento (Lang 1987). Após serem fecundadas, as fêmeas se deslocam em buscas de áreas para nidificação, cujo pico das atividades de posturas ocorre em janeiro, durante a estação chuvosa (Campos e Magnusson 1995).

A eclosão dos filhotes ocorre entre o final de março e início de abril, no auge dos alagamentos dos terrenos no Pantanal e, portanto quando os recursos hídricos são mais abundantes. Em muitas espécies de crocodilianos as fêmeas apresentam o comportamento de cuidado parental, protegendo seus filhotes contra predadores potenciais durante o tempo que estes permaneçam com ela (Lang 1987). Um estudo realizado por Cintra (1989), mostrou que as fêmeas de *C. yacare* acompanham seus filhotes por um período de aproximadamente seis meses. Por conta da nidificação e do cuidado com os filhotes, as fêmeas desta espécie parecem procurar locais remotos e deslocam-se pouco das áreas próximas

aos ninho, tornando mais difícil a sua captura que a dos machos. Os filhotes comem quase estritamente insetos durante o primeiro ano de vida, que vai de uma estação chuvosa, aquela em que eclodiram, até o final do ano subsequente, quando passam gradualmente a incluir pequenos vertebrados na dieta (Santos et al. 1996).

1.4. HEPATOZOON CAIMANI

1.4.1. Histórico taxonômico

Há exatamente 100 anos o protozoário parasita *Hepatozoon caimani* foi descrito no Brasil por Carini (1909) como *Haemogregarina caimani*. O autor observou gametócitos intraeritrocitários em esfregaços sanguíneos de três exemplares do jacaré-de-papo-amarelo, *C. latirostris*, capturados no Estado do Rio de Janeiro.

Mais tarde, Migone (1916) também observou gametócitos no sangue de jacarés *C. crocodilus* na região do Paraguai, mas não lhes atribuiu nenhum nome específico. Provavelmente o jacaré examinado por Migone seja, na verdade *C. yacare*, uma vez que *C. crocodilus* se distribui na região norte, na bacia do rio Amazonas e embora também no centro-oeste do Brasil, mas nas bacias dos rios Araguaia e Tocantins.

Vale citar que a descrição de Carini (1909) foi posteriormente criticada por Khan et al. (1980), por este ter utilizado como critério para designação específica do novo parasito apenas o fato de que até aquele momento nenhuma

hemogregarina havia sido descrita no hospedeiro, o jacaré *C. latirostris*, e não havia comparado as formas do parasito com hemogregarinas conhecidas até então de outros crocodilianos no mundo.

Lainson (1977) registrou o encontro de uma hemogregarina em jacarés *C. crocodilus* examinados na região de Bragança, estado do Pará. Verificou o padrão de desenvolvimento esporogônico do parasito em mosquitos *Culex fatigans*, com a formação de uma grande quantidade de esporocistos em cada oocisto, como observado por Pessoa et al. (1972). Lainson (1977) concluiu que o parasito pertencia ao gênero *Hepatozoon* e não a *Hemogregarina*. A seguir, comparações morfológicas e morfométricas das formas parasitárias das hemogregarinas encontrados anteriormente em *C. latirostris* e *C. crocodilus* (Carini 1909, Di Primio 1925; Pessoa et al. 1972) levaram Lainson et al. (2003) à conclusão de que os parasitos encontrados em seis exemplares de *C. yacare*, provenientes do estado de Mato Grosso, e de *C. crocodilus*, da região amazônica, se tratavam de uma única espécie, o *H. caimani*.

1.4.2. A multiplicação merogônica do *H. caimani* no hospedeiro vertebrado

O ilustre parasitologista brasileiro, Samuel Pessoa empreendeu uma série de estudos sobre hemogregarinas de répteis, sobretudo em serpentes mantidas no Instituto Butantan, no estado de São Paulo. Sua contribuição em estudos nesta área foi sumarizada em uma revisão sobre a frequência de hemoparasitos em serpentes brasileiras (Pessoa et al. 1974). Pessoa et al. (1972) examinaram dois exemplares de jacarés *C. latirostris* e encontraram gametócitos no interior de

eritrócitos, alguns já maduros exibindo uma cápsula no interior das células parasitadas. Examinando o fígado a procura do sítio onde ocorreria a reprodução assexuada nos jacarés (merogonia), os pesquisadores encontraram unicamente cistos contendo dois cistozoítos no fígado de um dos jacarés.

Lainson et. al. (2003) demonstraram local de desenvolvimento merogônico do *H. caimani* em crocodilianos brasileiros. O mesmo não havia sido encontrado em estudos realizados anteriormente (Carini 1909, di Primio 1925, Pessoa et al. 1972), provavelmente devido ao fato de que estes pesquisadores focaram suas buscas em vísceras como fígado, baço e pulmões, locais sabidamente associados ao desenvolvimento da merogonia em hepatozoídeos (Smith 1996). Curiosamente, Lainson et. al. (2003) ao sacrificarem dois *C. crocodilus* não infectados que haviam ingerido anuros com cistozoítos a aproximadamente 14 dias não encontraram gametócitos na circulação sanguínea dos répteis, mas observaram uma quantidade abundante de merontes na *lamina própria* do intestino delgado dos jacarés. Nenhum desenvolvimento assexual do parasito foi observado nas vísceras citadas acima.

1.4.3. A esporogonia do *H. caimani* nos seus hospedeiros invertebrados

Os primeiros estudos sobre a esporogonia de *H. caimani* foram conduzidos por Pessoa et al. (1972) mediante a realização de repasto sanguíneo com as sanguessugas *Haementeria lutzi*, o triatomíneo *Triatoma infestans* e os mosquitos antrópicos e criados em laboratórios, *Culex dolosus*. O desenvolvimento das formas esporogônicas foi observado somente em *Cx. dolosus*, e em taxas de

infecção relativamente baixas (3 positivos/91 dissecados). Nos mosquitos foram observados numerosos oocistos aderidos no estômago e na cavidade geral, e que quando maduros, ou seja, com esporozoítos já formados, mediram de 160 a 200 μ m. O período para o término do desenvolvimento esporogônico foi de aproximadamente 24 dias. O encontro de grande quantidade de esporocistos formados, de 100 a 120, dentro de cada oocisto, possibilitou concluir que o parasito se tratava de um hepatozoídeo, assim seu nome foi mudado para *Hepatozoon caimani*.

Lainson et. al. (2003) abordaram diversos aspectos do ciclo do parasito *H. caimani*, tais como o desenvolvimento esporogônico em mosquitos *Cx. quinquefasciatus* e a participação de anuros silvestres na transmissão do parasito para os jacares *C. crocodilus*. Este estudo, dentre outros aspectos, o conjunto das ilustrações e as descrições do período esporogônico e da evolução das formas do parasito no vetor tornou-se uma referência para o estudo dos *Hepatozoon* de crocodilianos.

Ainda em 2003, Paperna e Lainson realizaram um estudo sobre a ultraestrutura do desenvolvimento esporogônico do *H. caimani* em mosquitos *Culex quinquefasciatus*, após repasto sobre um *C. crocodilus* infectado. Foram encontrados oocistos uninucleados em mosquitos com 8-10 dias pós repasto (d.p.r.) e com 22 d.p.r. esporozoítos foram observados no interior dos oocistos aderidos ao estômago do mosquito.

1.4.4. Hospedeiros intermediários

Lainson et al (2003) demonstraram a transmissão do *H. caimani* para anuros *Lepidodactylus fuscus* e *Rana catesbeiana* após a ingestão de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* com oocistos esporulados. Cistos esféricos para ovais, contendo várias esferas formando o corpo residual e usualmente com um ou dois zoitos, mas raramente com mais de quatro, foram encontrados em quantidades abundantes principalmente no fígado dos anuros com 23-28 dias após a ingestão. Um exemplar de *C. yacare* ao ingerir o fígado de um *L. fuscus* contendo cistos do *H. caimani*, apresentou gametócitos intraeritrocitários aproximadamente 60 dias depois. Tais observações sugerem que os anuros podem participar como hospedeiros intermediários nos ciclos de transmissão do parasito. Curiosamente, cistos idênticos aos observados em anuros foram encontrados em *C. yacare* infectados pelo *H. caimani*, sugerindo uma possível via de transmissão por canibalismo entre jacarés (Lainson et al. 2003).

1.4.5 Prevalência do *H. caimani* em jacarés

A prevalência do *H. caimani* em populações de jacarés silvestres é pouco conhecida. Lainson (1977) registrou uma hemogregarina, provavelmente *H. caimani* em 46 de 60 (76.7%) jacarés *C. crocodilus* na região amazônica.

O segundo estudo de campo foi realizado na região do Pantanal, no estado do Mato Grosso do Sul, envolvendo o parasito *H. caimani* e o jacaré *C. yacare*. Entre setembro de 1998 e janeiro de 1999 foram amostrados 28 exemplares de *C. yacare* e foram encontradas hemogregarinas em 71,4 % (Viana e Marques 2005).

Este estudo, juntamente com as informações sobre infecções experimentais obtidas por Lainson et al. (2003), formam a base para o delineamento dos estudos realizados na presente tese, com o objetivo geral de esclarecer aspectos sobre a prevalência e transmissão do parasito *H. caimani* nos jacarés *C. yacare*.

2. JUSTIFICATIVA

O jacaré-do-Pantanal, *C. yacare*, foi caçado ilegalmente de maneira extensiva no passado, devido às demandas do mercado mundial de couro (Mourão et al. 1996). Mas, atualmente a espécie apresenta uma elevada densidade populacional na região do Pantanal, podendo ser encontrada formando grandes concentrações durante o período de seca (Coutinho & Campos 1996). Estudos que busquem fornecer informações sobre o parasitismo, como por protozoários em espécies de crocodilianos ameaçadas, ou que mereçam mais atenção com relação a sua conservação são de importância. Outra justificativa para estudos de prevalência de parasitos em jacarés repousa no fato de que o *C. yacare* possui criações legalizadas na região do Pantanal, o que acaba por facilitar a obtenção de animais não infectados para a realização de estudos experimentais. As informações advindas destes procedimentos auxiliam o entendimento das vias de transmissão que podem ocorrer no ambiente natural.

Um dos aspectos mais obscuros dos ciclos naturais de transmissão dos parasitos do gênero *Hepatozoon* está relacionado à determinação dos seus vetores no ambiente silvestre. O pouco conhecimento sobre a esporogonia de hepatozoídeos tem sido obtido pelo uso de artrópodes de colônias de laboratório, que em sua maioria não apresentam distribuição geográfica, hábitat e nem preferências alimentares associadas aos hospedeiros vertebrados (Hoare 1932, Pessoa et al. 1972, Lowichik et al. 1993, Lainson et al. 2003, Sloboda et al. 2007, Telford et al. 2008). Com efeito, quase nada se sabe sobre as espécies de mosquitos ou outros dípteros que se alimentam do sangue de crocodilianos.

Recentemente, Ferreira et al. (2000) registraram quatro espécies de tabanídeos que realizam naturalmente repasto no jacaré *C. crocodilus* e na serpente *Eunectes murinus* na região amazônica. Estudos sobre o hábito alimentar de mosquitos em animais de sangue frio estão geralmente associados a investigações sobre a transmissão de arboviroses empregando técnicas de biologia molecular e sorologia (Christensen et al. 1996, Cupp et al. 2004, Rodrigues and Maruniak 2004, Molaei et al. 2008, Burkett-Cadena et al. 2008).

Um vetor deve ter características específicas, dentre as quais ser atraído pelo hospedeiro, ser simpátrico, ocorrer em densidades demográficas suficientes para manter a transmissão e serem susceptíveis à infecção pelos parasitos, permitindo a finalização do ciclo esporogônico. Esse conjunto de informações não existe na literatura para espécies do gênero *Hepatozoon* que infectam crocodilianos no mundo.

Os hepatozoídeos possuem ciclos complexos que podem incluir diversos vertebrados e invertebrados (Landau et al. 1972, Paperna e Lainson 2004, Smith e Desser 1997). Além da transmissão por vetor, pouco se conhece sobre as vias de transmissão do *H. caimani* pela predação de hospedeiros intermediários e nada se conhece sobre a susceptibilidade de anuros que ocorrem em simpatria com o *C. yacare* na região do Pantanal, quanto ao parasitismo pelo *H. caimani*. Além disso, a constatação de cistos com cistozoítos no fígado de jacarés *C. crocodilus* experimentalmente infectados pelo *H. caimani* (Lainson et al. 2003), sugere que o comportamento de canibalismo, exibido por algumas espécies de crocodilianos

(Lang 1987, Rootes e Chabreck 1993), possa ser uma via de infecção para jacarés *C. yacare* limpos na região do Pantanal.

Diversos estudos têm demonstrado que nas infecções de hepatozoídeos em répteis, os gametócitos podem ser observados por longos períodos na circulação sanguínea dos seus hospedeiros (Sorci 1995, Široký et al, 2004, Amo et al. 2005). Široký et al. (2004), estudando a dinâmica da hemogregarina *Hemolivia mauritanica*-like em tartarugas *Testudo marginata* experimentalmente infectadas, constataram que gametócitos intraeritrocitários do parasito puderam ser encontrados na circulação sanguínea das tartarugas por pelo menos 15 meses, e em tartarugas naturalmente infectadas mantidas em cativeiro, o parasito foi observado por oito anos. Ball et al. (1967) registraram a persistência do parasitismo natural de *Hepatozoon rarefasciens* na serpente *Drymarchon corais* durante dois anos de acompanhamento. Nada se sabe quanto a esse aspecto em crocodilianos americanos.

Estudos filogenéticos do gênero *Hepatozoon* têm sugerido que o grupo deva ser dividido em dois gêneros, baseado na diversidade de ciclos presente no mesmo (Smith e Dessler 1997; Mathew et al. 2000, Jakes et al. 2003). Como exposto por Lainson (1995) em um estudo sobre o parasito malárico *Progarnia archeosauria* no jacaré *C. crocodilus*: “a presença de hemosporídeo em um membro da ordem Crocodylia é claramente de considerável interesse filogenético, devido a grande antiguidade dos crocodilianos, os quais mudaram relativamente pouco desde 160 milhões de anos atrás”. O levantamento dessas informações básicas no sistema parasito-hospedeiro formado pelo jacaré *C. yacare* e o hepatozoídeo *H. caimani* na região do Pantanal, podem contribuir com

estudos sobre a história evolutiva destes parasitos e no estabelecimento das relações filogenéticas dos hepatozoídeos.

Obs: as referências desta seção encontram-se ao fim da discussão geral.

- **3. OBJETIVO**

Verificar aspectos do parasitismo do jacaré *Caiman yacare* pelo protozoário *Hepatozoon caimani*.

- **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.1.1. Avaliar a prevalência, a carga parasitária e a distribuição do parasito *Hepatozoon caimani* em uma população silvestre de *Caiman yacare*.

Metas e estratégias

- Em uma população silvestre do jacaré *C. yacare*, determinar a influência do tamanho e o gênero dos *C. yacare* sobre a prevalência e a carga parasitária.
- Verificar a influência do tamanho/idade e peso dos jacarés *C. yacare* sobre a carga parasitária.
- Verificar a frequência da carga parasitária do *H. caimani* dentro da população natural do *C. yacare*.

3.1.2. Investigar o vetor natural de *Hepatozoon caimani*

Metas e estratégias

- Determinar o(s) vetor(es) natural(ais) do *H. caimani*, investigando as espécies de mosquitos que picam o hospedeiro vertebrado e realizando infecções experimentais em jacarés nascidos em cativeiro para confirmação da transmissão.
- Estimar a abundância sazonal e a taxa de infecção dos insetos vetores.

3.1.3. Investigar aspectos da dinâmica infrapopulacional do *Hepatozoon caimani* nos jacarés *Caiman yacare*.

Meta e estratégia

- Verificar a duração do período da infecção pelo *H. caimani* em jacarés *C. yacare* experimentalmente infectados.

3.1.4. Investigar a possibilidade de anuros participarem como hospedeiros intermediários do *Hepatozoon caimani* na região do Pantanal.

Meta e estratégia

- Verificar quais espécies de anuros simpátricas com o jacaré *C. yacare* na região do Pantanal são susceptíveis ao parasitismo *H. caimani* e capazes de infectar jacarés ao serem predadas.

3.1.5. Investigar o canibalismo como via de transmissão do *Hepatozoon caimani* na região do Pantanal.

Meta e estratégia

- Verificar a transmissão do *H. caimani* entre jacarés *C. yacare* pela ingestão de vísceras de jacarés infectados.

4. ORGANIZAÇÃO DOS CAPÍTULOS

No presente estudo foram verificados aspectos relacionados à prevalência e à transmissão do protozoário parasito *Hepatozoon caimani* em jacarés *Caiman yacare*, na região do Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul. Os resultados alcançados acham-se organizados em cinco capítulos.

O **Capítulo 1** trata da determinação da prevalência e distribuição da carga parasitária do *H. caimani* em uma população do *C. yacare*. A população de jacarés foi estratificada por tamanho/idade e gênero, para verificar em quais grupos as prevalências eram maiores e quais estariam em maior risco de infecção ou que apresentariam maiores cargas parasitárias. Também foram verificadas possíveis relações entre os níveis de parasitismo e dados biométricos como tamanho/idade e peso dos hospedeiros. Foram discutidas as vias de transmissão. Os dados foram reunidos em um artigo já aprovado para publicação no *The Journal of Parasitology*.

No **Capítulo 2**, descrevemos os vetores naturais do *H. caimani* para os jacarés *C. yacare*. Mediante a utilização de jacarés como isca, diversas espécies de culicídeos foram capturadas e dissecadas para procura de infecção natural pelo parasito. Os mosquitos do gênero *Culex*, sobretudo do subgênero *Melanoconion*, foram incriminados como vetores. Evidências como maior abundância nas coletas em jacarés, maior taxa de infecção natural e repasto sobre o *C. yacare*, e transmissão da infecção a jacarés limpos após a ingestão de mosquitos infectados naturalmente permitiram ainda incriminar a espécie *Cx. (Mel.) theobaldi* como o

vetor primário do *H. caimani* na região do Pantanal. Este manuscrito foi aceito para publicação no *Journal of Medical Entomology*.

Os elevados níveis de infecção do *H. caimani* encontradas na população do *C. yacare* no Pantanal, somado ao fato de que os culicídeos não se constituem em itens alimentares dos jacarés, levaram a hipótese de que a ingestão de vertebrados insetívoros, tais como anuros, pudessem ser considerado a principal via de transmissão do parasito para os crocodilianos. Com efeito, Lainson et al. (2003) já havia demonstrado a transmissão do *H. caimani* para jacarés *C. crocodilus* limpos após a ingestão de anuros portando cistozoítos do parasito presentes no fígado destes anfíbios. Como os anuros são itens relativamente frequentes na dieta de crocodilianos como o *C. yacare* (Santos et al. 1996), algumas espécies silvestres das famílias Leptodactylidae e Hylidae foram estudadas quanto a sua susceptibilidade à infecção pelo *H. caimani* e à possibilidade de transmitir o parasito para jacarés não infectados após serem ingeridos. No **Capítulo 3**, registramos o encontro de formas parasitárias chamadas de cistozoítos no fígado de exemplares do anuro *L. chaquensis* experimentalmente infectados e descrevemos a transmissão do parasito para jacarés limpos pela ingestão de anuros infectados. Discutimos ainda a possível importância de comportamentos reprodutivos dos anuros, tais como a agregação e vocalização dos indivíduos adultos em coleções de água, para a predação e conseqüente transmissão do *H. caimani* para o *C. yacare*.

Durante a realização do estudo da prevalência do *H. caimani* na população do *C. yacare* foi observado que em todas as amostragens sanguíneas bimensais os

animais adulto jovens e adultos apresentaram 100% de infecção (dados presentes no Capítulo 1). Uma possível hipótese para tal fato foi a ocorrência de infecções perenes nos jacarés infectados pelo parasito. No **Capítulo 4** descrevemos que após a realização de infecções experimentais do *H. caimani* em jacarés *C. yacare* e *C. latirostris*, estes crocodilianos permanecem infectados pelo parasito por um período de aproximadamente um ano de acompanhamento, a partir de uma única infecção. O processo parece independe da via de infecção, seja pela ingestão de vísceras de anuros com cistozoítos ou de mosquitos contendo esporozoítos.

Lainson et al. (2003) registraram o encontro de cistos contendo cistozoítos no fígado de jacarés *C. crocodilus* infectados experimentalmente pelo *H. caimani* e os autores postularam a possível transmissão do parasito através do canibalismo, um comportamento observado em algumas espécies de crocodilianos. Logo, continuando os estudos sobre as vias potenciais de transmissão do *H. caimani* para jacarés *C. yacare* na região do Pantanal, no **Capítulo 5** é relatada a transmissão do *H. caimani* para jacarés limpos após a ingestão de vísceras de um *C. yacare* naturalmente infectado.

CAPÍTULO 1

***HEPATOZOON CAIMANI* (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) IN WILD CAIMAN, *CAIMAN YACARE*, FROM THE PANTANAL REGION, BRAZIL**

Manuscrito aceito para publicação no **Journal of Parasitology**

Autores: **Lúcio André Viana**, Fernando Paiva, Marcos Eduardo Coutinho e
Ricardo Lourenço-de-Oliveira

Fotos ilustrativas dos procedimentos de captura e obtenção dos dados biométricos dos jacarés *C. yacare* e os dados brutos utilizados para os cálculos da prevalência e distribuição da carga parasitária podem ser visualizados nos anexos.

HEPATOZOON CAIMANI (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDEAE) IN WILD CAIMAN, CAIMAN YACARE, FROM THE PANTANAL REGION, BRAZIL

Lúcio André Viana, Fernando Paiva*, Marcos Eduardo Coutinho†, and Ricardo Lourenço-de-Oliveira

Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
e-mail: lucviana74@gmail.com

ABSTRACT: The prevalence and parasitemia of *Hepatozoon caimani* in the natural population of the caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal area, state of Mato Grosso do Sul, central Brazil, were evaluated according to gender and month of capture from July 2006 to February 2008. Blood samples were obtained bimonthly from a total of 229 caimans, and 76% were positive. Prevalence varied significantly according to sampling month and animal size. Almost all adults (100%) and young-adults (97%) were positive, while 63% of juvenile caimans were positive and all of the youngest individuals were negative. These results indicate that caimans are infected for the first time as juveniles. The mean parasitemia in blood was 13.5 ± 13.0 (n = 174; 1–96 parasites) and did not significantly vary with respect to gender, month of sampling, size, or weight of the caiman. The frequency distribution of parasites in the caiman population was aggregated. Differences in feeding habits and exposure to vectors between the youngest caimans and juveniles are hypothesized as the main risk factors for caimans to acquire *H. caimani* in central Brazil.

Species of *Hepatozoon* are intracellular protozoans that infect a wide range of vertebrates including amphibians, anurans, reptiles, birds, and mammals, in addition to several hematophagous invertebrates such as sandflies, leeches, ticks, and mosquitoes, which act as both vectors and definitive hosts (Desser, 1993). The parasite cycle is characterized by sporogonic development in hematophagous invertebrates, leading to the formation of oocysts with hundreds of sporocysts and sporozoites. Transmission is believed to occur when vectors are ingested by vertebrate hosts. Then, sporozoites trigger the merogonic phase inside several organs, e.g., spleen and liver. The cycle continues when gametocytes, which are present inside red blood cells and leucocytes in the peripheral blood circulation of vertebrate hosts, are ingested by hematophagous invertebrates (Smith, 1996).

In South America, the infection of crocodylians with species of *Hepatozoon* has been reported in *Caiman latirostris* and *Paleosuchus trigonatus* which are infected, respectively, with *Hepatozoon caimani* and *Hepatozoon serrei* (Smith, 1996). In recent years, these reports have included 2 more species, the caimans *Caiman crocodilus* and *Caiman yacare*, which are both infected with *H. caimani* (Carini) (Lainson et al., 2003). Parasitic forms similar to *H. caimani* have also been seen in erythrocytes of *Melanosuchus niger* (R. Lainson, pers. comm.). By means of a series of experimental infections, Lainson et al. (2003) observed both the complete sporogony of *H. caimani* in the mosquito, *Culex fatigans*, blood fed on infected *C. crocodilus* and the formation of cysts containing cistozoites in the liver of frogs, *Rana catesbeiana*, fed with infected mosquitoes. *Caiman crocodilus* showed gametocytes after feeding with infected frogs and *Cx. fatigans*.

The geographic distribution of the caiman *C. yacare* is limited to the Paraguay River basin and encompasses areas in the Pantanal in the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brazil, as well as in Bolivia, Paraguay, and Argentina (Goombridge, 1987). Although these crocodylians were victims of illegal hunting in the recent past, today they present high population

densities (>100 animals/km²) in several subregions of Pantanal (Coutinho and Campos, 1996).

The biology of *C. yacare* is associated with the seasonal dynamics of droughts and floods in the Pantanal, and the animals' occupation of several aquatic formations reflects these processes (Coutinho and Campos, 1996). Although several species of caimans in Brazil are infected with *Hepatozoon* spp., most studies report the parasitism in small samples of caimans. In the present study, we sought to describe the prevalence and the parasitemia of *H. caimani* in the wild caiman species, *C. yacare*, in the Pantanal of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil and to determine whether infection prevalence and parasitemia are associated with sex, age, or body condition.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The Pantanal is considered the largest flood plain in the world. It is located in the central region of South America and has an average altitude of 100 m and an area of about 140,000 km² (Godoi, 1986). This region is divided into 11 sub-regions based on physio-morphological and geopolitical characteristics (Silva and Abdon, 1998). According to the Köppen climate classification, the Pantanal has a sub-humid tropical climate (Aw), with an annual mean temperature ranging from 23 to 26 C. In the summer, absolute maximum temperatures may reach from 40 to 42 C. The annual average rainfall is around 1,100 mm, and there is a clear change between the dry season (April to September) and the rainy season (October to March) (Adámoli, 1986a; Silva-do-Nascimento and Lourenço-de-Oliveira, 2007). The *C. yacare* mating season comprises copula, pregnancy, nesting, and hatching, which mostly occurs in the rainy season (Crawshaw and Schaller, 1980).

The study was performed in the county of Aquidauana in the southeastern Pantanal in the state of Mato Grosso do Sul, subregion of Aquidauana, in the Rio Negro basin (19°30'18"S, 55°36'45"W). The vegetation is composed of different types of formations, ranging from semi-deciduous, seasonal, sub-mountainous forest at the slope of the Maracaju mountain range to permanently flooded areas, whose vegetation coverage is composed of free floating and fixed emergent plants. Components of Cerrado (savannah-like) vegetation prevail in non-flooding and seasonally flooded areas (Adámoli, 1986b).

Blood samples of wild caiman *C. yacare* were collected bimonthly from July 2006 to September 2007 and once in February 2008, for a total of 4 and 5 collections in the drought and flood periods, respectively. Caimans were captured at night by hand or by using nooses attached to long poles. Afterwards, they were marked in their tail ridges with a numbered plastic ring, and their snout-vent lengths (SVL) were measured. Sex was determined only in animals with SVL \geq 40 cm because it is not possible to determine sex in smaller caimans (Campos et al., 2004). Individuals captured were stratified into 4 SVL size groups: new hatchlings (\leq 25 cm);

Received 2 May 2009; revised 30 June 2009; accepted 6 August 2009.

*Laboratório de Parasitologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

†IBAMA/RAN, Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios, Rua 13 de Maio 2.967, Centro, 79002-351 Campo Grande, MS, Brasil.

DOI: 10.1645/GE-2150.1

TABLE 1. Prevalence and parasitemia of *Hepatozoon caimani* in the wild population of the caiman *Caiman yacare* in the Pantanal, Brazil, according to month of sampling.

Month	n	Positive (n)	Prevalence (%)	Parasitemia mean \pm SD
Jul 06	26	18	69	14.7 \pm 10.2
Sep 06	11	11	100	15.5 \pm 16.7
Nov 06	31	30	97	14.4 \pm 11.7
Jan 07	20	16	80	10.4 \pm 6.0
Mar 07	26	17	69	11.2 \pm 11.0
May 07	25	14	56	19.6 \pm 23.6
Jul 07	38	26	68	11.8 \pm 6.8
Sep 07	31	25	80	13.3 \pm 14.7
Feb 08	21	16	76	12.0 \pm 15.1

juvenile (26–50 cm); young adult (51–80 cm); and adult (>80 cm). The growth of caimans has multiple phases, mostly due to abiotic factors and to ontogenetic changes in their feeding habits. In addition, females tend to grow more slowly than males, resulting in a loss of the direct relationship between body growth and an animal's estimated age (Coutinho, 2000). Therefore, we have adopted size groups as an indirect age indicator. After blood sampling, caimans were released on the same day at site of capture. This study was approved by IBAMA, Brazilian Ministry of Environment (protocol number 02014.000785/2006-91).

Blood was obtained by cutting one of the nails; thin smears were air-dried, fixed in absolute methanol, and then stained with Giemsa. Infection with *H. caimani* was confirmed by searching for parasitic forms for up to 20 min in each smear using an optical microscope ($\times 400$). Parasitemia was determined by the number of parasites visualized per 2,000 erythrocytes, in 20 replicas of 100 erythrocytes (RBC), examined per field (Godfrey et al., 1987, 1990).

Statistical analysis

Data not presenting a normal distribution by D'Agostino-Pearson tests were analyzed by nonparametric tests (Zar, 1996). The distribution of *H. caimani* among wild caiman was determined by the index of dispersion (ID; variance by the mean of parasitemia) and by the discrepancy index (*D*) (Scott, 1987; Esch and Fernández, 1993; Poulin, 1993). Spearman's rank correlation coefficient (r_s) was used to determine possible correlations between the parasite intensity and the weight and the size:age (SVL) of animals. Parasite intensity was analyzed considering the month when samples were collected and size groups were analyzed using the Kruskal-Wallis test. The Mann-Whitney *U*-test was used to verify differences between parasitemia based on sex and the reproductive period in adult males. This analysis was not performed for females due to the small number of adult females captured in the study ($n = 5$).

To determine the parasite distribution pattern, the Quantitative Parasitology 3.0 programme was used (Rozsa et al., 2000), and further analyses were performed with Systat 12.0 (SYSTAT, 2007). Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

From July 2006 to February 2008, 229 caimans *C. yacare* were captured; the prevalence of *H. caimani* in the total population was 76%. There was no significant difference between the prevalence in males (98%; $n = 99$) and females (100%; $n = 61$) ($\chi^2 = 0.1479$; $df = 1$; $P = 0.700$). Sixty-nine animals (SVL ≤ 40 cm) were not sexed as it was not possible to determine their sex; however, the prevalence observed in these 69 caimans was relatively low (23%) when compared to that in confirmed males and females.

Variations observed in the prevalence of *H. caimani* in the sampled month ($\chi^2 = 18.520$; $df = 7$; $P = 0.010$; Table I) should be considered with caution, as detection depends essentially on the

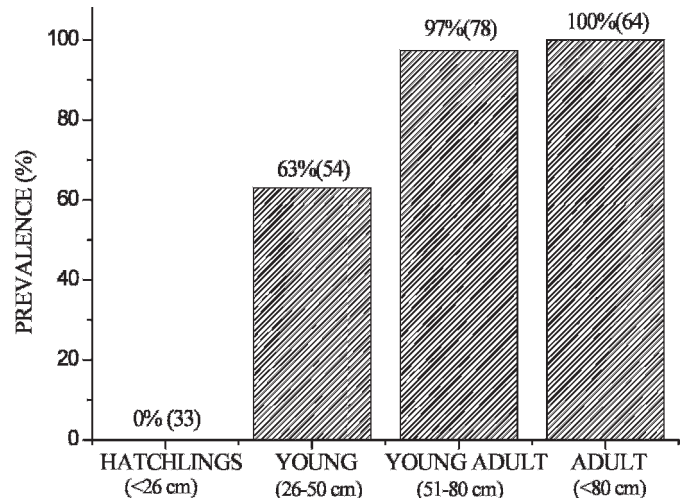


FIGURE 1. Prevalence of *Hepatozoon caimani* according to host size class of the caiman *Caiman yacare*. The prevalence (%) and the number of animals examined in each class are given above the respective bar.

animal's age at the time of examination in each sampling. Variation in prevalence values in juveniles ($n = 54$), and the successful capture of caimans from this age group as well as of hatchling caimans ($n = 33$) in each sampling, influenced the general prevalence throughout the sampling period, as all, or virtually all, adult ($n = 64$) and young-adult animals ($n = 78$) were infected with *H. caimani* (Fig. 1). *Hepatozoon caimani* prevalence differed significantly among the size groups ($\chi^2 = 213.48$; $df = 3$; $P < 0.001$).

To determine in which size or group the highest probability of infection with *H. caimani* occurred, juvenile caimans were subdivided into 5 size subgroups. Infection was only detected in the blood of animals with an SVL over 31–35 cm (57%) (Fig. 2).

The mean parasitemia per infected host was 13.5 ± 13.0 ($n = 174$; range 1–96 parasites). Parasite distribution in the *C. yacare* population was typically aggregated (ID = 15.78; $D = 0.587$), where few individuals presented high numbers of parasites in the

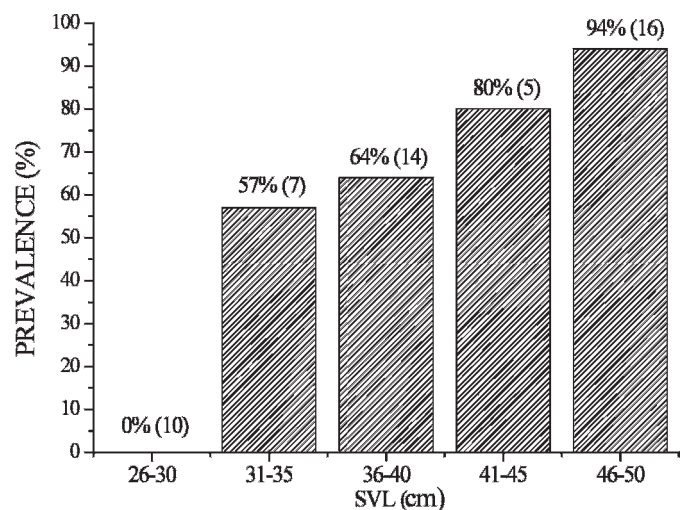


FIGURE 2. Prevalence of *Hepatozoon caimani* according to sub-groups of juvenile caimans *Caiman yacare*. The prevalence (%) and the number of animals examined in each class are given above the respective bar.

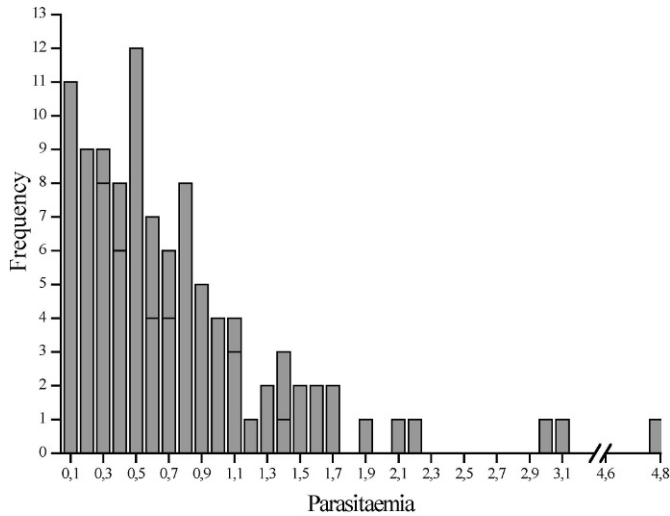


FIGURE 3. Distribution of parasitemia of *Hepatozoon caimani* in the caiman *Caiman yacare*.

peripheral blood (Fig. 3). Parasite numbers per host did not differ when measured according to the different sampling months (Kruskal–Wallis test, $H = 5.046$; $P = 0.752$) (Table I) or between adult (14.4 ± 13.3), young-adult (13.0 ± 11.5), and juvenile animals (12.7 ± 15.6 ; Kruskal–Wallis test, $H = 4.596$; $df = 2$; $P = 0.100$). Parasite intensities in adult male caimans did not differ significantly (Mann–Whitney U -test = 326.0; $df = 1$; $P = 0.315$) between animals examined during the reproductive period of the rainy season and those examined during the dry season. This analysis was not performed in females due to the small number of females caught ($n = 5$).

The mean parasite intensity for *H. caimani* in male caimans was 14.2 ± 12.9 ($n = 97$) and 12.3 ± 10.4 ($n = 61$) for females, with no significant difference between genders (Mann–Whitney U -test = 2616.0; $df = 1$; $P = 0.221$).

A correlation was not observed between the parasitemia and the SVL (relationship between size and age) ($n = 171$; $r_s = 0.182$; $P = 0.017$; Fig. 4A) or the weight ($n = 169$; $r_s = 0.160$; $P = 0.036$; Fig. 4B) of the animals examined.

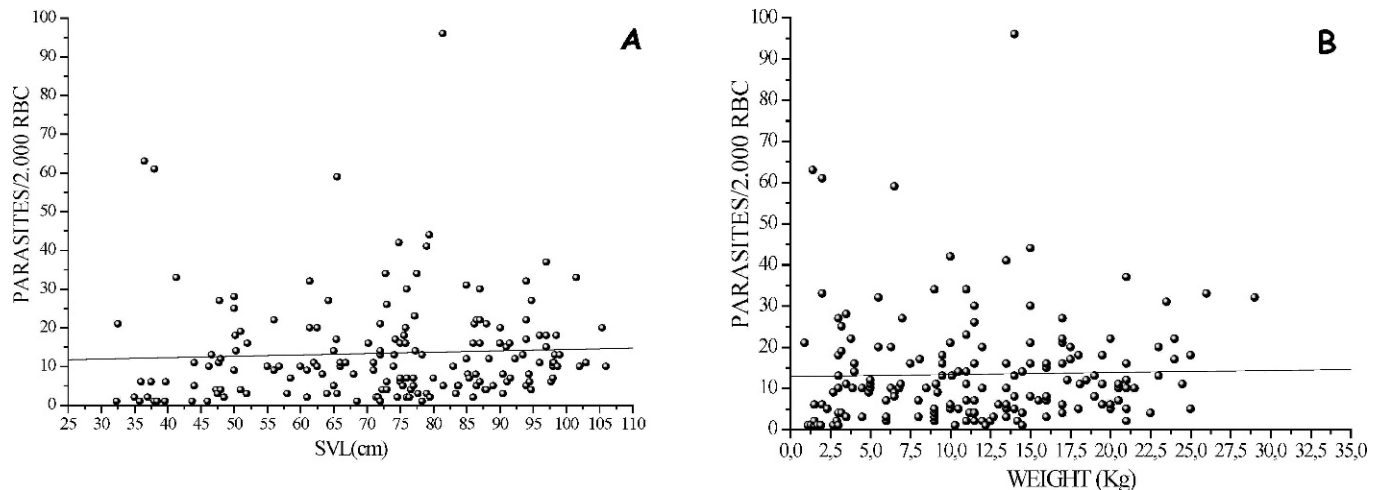


FIGURE 4. Relationship between the parasitemia with size (snout-vent lengths, SVL) (A) and weight (B) in the caiman *Caiman yacare*.

DISCUSSION

An understanding of parasite prevalence and intensity in a host population of hosts, and the consequences of parasite persistence in the population, is essential to understanding the interaction between parasites and hosts in nature (Bonsall, 2002). The intensity of parasite infection present in the host population may vary in response to several factors, both in terms of prevalence and parasitemia (Salkeld and Schwarzkopf, 2005). These factors include the host age: size (Sandland and Minchella, 2003), sex (Zuk and McKean, 1996), body condition (Jokela et al., 1999; Brown et al., 2000), population density (Oppliger et al., 1998), reproductive investment (Richner et al., 1995; Nordling et al., 1998), vector bite rate, length of the sporogonic cycle of the parasite in vector, the longevity of the vector (Koella, 1999), and abiotic conditions of the environment.

The present study represents the largest sampling of crocodylians to investigate infection with hemogregarines ($n = 229$). Results suggest that the prevalence of hepatozoid parasites in crocodylians of the genus *Caiman* may be higher than in other genera. No significant differences have been observed in the prevalence of haemogregarines in the crocodylians belonging to other genera regarding an animal's gender (Khan et al., 1980; Viana and Marques, 2005). The high prevalence of *H. caimani* in *C. yacare* found in the present study (76%) was similar to that reported in a sample of caimans in the western Pantanal (71.4%, $n = 28$) (Viana and Marques, 2005) and in *C. crocodilus* in the Amazonian region of Brazil (76.7%, $n = 60$) (Lainson, 1977). In contrast, the prevalence of *Haemogregarina crocodylinorum* in *Alligator mississippiensis* (59%; $n = 130$) in the southern United States, and of *Hepatozoon pettiti* in *Crocodylus niloticus* (55%; $n = 38$) in South Africa, was considerably lower (Khan et al., 1980; Lovely et al., 2007). Among other factors, variations in population density of vertebrate hosts and of vectors may account for differences observed in the prevalence of these parasites between male and female crocodylians, as well as amongst transmission areas (Grenfell and Dobson, 1995).

The high prevalence of *H. caimani* in young adult (97%) and adult caimans (100%), and the absence of blood parasites in hatchlings, contrast with the prevalence of 57% found in juveniles over 31–35 cm of SVL. The prevalence of infection thus increased

with respect to animal size, suggesting that *H. camini* recruitment begins in the Pantanal when *C. yacare* are juveniles. Furthermore, when juvenile caimans were regrouped into the 5 subclasses according to SVL, parasites were only detected in animals with SVLs over 31–35 cm (57%).

Apparently, differences in the feeding habits of hatchling and juvenile caimans (SVL \leq 30 cm), compared to those of larger caimans, are key determinants in the risk of infection with *H. camini*. It is known that under natural and semi-natural conditions, *C. yacare* reach a mean size of 25 cm SVL (18.2–34.3 cm) at the end of their first year of life, during which time they feed essentially on invertebrates, particularly arthropods (Uetanabaro, 1989; Santos et al., 1996; Coutinho, 2000). From the second year on, when they reach a mean size of 35–40 cm SVL, juvenile *C. yacare* gradually start adding small vertebrates to their diet, such as anurans and small fishes (Santos et al., 1996; Coutinho, 2000). In the present survey, *H. camini* was found in blood smears in juveniles of 35–40 cm SVL, suggesting that, during this developmental phase, the transmission through predation of paratenic hosts may play a very important role in infection. Transmission of *Hepatozoon* spp. by predatory vertebrate paratenic hosts such as anurans has been reported for snakes (Landau et al., 1972; Smith et al., 1994). Lainson et al. (2003) have shown an experimental infection of *C. crocodilus* with *H. camini* by ingestion of the anurans *Leptodactylus fuscus* and *Rana catesbeiana* presenting *H. camini* cysts in their viscera. Therefore, the first infections of *C. yacare* in the Pantanal with *H. camini* are suggested to occur mainly when they are 1.5- to 2.0-yr-old.

Most *C. yacare* eggs hatch during the rainy season (Cintra, 1988). Generally, caimans are from 1.5- to 2.0-yr-old (35–40 cm CRC) at the end of the rainy season (October to March) and at the beginning of the dry season of the following year after hatching. Thus, this is the first time that they experience the flooding season in the Pantanal, when water impoundments, such as lakes and swamps, are stabilized. Consequently, there is a great abundance of both mosquitoes and anurans at this time (Prado et al., 2000). In addition, the high mosquito bite rate increases both the probability of infection of mosquitoes by feeding on infected caimans and of the anurans that prey upon infected mosquitoes, culminating in the formation of cysts of *H. camini* in the viscera of the anurans (L. Viana and R. Lourenço-de-Oliveira, pers. obs.). At the same time, anurans increase reproductive activity in the same water impoundments, which may increase the possibility of their acquisition via predation by juvenile caimans. The possibility that hatchling and juvenile caimans may become infected by ingesting infected mosquitoes in nature should not be excluded, since the experimental transmission of *C. crocodilus* with *H. camini* has been confirmed by the ingestion of *Cx. fatigans* mosquitoes infected with the parasite (Lainson et al., 2003). However, blood sample examinations of 20 hatchling *C. yacare* (mean of 29.6 cm SVL, range 18.2–34.3 cm) that were kept under semi-natural conditions from the time of hatching in an *H. camini* transmission area, and naturally fed only with wild arthropods, were negative for *H. camini* (L. Viana, pers. obs.).

The high prevalence observed in young adult and adult *C. yacare* may be due to potential repeated infections throughout the life of caimans in the Pantanal, considering the high abundance of culicids, the natural vectors of *H. camini*, throughout the year (L. Viana and R. Lourenço-de-Oliveira, pers. obs.), or to the long

viability of erythrocytes (RBC) in crocodylians (Campbell, 1996). RBC viability in *A. mississippiensis* is estimated to be 300 days at 31 C, which suggests that intra-erythrocytic parasite forms, such as *H. camini*, may live for relatively long periods in the blood circulation (Davies and Johnston, 2000). Long infections with hemogregarines are relatively common in reptiles such as snakes (Vieira-Santos et al., 2005), lizards (Schall, 1986; Sorci, 1995; Amo et al., 2005), and turtles (Široký et al., 2004). For example, turtles (*Testudo marginata*) experimentally infected with *Hemolivia mauritanica*-like parasites presented an infection for at least 15 mo, and parasite intensities in individuals that were naturally infected and kept in captivity persisted for 8 yr, possibly due to the occurrence of successive merogonic phases of the life cycle (Široký et al., 2004). *Hepatozoon camini* was diagnosed for at least 1 yr in the blood of a juvenile *C. yacare* that was naturally infected and kept out of the transmission area (R. Viana, pers. obs.), suggesting that long infections also occur in these caimans.

Findings of the few studies on parasite intensity by hemogregarines in reptiles have also been described in lizards (Sorci, 1995; Smallridge and Bull, 2001; Amo et al., 2005; Salkeld and Schwarzkopf, 2005). In the present study, parasite intensity and aggregation found in the sampled population of *C. yacare* could not be related to the animals' gender, age, size, or weight. Individual immune response, the existence of parasite evasion mechanisms, and the potential existence of niches with a higher risk of infection in the host's natural environment are some factors that may explain this result.

The caiman's parasitemia did not present significant differences when considering gender and parasite intensity in male caimans examined during the reproductive period versus the non-reproductive period. The small variation in parasite intensity over time suggests an enzootic stability of *H. camini* in the wild population. Factors that account for the persistence of hemogregarines in their vertebrate hosts are still unknown. Species of *Hepatozoon* are characteristically intracellular organisms, and their development may lead to structural changes in the parasitized red blood cells, as seen in infections in snakes (Daly et al., 1984; Nadler and Miller, 1985). It remains unknown if these changes in parasitized red blood cells may be recognized as non-self, or induce an effective immune response in their natural hosts, or both. Wozniak et al. (1996) reported inflammatory lesions in lizards experimentally infected with *Hepatozoon mocassini*, a parasite of the snake *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, but they did not detect the same reactions in natural hosts. Elimination or decrease of parasitemia in hemogregarines has been observed in a few studies with reptilians (Smallridge and Bull, 2001; Salkeld and Schwarzkopf, 2005). After experimental reinfection with *Hemolivia mariae* in the lizard *Tiliqua rugosa*, both a decrease of the prepatent period and of the parasite intensity were observed when compared with prime-infected animals, suggesting that the immune response could control the parasite population (Smallridge and Bull, 2001). Signs of elimination of hemogregarines have been reported only in the lizard, *Eulamprus quoyii*, infected with *Hepatozoon hinuliae* (Salkeld and Schwarzkopf, 2005).

The lack of relationship between parasitemia and weight or size, and the absence of a significant difference between parasitemia in adult caimans sampled in and out of the reproductive period, should be considered with caution, given the sampling characteristics of this study. Thus, different caimans were examined during the course of the sampling period and these

variables probably depend, to some extent, on intrinsic variables associated the individual hosts. Cohort studies may provide a better understanding of the parasite–host system under natural conditions by sampling of the same individuals in and out of reproductive periods in the Pantanal.

The high prevalence of *H. caimani* in the wild population of the caiman *C. yacare*, mainly in animals over 1.5- to 2.0-yr-old, is an indication that the Pantanal is a region that presents very favorable conditions for parasite transmission. However, the possible transmission pathways in nature remain unknown for this parasite–host system.

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul) and CAPES for financial support. We thank Joilson Barros and Débora Coutinho for the support in the field work, and Eduardo Tavares and 2 referees for their helpful suggestions.

LITERATURE CITED

- ADÁMOLI, J. 1986a. Dinâmica das inundações no Pantanal. *In* Anais do I Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil, p. 51–61.
- . 1986b. Fitogeografia do Pantanal. *In* Anais do I Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil, p. 105–106.
- AMO, L., P. LÓPEZ, AND J. MARTIN. 2005. Prevalence and intensity of haemogregarine blood parasites and their mite vectors in the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *Parasitology Research* **96**: 378–381.
- BONSALL, M. 2002. Evolutionary and ecological aspects of disease and parasitism. *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 401–403.
- BROWN, M. J. F., R. LOOSLI, AND P. SCHMID-HEMPEL. 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* **91**: 421–427.
- CAMPBELL, T. W. 1996. Clinical Pathology. *In* Reptile medicine and surgery, D. R. Mader (ed.). W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, p. 248–257.
- CAMPOS, Z., G. M. MOURÃO, M. COUTINHO, AND W. MAGNUSSON. 2004. Movimento e área de uso do Jacaré-do-Pantanal. *EMBRAPA-Pantanal. Boletim de Pesquisa* **57**. Corumbá, Brasil, 33 p.
- CINTRA, R. 1988. Nesting ecology of paraguayian caiman (*Caiman yacare*) in the Brazilian Pantanal. *Journal of Herpetology* **22**: 219–222.
- COUTINHO, M. E. 2000. Population ecology and the conservation and management of Caiman yacare in the Pantanal, Brazil. Ph.D. Dissertation. University of Queensland, Brisbane, Austrália, 272 p.
- , AND Z. CAMPOS. 1996. Effect of habitat and seasonality on the densities of caiman in southern Pantanal, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* **12**: 741–747.
- CRAWSHAW, P. G., AND G. SCHALLER. 1980. Nesting of Paraguayan caiman, *Caiman yacare*, in Brazil. *Papeis Avulsos de Zoologia* **33**: 283–292.
- DALY, J. J., R. C. McDANIEL, J. W. TOWNSEND, AND C. H. CALHOUN, JR. 1984. Alterations in the plasma membranes of *Hepatozoon*-infected snake erythrocytes as evidenced by differential staining. *Journal of Parasitology* **70**: 151–153.
- DAVIES, A. J., AND M. R. L. JOHNSTON. 2000. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. *Advances in Parasitology* **25**: 1–107.
- DESSER, S. S. 1993. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. *In* Parasitic protozoa, vol. 4, N. Levine (ed.). Academic Press, New York, New York, p. 247–272.
- ESCH, G. W., AND J. C. FERNÁNDEZ. 1993. A functional biology of parasitism: Ecological and evolutionary implications. Chapman & Hall, London, U.K., p. 337.
- GODFREY, JR., R. D., A. M. FEDYNICH, AND D. B. PENCE. 1987. Quantification of haematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* **23**: 558–565.
- , D. B. PENCE, AND A. M. FEDYNICH. 1990. Effects of host and spatial factors on a haemoproteid community in mourning doves from western Texas. *Journal of Wildlife Diseases* **26**: 435–441.
- GODOI, J. D. 1986. Aspectos geológicos do Pantanal Mato-grossense e de sua área de influência. *In* Anais do I Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, Embrapa-DF (ed.). Embrapa Pantanal, Corumbá, Brasil, p. 63–76.
- GRENFELL, B. T., AND A. P. DOBSON. 1995. Ecology of infectious diseases in natural populations. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 521 p.
- GROOMBRIDGE, B. 1987. The distribution and status of world crocodylians. *In* Wildlife management: Crocodiles and alligators, G. J. W. Webb, S. C. Manolis, and P. J. Whitehead (eds.). Surrey Beatty & Sons Pty. Limited, Austrália, p. 9–22.
- JOKELA, J., C. M. LIVELY, J. TASKINEN, AND A. D. PETERS. 1999. Effect of starvation on parasite-induced mortality in a freshwater snail (*Potamopyrgus antipodarum*). *Oecologia* **119**: 320–325.
- KHAN, R. A., D. J. FORRESTER, T. M. GOODWIN, AND C. A. ROSS. 1980. A haemogregarine from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Parasitology* **66**: 324–328.
- KOELLA, J. C. 1999. An evolutionary view of the interactions between anopheline mosquitoes and malaria parasites. *Microbes and Infection* **1**: 303–308.
- LAINSON, R. 1977. *Trypanosoma cecili* n. sp., a parasite of the South American cayman *Caiman crocodilus crocodilus* (Linnaeus 1758) (Crocodylia: Alligatoridae). *In* Protozoology, vol. III, E. U. Canning (ed.). Clunbury Cottrell Press, Berkhamstead, U.K., p. 87–93.
- , I. PAPERNA, AND R. D. NAIFF. 2003. Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**: 103–113.
- LANDAU, I., J. C. MICHEL, A. G. CHABAUD, AND E. R. BRYGOO. 1972. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de coccidie. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **38**: 250–270.
- LOVELY, C. J., J. M. PITTMAN, AND A. J. LESLIE. 2007. Normal haematology and blood biochemistry of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association* **78**: 137–144.
- MADSEN, T., B. UJVARI, AND M. OLSSON. 2005. Old pythons stay fit; effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia* **142**: 407–412.
- NADLER, S. A., AND J. H. MILLER. 1985. Fine structure of *Hepatozoon mocassini* (Apicomplexa, Eucoccidiorida) gamonts and modifications of the infected erythrocyte plasmalemma. *Journal of Protozoology* **32**: 275–279.
- NORDLING, D., M. ANDERSSON, S. ZOHARI, AND L. GUSTAFSSON. 1998. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **265**: 1291–1298.
- OPPLINGER, A., J. CLOBERT, J. LECOMTE, P. LORENZON, K. BOUDJEMADI, AND H. B. JOHN-ALDER. 1998. Environmental stress increases the prevalence and intensity of blood parasite infection in the common lizard *Lacerta vivipara*. *Ecology Letters* **1**: 129–138.
- POULIN, R. 1993. The disparity between observed and uniform distributions: A new look at parasite aggregation. *International Journal for Parasitology* **23**: 937–944.
- PRADO, C. P. A., M. UETANABARO, AND F. S. LOPES. 2000. Reproductive strategies of *Leptodactylus chaquensis* and *L. podicipinus* in the Pantanal, Brazil. *Journal of Herpetology* **34**: 135–139.
- RICHNER, H., P. CHRISTE, AND A. OPPLINGER. 1995. Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 1192–1194.
- ROZSA, L., J. REICZIGEL, AND G. MAJOROS. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology* **86**: 228–232.
- SALKELD, D. J., AND L. SCHWARZKOPF. 2005. Epizootiology of blood parasites in an Australian lizard: A mark-recapture study of a natural population. *International Journal for Parasitology* **35**: 11–18.
- SANDBLAND, G. J., AND D. J. MINCHELLA. 2003. Costs of immune defense: An enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends in Parasitology* **19**: 571–574.

- SANTOS, A. S., M. N. STOLL, M. S. PINHEIRO, Z. CAMPOS, W. E. MAGNUSSON, AND G. MOURÃO. 1996. Diets of *Caiman crocodilus yacare* from different habitats in Brazilian Pantanal. *Herpetological Journal* **6**: 111–117.
- SCHALL, J. J. 1986. Prevalence and virulence of a hemogregarine parasite of the Aruban whiptail lizard, *Cnemidophorus arubensis*. *Journal of Herpetology* **20**: 318–324.
- SCOTT, M. E. 1987. Temporal changes in aggregation: A laboratory study. *Parasitology* **94**: 583–595.
- SILVA, J. S. V., AND M. M. ABDON. 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília (Special issue)* **33**: 1703–1711.
- SILVA-DO-NASCIMENTO, T. F., AND R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. 2007. Diverse population dynamics of three *Anopheles* species belonging to the *Triannulatus* complex (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **102**: 975–982.
- SMALLRIDGE, C. J., AND C. M. BULL. 2001. Infection dynamics of *Hemolivia mariae* in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *Parasitology Research* **87**: 657–661.
- SMITH, T. G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology* **82**: 565–585.
- , S. S. DESSER, AND D. S. MARTIN. 1994. The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp. (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*). *Parasitology Research* **80**: 559–568.
- SORCI, G. 1995. Repeated measurements of blood parasites levels reveal limited ability for host recovery in the common lizard (*Lacerta vivipara*). *Journal of Parasitology* **81**: 825–827.
- . 1996. Patterns of haemogregarine load, aggregation and prevalence as a function of host age in the lizard *Lacerta vivipara*. *Journal of Parasitology* **82**: 676–678.
- ŠIROKÝ, P., M. KAMLER, AND D. MODRÝ. 2004. Long-term occurrence of *Hemolivia* cf. *mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregariniidae) in captive *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): Evidence for cyclic merogony? *Journal of Parasitology* **90**: 1391–1393.
- SYSTAT. 2007. Systat 12 for windows. Richmond, California.
- UETANABARO, M. 1989. Hábito alimentar de *C. c yacare* (Crocodilia, Alligatoridae) no Pantanal Sul-Matogrossense. M.S. Thesis. UNESP, Rio Claro-SP, Brasil, 79 p.
- VIANA, L. A., AND E. J. MARQUES. 2005. Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodilia: Alligatoridae) from Pantanal, Corumbá, MS, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **14**: 173–175.
- VIEIRA-SANTOS, M. M., L. H. O'DWYER, AND R. J. DA SILVA. 2005. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes, Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). *Parasitology Research* **97**: 94–97.
- WOZNAK, E. J., K. R. KAZACOS, S. R. TELFORD, JR., AND G. L. McLAUGHLIN. 1996. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian host. *International Journal for Parasitology* **26**: 141–146.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3rd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 662 p.
- ZUK, M., AND K. A. McKEAN. 1996. Sex differences in parasitic infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology* **26**: 1009–1024.

CAPÍTULO 2

CAIMAN-BITING MOSQUITOES AND THE NATURAL VECTORS OF *HEPATOZOON CAIMANI* IN BRAZIL.

Manuscrito aceito para publicação no **Journal of Medical Entomology**

Autores: **Lúcio André Viana**, Priscilla Soares, Fernando Paiva e Ricardo Lourenço-de-Oliveira

Fotos ilustrativas da esporogonia do *H. caimani* nos mosquitos

Cx. (Melanoconion) theobaldi podem ser visualizadas nos anexos.

1 Viana et al. 2009: Caiman-biting
2 mosquitoes and the natural vectors of
3 *Hepatozoon caimani* in Brazil.

4
5 Journal of Medical Entomology

Corresponding author:
Lourenço-de-Oliveira R.
Lab. Transmissores de Hematozoários
Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz
Av. Brasil, 4365 Manguinhos RJ
Phone: 55 21 25621237
Fax: 55 21 25734468
E-mail: lourenco@ioc.fiocruz.br

6
7
8
9
10 **Caiman-biting mosquitoes and the natural vectors of**
11 ***Hepatozoon caimani* in Brazil.**

12
13
14 **LUCIO ANDRÉ VIANA¹, PRISCILLA SOARES², FERNANDO PAIVA² AND**
15 **RICARDO LOURENÇO-DE-OLIVEIRA¹**

16
17
18 ¹ Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz,
19 Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP 21045-900, Brasil.

20 ² Laboratório de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul,
21 Campo Grande, MS, Brasil.

23 **ABSTRACT:** Mosquitoes that feed on crocodylians are poorly known, despite the potential
24 role of these exothermic animals as reservoirs of arboviruses. In this article, we assessed the
25 frequency, abundance and temporal variation of caiman-biting mosquitoes as well as
26 searched for the natural vectors of the blood parasite of caimans, *Hepatozoon caimani* in
27 the Pantanal area of central-western Brazil from captures conducted bimonthly from
28 September 2006 to September 2007 and in February 2008. A total of 5,272 mosquitoes
29 belonging to 10 species of five genera were caught on caimans. The most abundant species
30 were *Culex (Melanoconion) theobaldi*, *Mansonia (Mansonia) titillans*, *Ma. (Man.)*
31 *humeralis* and *Ma. (Man.) amazonensis*, which together accounted for 80% of all sampled
32 individuals. Other blood-feeding *Melanoconion* species were also found quite frequently on
33 caimans, including *Cx. clarki*, *Cx. idottus* and *Cx. bastagarius*. Oocysts of *H. caimani* were
34 exclusively detected in *Culex* species, mainly in individuals of the subgenus *Melanoconion*,
35 and we accomplished experimental transmission from naturally infected mosquitoes to
36 uninfected *Caiman yacare*. The highest infection rates were observed in *Cx. theobaldi*
37 (0.55%), which is therefore indicated as the primary vector of *H. caimani*. In addition,
38 because the above mentioned *Melanoconion* and *Mansonia* species are abundant,
39 widespread, and have a broad set of hosts, including crocodylians, they may be suggested as
40 potential vectors of arboviruses, such as West Nile virus, in the Southern Cone in South
41 America.

42

43 **KEYWORDS:** Caiman – mosquitoes – crocodylians – arbovirus – *Hepatozoon caimani*

44 INTRODUCTION

45 Mosquitoes that feed on cold-blooded animals are poorly known (Tempelis and
46 Galindo 1975, Klein et al. 1987, Cupp et al. 2004, Molaei et al. 2008). Despite the potential
47 role of crocodylians as viral amplifiers and reservoirs for arboviruses, such as the West Nile
48 virus (WNV, Klenk et al. 2004), there is no information on the mosquito fauna that bites
49 these reptiles in America; except for the description of three species that fed on *Alligator*
50 *mississippiensis* alligators from Florida, USA (Rodrigues and Maruniak 2004). To our
51 knowledge, nothing is known about mosquitoes that feed on neotropical crocodylians.

52 *Hepatozoon caimani* (Carini 1909) (Apicomplexa: Hepatozoidae), a parasite of
53 caimans, was described from intraerythrocytic gametocytes found in *Caiman latirostri*.
54 Haemogregarines, such as *H. caimani*, have complex life cycles, which may require several
55 vertebrate and invertebrate hosts. Schizogony and formation of the intraerythrocytic
56 gametocytes, which are infectious to the respective arthropod vector, occur in the vertebrate
57 host. Sporogony takes place in these haematophagous vectors, culminating in the formation
58 of sporozoites. Eight species of haemogregarines are known to infect crocodylians (Smith
59 1996), but the natural vectors are still to be identified. Hoare (1932) observed sporulated
60 oocysts of *Hepatozoon pettiti* in the haematophagous fly *Glossina palpalis* fed on an
61 infected crocodile *Crocodylus niloticus*. Khan et al. (1980) detected *Haemogregarina*
62 *crocodylinorum*, parasite of *A. mississippiensis*, in the leech *Placobdella multilineata*.
63 However, several experimental studies have failed to transmit haemogregarines to *A.*
64 *mississippiensis*, *C. latirostri*, *Caiman crocodylus* and *Caiman yacare* by leeches (Pessoa et
65 al. 1972, Khan et al. 1980, Lainson et al. 2003, LAV, unpublished data), reinforcing that
66 the natural vectors are among haematophagous dipterans.

67 The sporogony of *H. caimani* was described experimentally by Pessoa et al. (1972)
68 in the anthropic mosquito *Culex dolosus* bred in laboratory colonies. Lainson et al. (2003)
69 carried out a series of experimental infections and greatly improved the knowledge on the
70 life cycle of *H. caimani*: (i) the sporogony was reached in the house mosquito *Cx.*
71 *quinquefasciatus* (= *Cx. fatigans*) from laboratory-bred colonies, and (ii) the transmission to
72 *C. crocodilus* was attained by ingestion of infected mosquitoes and of visceral tissues of
73 frogs previously fed on infected *Cx. quinquefasciatus*. It is noteworthy that the findings of
74 Pessoa et al. (1972) and Lainson et al. (2003) resulted from laboratory experiments in
75 anthropic mosquitoes, and the scarce studies on the sporogony of hepatozoids have mostly
76 used laboratory-bred mosquitoes. Therefore, natural vectors of these blood parasites, just as
77 in *H. caimani*, remain unknown.

78 In this study, we aim to report the mosquito fauna that feeds on *C. yacare* and
79 ascertain the natural vectors of *H. caimani* in the Pantanal region. We assessed the
80 frequency, abundance and temporal variation of caiman-biting mosquitoes, the natural
81 infection rate of *H. caimani* in the mosquitoes and, accomplished the experimental
82 transmission of this parasite to uninfected *C. yacare* caimans.

83 MATERIALS AND METHODS

84 *Study area* - Field work was conducted at the Araraúna Farm (19°30'18''S; 55°36'45''W)
85 in the Negro basin, county of Aquidauana, south-eastern Pantanal, state of Mato Grosso do
86 Sul (MS), Brazil, as has been described previously (Viana et al. 2003). This site was
87 selected because of the high prevalence of *H. caimani* in *C. yacare* (100% and 97% of adult
88 and young-adult caimans were infected) (Viana et al. 2009). The Pantanal area is
89 considered the largest seasonal flood plain in the world with a sub-humid tropical climate
90 (Aw, Köppen classification), with an annual mean temperature ranging from 23°C to 26°C
91 and an annual average rainfall around 1,100 mm. The highest rainfall indices in Pantanal
92 are reported from October to March, and the dry season is from April to August-September
93 (Adámoli 1986, Silva-do-Nascimento and Lourenço-de-Oliveira 2007). The nearly flat land
94 surface of the Pantanal favours flooding of large areas during the rainy season, whereas
95 river branches and channels separate into uncountable water impoundments and swamps of
96 distinct size and depth, with exuberant floating and emerging vegetation at the beginning of
97 the dry season. In addition, main rivers and their tributaries are bordered by flat grassy
98 margins that flood late in the rainy season, forming large marshes. Thus, a variety of
99 mosquito larval habitats are available, particularly during the rainy season and river
100 overflows. In addition to semi-deciduous and gallery forests and low vegetation (floating
101 and fixed plants) at permanently flooded areas, the main vegetation all over non-flooded
102 and seasonally flooded sites is savannah-like (*cerrado*) (Adámoli 1986).

103

104 *Mosquito captures* - Caiman bait mosquito captures were performed from sunset to 20:30 h
105 during three consecutive days near a deciduous, sparsely treed gallery forest that grows
106 along the Correntoso River, a tributary of the Negro River. Captures were conducted

107 bimonthly from September 2006 to September 2007 and, additionally, in February 2008,
108 accounting for a total of eight captures (four in the drought and four in the flood periods). A
109 restrained >70 cm of snout-vent lengths (SVLs) caiman captured in the adjacent swamps
110 was used as bait for mosquito attraction and blood-feeding propensity evaluation.
111 Mosquitoes were captured with a manual aspirator and returned to the laboratory for
112 species identification using the key and species descriptions by Rozeboom and Komp
113 (1950), Pecor et al. (1992), Consoli and Lourenço-de-Oliveira (1994) and Forattini (2002).
114 Dissections for the search of the oocysts of *H. caimani* were performed with a microscope
115 (400x) up to the fifth day after each mosquito capture following procedures and sporogony
116 description by Lainson et al. (2003). Mosquitoes were considered infected only when they
117 showed oocysts containing sporocysts.

118

119 *Meteorological and hydrological data* – Rainfall was recorded monthly at a meteorological
120 station of the Agencia Nacional de Águas at Taboco (20°04'13''S 55°38'39''W), and data
121 on the water level of Correntoso River (Negro River basin) were obtained twice a month
122 from a hydrological station settled at Santa Maria farm. Both the meteorological and
123 hydrological stations are the closest to the mosquito collection sites in Aquidauna county.

124

125 *Per os transmission experiments* - Young caimans (\approx 25.0cm SVL; nearly 1.5 yrs old) used
126 in the transmission experiments were hatched and raised in captivity at the Cacimba de
127 Pedra commercial caiman farm located in Miranda, MS, from eggs collected in the wild.
128 At least one month before the transmission experiments, 10 young caimans were returned
129 to the laboratory located at a *H. caimani*-free area at the Federal University of Mato Grosso
130 do Sul (UFMS) in Campo Grande, MS. They were kept at room temperature in fibreglass-

131 lined concrete tanks (50% dry bottom and 50% with water of around 0.5 m depth), covered
132 on top with a nylon screen to avoid mosquitoes entering, and fed with bovine meat pellets
133 four times a week. The blood of these caimans was monitored several times for *H. caimani*
134 since their arrival at UFMS until their inoculation; all caimans were negative. Oocysts
135 containing mature sporocysts occasionally found in dissected naturally infected feral
136 mosquitoes were recovered in 0.9% NaCl and immediately administered in the anterior
137 portion of the oesophagus of young *C. yacare* with the aid of a long, thin, flexible stem and
138 a fine tip, disposable polyethylene dropper. Subsequently, blood samples were examined
139 nearly fortnightly beginning 15 days post-inoculation until at least 100 days. Blood smears
140 were made with blood obtained by cutting one of the nails, fixing the sample with absolute
141 methanol and then staining it with Giemsa at 10%. Infection with *H. caimani* was detected
142 by searching for parasitic forms for up to 20 min in each smear using an optical microscope
143 (400x magnification). Diagnosis was confirmed by the morphometric analysis of
144 gametocytes at 1000x magnification (Lainson et al. 2003). Two other young caimans from
145 the same batch taken to UFMS were used as a control. Their blood was monitored for *H.*
146 *caimani* for at least 120 days from their arrival and was always negative.

147 **RESULTS**

148 We captured 5,272 mosquitoes feeding on *C. yacare* comprising 10 species distributed
149 among five genera (Table I). The most abundant species were *Cx. theobaldi*, *Mansonia*
150 *titilans*, *Ma. humeralis* and *Ma. amazonensis*, which together accounted for 80% of all
151 sampled individuals. Because of difficulties in distinguishing females of *Cx. clarki* from
152 those of *Cx. idottus*, the frequencies of both were grouped. Among *Culex* species, *Cx.*
153 *theobaldi* was more abundant than the other congenics, such as *Cx. clarki* + *Cx. idottus*
154 and *Cx. bastagarius*.

155 Culicid distributions varied seasonally. A higher frequency of bites occurred in
156 March, July and September 2007 and February 2008 (Table I). *Mansonia* species (*Ma.*
157 *titilans*, *Ma. humeralis*, *Ma. amazonensis* and *Mansonia* sp.) were the most abundant in
158 September (91%). *Cx. theobaldi* was found in practically all sampling months, with
159 frequency peaks in March (n=628; 60% of the total collected) and July 2007 (n=208; 23%)
160 and February 2008 (n=475; 62%; Fig. 1). The mosquitoes *Cx. clarki* + *Cx. idottus* and *Cx.*
161 *bastagarius* had frequency peaks in January 2007 (n=157) and February 2008 (n=138),
162 respectively.

163 Mosquitoes, especially *Culex (Melanoconion)* species, were generally observed
164 biting around the eyes (Fig. 2), snout, and mouth of caimans; they also bit on the sides of
165 the caimans' chest, often between dermal plates. Interestingly, biting was observed even
166 when the caimans were immersed in water, but the mosquitoes assembled around the eyes
167 in these cases. Caimans did not display any defence behaviour during mosquitoes' landing
168 and blood meals (LAV, unpublished data).

169 Within 3,995 dissected culicids, 35 were found to have oocysts with sporocysts that
170 appeared to be *H. caimani* (Table II). Oocysts were detected exclusively in *Culex* species,
171 mainly in individuals of the subgenus *Melanoconion* (n=33) and occasionally in *Cx. (Cux.)*
172 *bidens* (n=2). In relation to the total dissected mosquitoes (Table II), the highest infection
173 rates were observed in *Cx. theobaldi* (0.55%), *Cx. clarki* + *Cx. idottus* (0.12%) and *Cx.*
174 *bidens* (0.05%). *Cx. theobaldi* accounted for most of the infections in 6 out of 8 sampling
175 months, with monthly infection rates ranging from 0.6 to 9.3% (Fig. 3). Oocysts in different
176 stages of development were found in the same mosquito, with both sporulated and
177 undifferentiated oocysts co-occurring. Sporulated oocysts were not found free in the
178 abdominal cavity, but externally attached to the midgut. Following the ingestion of
179 naturally infected mosquitoes, gametocytes were found in caimans' peripheral blood from
180 41 (*Cx. theobaldi*) to 94 days (*Cx. clarki* + *Cx. idottus*; Table III).

181 **DISCUSSION**

182 In this study, 10 species of mosquitoes were found feeding on *C. yacare*. and this is
183 the first report providing specific identification of mosquitoes that feed on a neotropical
184 crocodilian. The only other study describing crocodilian-biting mosquitoes was conducted
185 by Rodrigues and Maruniak (2004) at an alligator farm in Florida, USA, but only *Ma.*
186 *titillans*, *Ma. dyari* and *Cx. erraticus* were found to have engorged the alligator's blood.

187 *Hepatozoon* species seem not to be specific in relation to vertebrate and invertebrate
188 hosts (Smith 1996, Sloboda et al. 2007). However, among the five genera of culicids found
189 biting *C. yacare* in the Pantanal, oocysts of *H. caimani* were found exclusively in *Culex*
190 species. Indeed, *H. caimani* seems to be equally infectious to several *Culex* mosquitoes
191 under laboratory conditions, regardless of their haematophagous habits. Even
192 anthropophilic species, such as the house mosquito *Cx. (Cux.) quinquefasciatus* and the
193 peri-urban *Cx. (Cux.) dolosus*, which typically feeds on birds and mammals despite being
194 generalist, were successful in experimental transmissions (Pessoa et al. 1972, Almirón and
195 Brewer 1995, Paperna and Lainson 2003, Lourenço-de-Oliveira unpublished data).

196 In spite of its preference for rodents, *Cx. (Aed.) amazonensis* has already been
197 reported biting lizards in Panama (Tempelis e Galindo 1975). This species was also
198 observed biting caimans in this study, but its low relative frequency and the absence of
199 infection with *H. caimani* do not suggest that *Cx. (Aed.) amazonensis* participates in
200 parasite transmission. The same can be stated about *Cx. (Cux.) bidens*, which was found
201 naturally infected with *H. caimani*, but it seems to prefer feeding on endothermic animals
202 (Almirón and Brewer 1995, Lourenço-de-Oliveira and Heyden 1986) and was barely
203 observed biting caimans.

204 On the other hand, high infection rates were found among *Culex* species belonging
205 to the subgenus *Melanoconion*. Indeed, some mosquito species of this largely neotropical
206 subgenus have been reported to blood feed on other reptiles, such as turtles, lizards and
207 snakes (Tempelis and Galindo 1975, Cupp et al. 2004). Klein et al. (1987), studying the
208 transmission of *Plasmodium floridense* to the lizard *Anolis carolinensis*, found *Cx. (Mel.)*
209 *territans* and *Cx. (Mel.) erraticus* biting this reptile. Blood meals of *Cx. (Mel.) erraticus*
210 were also recorded in the alligator *A. mississippiensis* (Rodrigues and Maruniak 2006), and
211 *Cx. (Mel.) peccator* was found to feed on the cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorus*
212 (Cupp et al. 2004).

213 In the Pantanal region, *Cx. (Mel.) theobaldi* was the most abundant caiman-biting
214 mosquito and had the highest infection rate of *H. caimani*, found naturally infected in most
215 sampling months. According to the data presented in this study, *Cx. theobaldi* may be
216 indicated as the primary vector of *H. caimani*. This species is widely distributed, occurring
217 over South and Central America (Forattini and Sallum 1989, Hutchings et al. 2005), but
218 little was known about its haematophagous habits. *Cx. theobaldi* was once captured on a
219 horse (Forattini and Sallum 1989), and its preference for reptiles was unknown so far. This
220 *Melanoconion* species is chiefly active at night (Jones et al. 2004), and its immature stages
221 have been found both in temporary and permanently flooded areas of different extents and
222 under different levels of shading. Its frequency peaks in the rainy season in the Pantanal.
223 Then river overflow leads to floods on extensive plain areas with the formation of vast
224 marshes, favouring the spread of *Cx. theobaldi* and other *Melanoconion* species. It is likely
225 that in other regions of South America, the transmission of *Hepatozoon* species to other
226 crocodylians may also involve *Cx. theobaldi* or even *Cx. bastagarius*, *Cx. clarki* and *Cx.*
227 *idottus*, as the geographic range of these crocodylian-biting mosquitoes is wide and matches

228 the geographic range of vertebrate hosts, such as *C. latirostris*, *C. crocodilus*,
229 *Melanosuchus niger* and *Paleosuchus trigonatus* (Groombridge 1987). In the Amazon,
230 natural infection of *H. caimani* was confirmed in *C. crocodilus*, and gametocytes
231 corresponding to this parasite species were also detected in *M. niger* (Lainson 1977,
232 Lainson et al. 2003).

233 A possible means of transmission of *H. caimani* to *C. yacare* could be the accidental
234 ingestion of infected *Culex (Melanoconion)* mosquitoes while these are blood feeding
235 inside the caiman's mouth. Mosquitoes frequently bite in the caiman's mouth, which often
236 remain open-mouthed to thermoregulate (Pough et al. 2003). A similar mechanism was
237 proposed for the transmission of *H. pettiti* to the crocodilian *C. niloticus* that ingested
238 infected tsetse flies *G. palpalis* (Hoare 1932). However, this is not believed to be the main
239 transmission route of *Hepatozoon* spp. to reptiles, such as snakes and crocodilians, once the
240 invertebrate vectors are not included in the hosts' diet (Paperna and Lainson 2003, Sloboda
241 et al. 2007). It is likely that the natural transmission of *H. caimani* to the caimans like *C.*
242 *yacare* occurs mainly by the ingestion of paratenic hosts, such as frogs, as demonstrated
243 experimentally (Lainson et al. 2003).

244 This study is a contribution to the knowledge on culicid species that bite *C. yacare*
245 in the wild. Experimental studies with the alligator *A. mississippiensis* in North America
246 asserted the former as a potential amplifier host in the transmission of WNV. Alligators
247 also had viraemia levels capable of infecting mosquitoes (Klenk et al. 2004). It is not
248 known whether caimans, such as *C. yacare*, may play any role in the transmission of WNV
249 or any other arboviruses in South America. Pantanal harbours a rich avian fauna, acting as a
250 migration route to transitory species annually arriving from the southern part of the

251 continent as well as from the northern hemisphere (Figueira et al. 2006), and supports
252 rather high population densities of *C. yacare* and many culicid species. Komar and Clark
253 (2006) suggested that some boreal migrating bird species are responsible for the spread of
254 WNV from North to South America. Although WNV has not been found in Brazil yet, it
255 was recently isolated from equines, and neutralising antibodies against WNV were detected
256 in birds in Argentina in the same hydrographic basin that Pantanal is located (the Paraguay-
257 Paraná Basin) (Morales et al. 2006, Diaz et al. 2008). There is no information on the vector
258 competence of *Cx. theobaldi* or other caiman-biting *Melanoconion* species from Pantanal to
259 WNV. Nevertheless, because *Melanoconion* and *Mansonia* species are abundant,
260 widespread, have a broad set of hosts, and an opportunistic feeding behaviour, they are
261 suggested as potential vectors of WNV in the Southern Cone in South America.

262

263 **ACKNOWLEDGEMENTS**

264 We thank FUNDECT for financial support and CAPES for postgraduate fellowship to
265 LAV. We thank too Joilson Barros, Jonathan Silva, Clarissa Martins, Karla Campião,
266 Olívia Dias and Stephani Demczuk for the support in the field and laboratory work. This
267 study was approved by IBAMA, Brazilian Ministry of Environment (protocol number
268 02014.000785/2006-91).

269 **References cited**

- 270 Adámoli, J. 1986. Dinâmica das inundações no Pantanal, pp. 51-61. In Anais do Iº
271 Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Embrapa Pantanal,
272 Corumbá, Brazil.
- 273 Almirón, W. R., and M. M. Brewer. 1995. Preferencia de hospedadores de Culicidae
274 (Diptera) recolectados em el centro de la Argentina. Rev. Saude Publica 29: 108-114.
- 275 Consoli, R. G. B., and R. Lourenço-de-Oliveira. 1994. Principais mosquitos de importância
276 sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- 277 Cupp, E. W., Z. Dunhua, X. Yue, M. S. Cupp, C. Guyer, T. R. Sprenger, and T. R.
278 Unnasch. 2004. Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in
279 an eastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama. Am. J. Trop. Med.
280 Hyg. 71: 272–276.
- 281 Diaz L. A., N. Komar, A. Visintin, M. J. D. Juri, M. Stein, R. L. Allende, L. Spinsanti, B.
282 Konigheim, J. Aguilar, M. Laurito, W. Almirón, and M. Contigiani. 2008. West Nile virus
283 in birds, Argentina. Emerg. Infect. Dis. 14:689-691.
- 284 Figueira, J. E. C., R. Cintra, L. R. Viana, and C. Yamashita. 2006. Spatial and temporal
285 patterns of bird species diversity in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil: implications for
286 conservation. Cons. Braz. J. Biol. 66: 393-404.
- 287 Forattini O. P. 2002. Culicidologia Médica, vol. 2. EDUSP. São Paulo, Brazil.
- 288 Forattini O. P., and M. A. M. Sallum. 1989. Taxonomic study redescription of *Culex*
289 (*Melanoconion*) *theobaldi* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84:
290 201-208.

291 Groombridge, B. 1987. The distribution and status of world crocodilians, pp. 9-22. In G. J.
292 W. Webb, S. C. Manolis, and P. J. Whitehead (eds.), Wildlife management: Crocodiles and
293 alligators. Surrey Beatty & Sons Pty Limited, Austrália.

294 Hoare P.C. 1932. On protozoal blood parasites collected in Uganda. Parasitology 24: 210-
295 224.

296 Hutchings R. S. G., M. A. M. Sallum, R. L. M. Ferreira, and R. W. Hutchings. 2005.
297 Mosquitoes of the Jaú National Park and their potential importance in Brazilian Amazonia.
298 Med. Vet. Entomol. 19: 428–441.

299 Jones J. W., M. J. Turell, M. R. Sardelis, D. M. Watts, R. E. Coleman, R. Fernandez, F.
300 Carbajal, J. E. Pecor, C. Calampa, and T. A. Klein. 2004. Seasonal distribution, Biology,
301 and human attraction patterns of culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a forest near
302 Puerto Almendras, Iquitos, Peru. J. Med. Entomol. 41: 349-360.

303 Khan, R. A., D. J. Forrester, T. M. Goodwin, and C. A. Ross. 1980. A haemogregarine
304 from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). J. Parasitol. 66: 324-328.

305 Klein T. A., D. G. Young , and S. R. Telford Jr. 1987. Vector incrimination and
306 experimental transmission of *Plasmodium floridense* by bites of infected *Culex*
307 (*Melanoconion*) *erraticus*. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 3:165-175.

308 Klenk K, J. Snow, K. Morgan, R. Bowen, M. Stephens, F. Foster, P. Gordy, S. Beckett, N.
309 Komar, D. Gubler, and M. Bunning. 2004. Alligator as West Nile Virus amplifiers. Emerg.
310 Infect. Dis. 10: 2150-2155.

311 Komar N., and G. G. Clark. 2006. West Nile virus activity in Latin America and the
312 Caribbean. Rev. Panam. Salud Publica 19:112–117.

313 Lainson, R. 1977. *Trypanosoma cecili* n. sp., a parasite of the South American cayman
314 *Caiman crocodilus crocodilus* (Linnaeus 1758) (Crocodylia: Alligatoridae), p. 87-93. In
315 E.U. Canning (ed.), Protozoology, vol. 3. Clunbury Cottrell Press, Berkhamstead, U.K.

316 Lainson, R., I. Paperna, and R. D. Naiff. 2003. Development of *Hepatozoon caimani*
317 (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the
318 frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98: 103-
319 113.

320 Lourenço-de-Oliveira, R., and R. Heyden. 1986. Alguns aspectos da ecologia dos
321 mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria), em
322 Jacarepaguá, Rio de Janeiro. IV. Preferências alimentares quanto ao hospedeiro e
323 frequência domiciliar. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81: 15-27.

324 Molaei G., T. G. Andreadis, P. M. Armstrong, and M. Diuk-Wasser. 2008. Host-feeding
325 patterns of potencial mosquitoes vectors in Connecticut, USA: Molecular analysis of
326 bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and
327 *Uranotaenia*. J. Med. Entomol. 45: 1143-1151.

328 Morales M.A., M. Barrandeguy, C. Fabbri, J.B. Garcia, A. Vissani, K. Trono, G. Gutierrez,
329 S. Pigretti, H. Menchaca, N. Garrido, N. Taylor, F. Fernandez, S. Levis, and D. Enría.
330 2006. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. Emerg. Infect. Dis. 12:
331 1559-1561.

332 Paperna, I., and R. Lainson. 2003. Ultrastructural studies on the sporogony of *Hepatozoon*
333 spp. in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 fed on infected *Caiman crocodilus* and *Boa*
334 *constrictor* from northern Brazil. Parasitology 127: 147-154.

335 Pecor, J. E., V. L. Mallampalli, R. E. Harbach, and E. L. Peyton. 1992. Catalog and
336 illustrated review of the subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Contrib.*
337 *Am. Entomol. Inst.* 27: 1-228.

338 Pessoa, S. B., P. de Biasi, and D. M. Souza. 1972. Esporulação do *Hepatozoon caimani*
339 (Carini 1909), parasita do jacaré-de-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex*
340 *dolosus* (L. Arribalzaga). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 70: 379-383.

341 Pough F. H., R. M. Andrews, J. E. Cadle, A. H. Savitzky, and K. D. Wells. 2003.
342 *Herpetology*, 3rd ed. Prentice Hall, New Jersey.

343 Rodrigues S. C. G., and J. E. Maruniak. 2006. Blood meal identification from mosquitoes
344 collected at a commercial alligator farm. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 22: 557-560.

345 Rozeboom, L. E., and W. H. W. Komp. 1950. A review of the species of *Culex* of the
346 subgenus *Melanoconion* (Diptera, Culicidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* 43: 75-114.

347 Silva-do-Nascimento, T. F., and R. Lourenço-de-Oliveira. 2007. Diverse population
348 dynamics of three *Anopheles* species belonging to the *Triannulatus* Complex (Diptera:
349 Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 975-982.

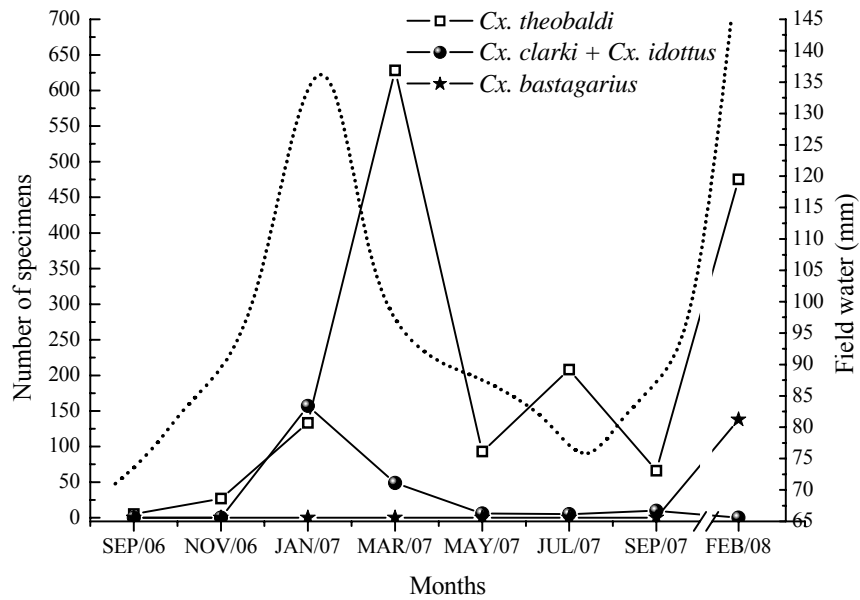
350 Sloboda M., M. Kamler, J. Bulantová, J. Votýpka, and D. Modrý. 2007. A new species of
351 *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Phyton regius* (Serpentes: Pythonidae) and
352 its experimental transmission by a mosquito vector. *J. Parasitol.* 93: 1189-1198.

353 Smith, T. G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J. Parasitol.* 82: 565-
354 585.

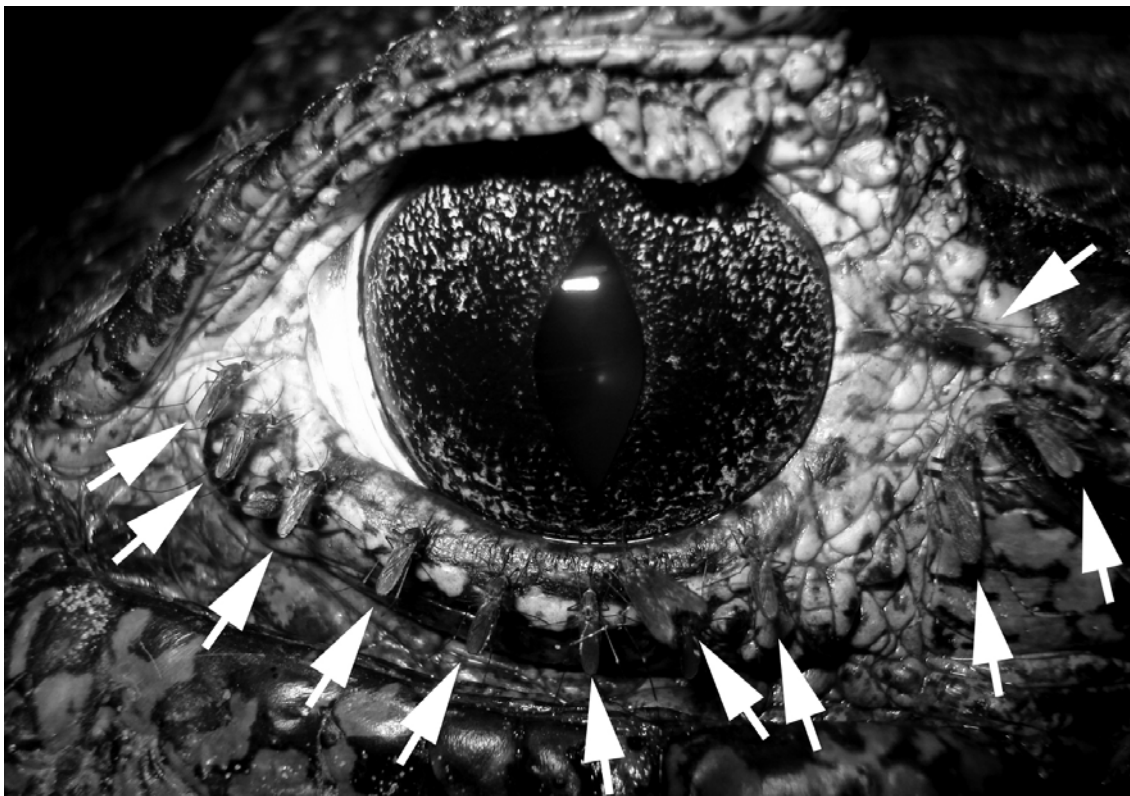
355 Tempelis C. H., and Galindo P. 1975. Host-feeding patterns of *Culex (Melanoconion)* and
356 *Culex (Aedinus)* mosquitoes collected in Panama. *J. Med. Entomol.* 12: 205-209.

357 Viana, L. A., F. Paiva, M. E. Coutinho, and R. Lourenço-de-Oliveira. 2010. *Hepatozoon*
358 *caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, From the Pantanal
359 region, Brazil. J. Parasitol. 96: 83-88.

360 **Fig. 1.** Water level on flood fields near the Correntoso River (mm) and monthly frequency
 361 of *Culex (Melanoconion)* mosquito species captured on *Caiman yacare* caimans in
 362 Pantanal. Dotted line represents water level.



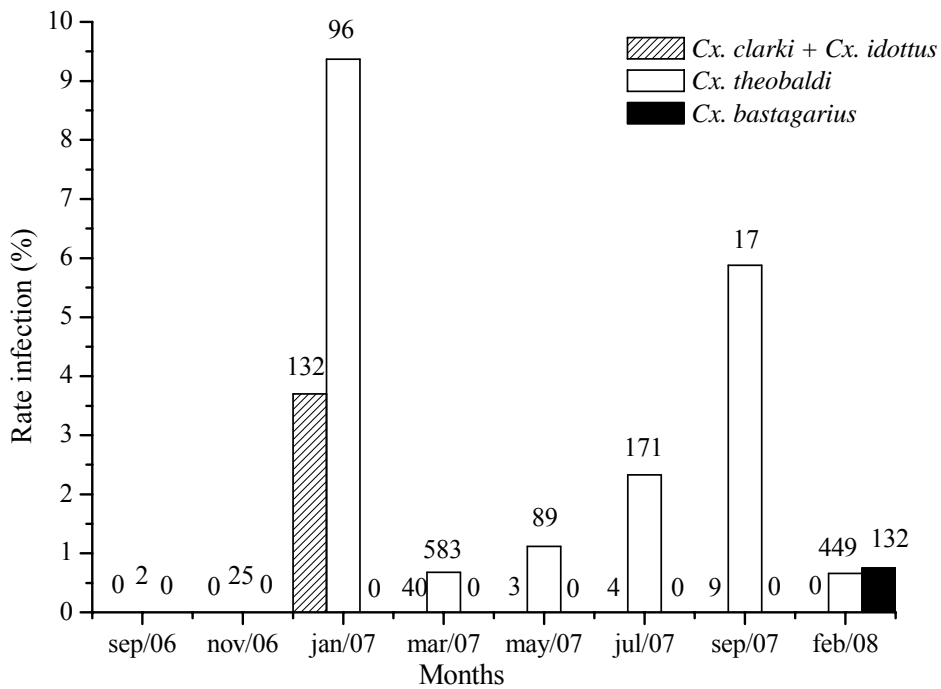
363
 364



365

366 **Fig. 2.** Eleven mosquitoes (arrows) feeding around the eye of a restrained *Caiman yacare*.

367 **Fig. 3.** Bimonthly infection rate for *Hepatozoon caimani* in *Culex (Melanoconion)* species
 368 captured on *Caiman yacare* in Pantanal, Brazil. Numbers over the bars stand for the
 369 number of dissected mosquitoes.
 370



371

Table 1. Absolute and relative frequencies of mosquito species bimonthly collected on *Caiman yacare* in Pantanal, Brazil

Species	sep/06	nov/06	jan/07	mar/07	may/07	jul/07	sep/07	feb/08	Total	%
<i>Culex (Mel.) theobaldi</i> (Lutz)	5	27	133	628	93	208	66	475	1635	31.0
<i>Mansonia (Man.) titillans</i> (Walker)	100	71	3	201	46	115	522	31	1089	20.7
<i>Mansonia (Man.) humeralis</i> Dyar & Knab	26	63	37	121	80	235	279	7	848	16.1
<i>Mansonia (Man.) amazonensis</i> (Theobald)	127	43	65	19	76	149	159	20	658	12.5
<i>Mansonia</i> spp.	0	0	31	0	0	123	262	4	420	8.0
<i>Culex (Mel.) clarki</i> Evans + <i>Culex (Mel.) idottus</i> Brethes	0	0	157	49	6	5	10	0	227	4.3
<i>Culex (Mel.) bastagarius</i> Dyar & Knab	0	0	0	0	0	0	0	138	138	2.6
<i>Culex (Melanoconion)</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	71	71	1.3
<i>Coquillettidia</i> spp.	0	0	0	0	0	43	6	0	49	0.9
<i>Anopheles (Nys.) albitarsis</i> Lynch Arribalzaga	0	0	1	2	0	6	35	1	45	0.9
<i>Culex</i> spp.	0	0	32	0	0	1	0	6	39	0.7
<i>Anopheles (Nyssorhynchus)</i> spp.	0	1	1	11	1	8	4	0	26	0.5
<i>Culex (Cux.) bidens</i> Dyar	0	0	0	9	1	4	0	5	19	0.4
<i>Psorophora (Jan.) albigenu</i> (Peryassú)	0	1	4	0	0	0	0	0	5	0.1
<i>Culex (Aed.) amazonensis</i> (Lutz)	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0.1
Total	258	206	464	1040	303	897	1343	761	5272	100.0

Table 2. Natural infection rate for *Hepatozoon caimani* in mosquito species collected on *Caiman yacare* in Pantanal, Brazil

Species	Dissected		
	N	+	%
<i>Culex (Mel.) theobaldi</i> (Lutz)	1457	22	0.55
<i>Mansonia (Man.) titillans</i> (Walker)	832	0	0
<i>Mansonia (Man.) humeralis</i> Dyar & Knab	747	0	0
<i>Mansonia (Man.) amazonensis</i> (Theobaldi)	443	0	0
<i>Mansonia</i> spp.	61	0	0
<i>Culex (Mel.) clarki</i> Evans +	188	5	0.12
<i>Culex (Mel.) idottus</i> Brethes			
<i>Culex (Mel.) bastagarius</i> Dyar & Knab	132	1	0.02
<i>Culex (Melanoconion)</i> spp.	42	5 ^a	0.12
<i>Coquillettidia</i> spp.	35	0	0
<i>Anopheles (Nys.) albitarsis</i> Lynch Arribalzaga	29	0	0
<i>Culex</i> spp.	0	0	0
<i>Anopheles (Nyssorhynchus)</i> spp.	6	0	0
<i>Culex (Cux.) bidens</i> Dyar	18	2	0.05
<i>Psorophora (Jan.) albigena</i> (Peryassú)	1	0	0
<i>Culex (Aed.) amazonensis</i> (Lutz)	3	0	0
Total	3.994	35	

^a Dark-scaled specimens probably belonging to *Cx. bastagarius*, *Cx. idottus* or *Cx. clarki*, which were identified only to subgenus because the characters used to identify to species level were lost or damaged.

Table 3. Summary of experimental infections of *Caiman yacare* by oral inoculation of mosquitoes naturally infected with *Hepatozoon caimani*

Caimans	Mosquitoes species	Oocysts inoculated	d.a.i. ^a
CY1	<i>Culex (Mel.) clarki</i> + <i>Cx. (Mel.) idottus</i>	2	94
CY2	<i>Culex (Mel.) theobaldi</i>	1	41
CY3	<i>Culex (Mel.)</i> spp. ^b	4	76
CY4	<i>Culex (Mel.) bidens</i>	8	76
CY5	<i>Culex (Mel.) idottus</i>	7	87

^a Days after inoculation

^b Dark-scalled specimen probably belonging to *Cx. bastagarius*, *Cx. idottus* or *Cx. clarki*, that was only identified to subgenus because the characters used to identify to species level were lost or damaged.

CAPÍTULO 3

**ANURANS AS PARATENIC HOSTS IN THE TRASMISSION OF
HEPATOZOON CAIMANI TO CAIMANS *CAIMAN YACARE*
AND *CAIMAN LATIROSTRIS***

Manuscrito em preparação para submissão na **Parasitology Research**

Este trabalho terá como autores: **Lúcio André Viana**, Priscilla Soares, Jhonatan Eber
Silva, Fernando Paiva e Marcos Eduardo Coutinho

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

**Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani*
to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris***

Lúcio André Viana, Priscilla Soares[†], Jhonatan Eber Silva[†], Fernando Paiva[†], Marcos Eduardo Coutinho*

Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 21045-900

Corresponding author: Lúcio A. Viana

Tel: (55-21) 2562-1262

e-mail: lucviana74@gmail.com

*Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, RAN/ICMBio/Embrapa, Al. Vilma Eldweiss Santos, 115, CEP 33.400-000, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

[†]Laboratório de Parasitologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

27 **ABSTRACT**

28 High prevalence of *Hepatozoon caimani* have been reported in caimans *Caiman*
29 *yacare* from the Pantanal region. The mosquitoes *Culex (Melanoconion)* spp. were recently
30 pointed out as vectors of this parasite. However, culicids are not usually eaten by crocodilians,
31 suggesting that the main transmission route is through ingestion of insectivorous vertebrates,
32 such as anurans. We checked the susceptibility of the wild frogs *Leptodactylus chaquensis*, *L.*
33 *podicipinus* and *Scinax nasicus* to infection by *H. caimani*. Wild-caught anurans were force-
34 fed on sporulated oocysts from laboratory-bred *Culex (Melanoconion)* mosquitoes species.
35 Frogs were killed thirty days after infection and their internal organs were fed to caimans *C.*
36 *yacare* and *C. latirostris*. Cystozoites were found in fresh liver impression smears of *L.*
37 *chaquensis*. *Caiman yacare* fed on *L. chaquensis* organs presented gametocytes in the
38 peripheral blood circulation between 74 and 80 days post inoculation (d.p.i). Gametocytes
39 were also found in *C. latirostris* fed on the internal organs of *L. podicipinus* and *S. nasicus*
40 between 60-70 d.p.i. and 69-75 d.p.i., respectively. As the frogs used in the experiment are
41 sympatric with *C. yacare* and *C. latirostris* and may be in the diet of these caimans, the results
42 suggest these amphibians as paratenic hosts in the natural transmission cycle of *H. caimani*, in
43 Pantanal.

44

45 Key words: Paratenic host – *Caiman yacare* – *Caiman latirostris* – *Leptodactylus* – *Scinax* –
46 *Hepatozoon caimani* - transmission

47

48

49

50

51

52

53 INTRODUCTION

54 *Hepatozoon caimani* is the most frequent hepatozoid in crocodylians from Brazil. It
55 can be found in the caimans *Caiman crocodilus*, *C. latirostris* and *C. yacare*, being highly
56 prevalent (76%) in *C. yacare* from Pantanal wetlands (Viana and Marques 2005; Viana et al.
57 2010a), where the mosquitoes *Culex*, especially *Cx. (Melanoconion)* species, are pointed as
58 natural vectors (Viana et al. 2010b).

59 *Hepatozoon* infection may lead to the formation of cysts in vertebrate animals, when
60 cysts maintain infective forms, the cystozoites, these vertebrates may act as paratenic hosts
61 (Landau et al. 1972; Desser 1990; Paperna and Lainson 2004). The transmission is reached
62 when paratenic hosts, such as anurans and rodents, are eaten by predators like crocodylians,
63 snakes and canids (Sloboda et al. 2008; Johnson et al. 2008, 2009). Smith et al. (1994)
64 demonstrated the transmission of *H. sipedon* to the snake *Nerodia sipedon sipedon* with the
65 Northern Leopard frog *Rana pipiens*, in which the organs had parasite cysts. Similarly,
66 Sloboda et al. (2008) used infected rodents to transmit *H. ayorgbor* to the snake *Python*
67 *regius*. Lainson et al. (2003) reported the experimental transmission of *H. caimani* to the
68 caiman *C. crocodilus* fed on organs of commercially cultured Bull frogs *Rana catesbeiana*
69 and wild-caught *Leptodactylus fuscus*, that had previously ingested mosquitoes *Culex*
70 *quinquefasciatus* infected with *H. caimani*.

71 Since the feeding habits of *C. yacare* and *C. latirostris* is known as generalist and
72 opportunistic (Santos et al. 1996; da Silveira e Magnusson 1999; Borteiro et al. 2009), it is
73 assumed that the transmission of *H. caimani* to caimans may occur by the ingestion of both
74 infected mosquitoes and paratenic hosts. Nevertheless, mosquitoes are not typically eaten by *C.*
75 *yacare* and *C. latirostris*, and an alternative transmission route in the natural environment
76 would be the inclusion of paratenic hosts, such as anurans (Lainson et al. 2003).

77 Both *C. yacare* and *C. latirostris* are parasitized by *H. caimani* and the geographical
78 distribution of these caimans matches that of some anuran species. Thus, this study aimed to

79 assess the susceptibility of some wild frog species from the Pantanal region to the induced
80 infection by *H. caimani*. And also, investigate the possible participation of these frogs as
81 paratenic hosts in the transmission cycle.

82

83 **MATERIALS AND METHODS**

84 *Animals* – The anurans *Leptodactylus chaquensis*, *L. podicipinus* (Leptodactylidae) and
85 *Scinax nasicus* (Hylidae) were hand-captured, around the Pantanal Research Base of the
86 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (BEP-UFMS), municipality of Corumbá, State
87 of Mato Grosso do Sul, Brazil (19°34'37"S 57°00'42"W). Animals were maintained in
88 terrariums in the laboratory for 30 days. Frogs were fed on laboratory-bred crickets *Gryllus*
89 sp.

90 Three juvenile *C. yacare* caimans (snout-vent length 25.0 cm; around 18 months old)
91 were obtained from the breeding farm Cacimba de Pedra, municipality of Miranda, MS.
92 Caimans were collected in the wild when still in the eggs, and then raised in captivity until
93 transported to the laboratory. Four individuals of *Caiman latirostris* were obtained in the
94 Animal Center (CESP), municipality of Porto Primavera, State of São Paulo. The animals
95 were kept at room temperature in a fiber-glass tank (50% of dry area and 50% with water
96 about 15cm deep) in the, city of Campo Grande, which is 250 km far from *H. caimani*
97 transmission area. Caimans were fed on beef, four times a week.

98 *Culex (Melanoconion)* spp. mosquitoes species were captured while feeding on two
99 naturally infected *C. yacare* individuals. The caimans were in the riparian forest of the
100 Miranda River, near the BEP-UFMS, where *H. caimani* and its natural vectors are fairly
101 abundant (Viana e Marques 2005, Viana et al. 2010b). Mosquitoes were taken to the
102 laboratory, and placed in water-filled containers to oviposit. After the oviposition, the eggs
103 were collected and mosquitoes larvae were raised to adulthood.

104

105 *Experimental Infections* – The first generation of mosquitoes was fed on a naturally infected
106 individuals of *C. yacare*, from south-eastern Pantanal. Mosquitoes were exposed to blood-
107 meal on the caiman for twelve hours at night, then transferred to screened cages and
108 maintained with sugar water. Twenty-three days after the blood-meals, mosquitoes were
109 dissected and surveyed for sporocysts with sporozoites, as described by Lainson et al. (2003).

110 The formers were dissected in NaCl 0.9% solution and when found, sporulated oocysts
111 were immediately injected into the anterior portion of the anurans esophagus with the help of
112 a flexible plastic pipette. A single specimen of each anuran species was used in the
113 experiment, and each one was force fed with sporulated oocysts from a single mosquito.
114 Anurans were necropsied 30 d.p.i., *H. caimani* infection was examined by blood smears and
115 squash preparations of liver tissue samples compressed between slides and coverslips.

116 One month before infections we toe-clipped each caiman and collected blood to make
117 two bloodsmears. If gametocytes were not seen, that animal was recorded as uninfected.
118 Thereafter, the viscera of *L. chaquensis* were force fed in an individual of *C. yacare* and those
119 of *S. nasicus* and *L. podicipinus* in two caimans *C. latirostris*.

120 Caimans were weekly surveyed for the presence of *H. caimani* through blood samples,
121 obtained by claw clipping. Smears were fixed in methanol and stained in Giemsa. Parasite
122 diagnosis was confirmed by gametocytes morphometry at 1.000x, according to Lainson et al.
123 (2003). Two non-infected caimans, *C. yacare* and *C. latirostris*, were kept in the same
124 conditions as the others. They worked as control units and were checked for an eventual
125 infection for 120 days.

126 The collection and maintenance of wild animals was authorized by IBAMA, the
127 Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (protocol
128 02014.000785/2006-91).

129

130

131 **RESULTS**

132 Cysts were found only in the liver of *L. chaquensis* (Fig. 1). The caiman *C. yacare* fed
133 on infected *L. chaquensis* presented intra-erythrocytic gametocytes 80 d.p.i (Fig. 2A). Due to
134 the range of weekly blood samples, the prepatent period was established between 74-80 days.
135 Three out of 2000 observed erythrocytes were parasitized by gametocytes morphometrically
136 compatible with *H. caiman*.

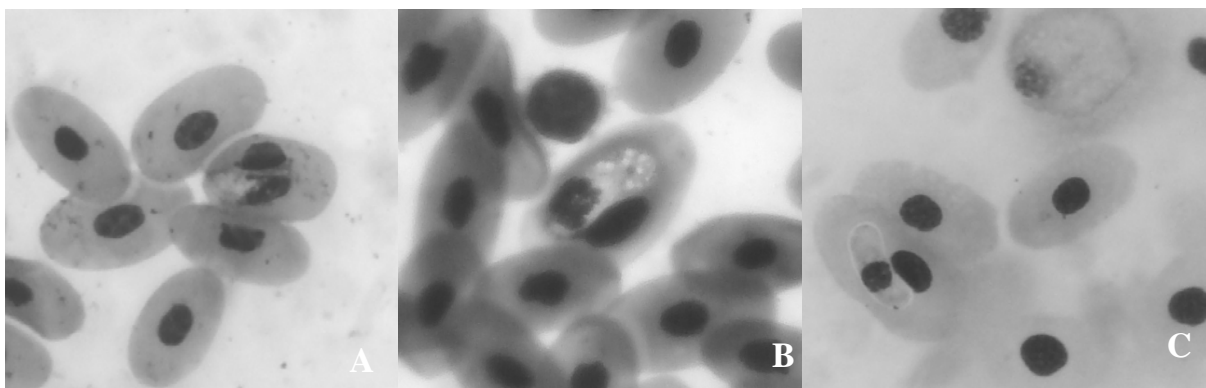
137



138

139 Figure 1. Cystozoite in the liver of the frog *Leptodactylus chaquensis*.

140



141

142 Figure 2A-C. *Hepatozoon caimani* gametocytes in the peripheral blood of caimans fed on
143 infected frogs. 2A. Intraerythrocytic gametocyte in *Caiman yacare* fed on viscera of
144 *Leptodactylus chaquensis*; 2B. Gametocyte inside erythrocytes of the blood of *Caiman*
145 *latirostris* fed on viscera of *Leptodactylus podicipinus*; 2C. Gametocyte in *Caiman latirostris*
146 fed on infected *Scinax nasicus*.

147 Gametocytes were found in *C. latirostris* that fed on *S. nasicus* 67 d.p.i., within 60-67
148 d.p.i. pre-patent period and parasite load of 1/2000 erythrocytes (Fig. 2B). The other specimen
149 of *C. latirostris*, fed on *L. podicipinus*, presented gametocytes 75 d.p.i., the pre-patent period
150 was 69-75 d.p.i, and parasite load 3/2000 erythrocytes (Fig.2C).

151

152 **DISCUSSION**

153 Prepatent period varied and *H. caimani* gametocytes were found in the blood of *C.*
154 *yacare* within the range reported by Lainson et al. (2003), and cysts present in liver of *L.*
155 *chaquensis* are seemed similar to those described to *H. caimani*.

156 Viana et al. (2010a) found that the prevalence of *H. caimani* varies according caimans
157 size/age in the Pantanal region, and juvenile caimans (26-50cm) were the first ones to get
158 infected. By this life period, *C. yacare* starts to include small vertebrates in the diet (Santos et
159 al. 1996). Anurans are frequent, but not abundant in the diet of *C. yacare* and *C. latirostris*
160 (Borteiro et al. 2009; Santos et al. 1996). This is because *C. yacare*, as other crocodilians, is
161 opportunistic in prey capturing and its feeding behavior is highly dependent on the
162 environment and on prey availability (Magnusson et al. 1987; Santos et al. 1996; Silveira e
163 Magnusson 1999, Wallace and Leslie 2008).

164 The anuran species of this study have different habits. *L. chaquensis* and *L.*
165 *podicipinus* are semi-terrestrial while *S. nasicus* is a tree frog (Ávila and Ferreira 2004). In
166 Pantanal, *S. nasicus* can be found in groups of around 35 individuals, calling on the vegetation
167 near the water (Ávila and Ferreira 2004). In the same region, the leptodactylids *L. chaquensis*
168 and *L. podicipinus* were observed in groups up to eight males competing for a female (Prado
169 and Haddad 2003). These three anurans lay their eggs on the water surface (Prado and
170 Haddad 2003; Uetanabaro et al. 2008) and the reproductive behavior in a flooded
171 environment might increase the chances of predation by snakes and crocodilians.

172 It was not possible to assure that the cystozoites in *L. chaquensis* were *H. caimani*,
173 although, this is strongly indicated by the success in the infection of clean caimans and by the
174 similarity in the morphology between gametocytes found in these study and those described
175 by Lainson et al. (2003).

176 It is likely that several anuran genera of the families Hylidae and Leptodactylidae,
177 many of them sympatric with *C. yacare* and *C. latirostris* (Gordo and Campos 2003), may be
178 susceptible to infection by *H. caimani*. Results of present study, along with those reported by
179 Lainson et al. (2003), suggest that these frogs may participate in the transmission cycle of *H.*
180 *caimani* as paratenic hosts. For South American crocodylians, the predation of insectivorous
181 vertebrates hosting parasite cysts, such as anurans, might be the main away of transmission of
182 *H. caimani*.

183 Transmission through predation of paratenic hosts is related to an important adaptation
184 of some hepatozoids, in situations where invertebrate hosts have few or no possibilities of
185 being eaten by intermediate hosts, such as snakes and crocodylians (Smith et al. 1994; Lainson
186 et al. 2003; Paperna and Lainson 2004; Sloboda et al. 2008). Interestingly, cysts have been
187 also observed in intermediate hosts themselves, suggesting that infection may also happen by
188 cannibalism (Lainson et al. 2003).

189 **ACKNOWLEDGEMENTS**

190 The authors acknowledge the financial support received for this study from FUNDECT. To
191 Karla Campião for translate and Priscilla Soares to handling the caimans. Gerson Zahdi, of
192 the Cacimba de Pedra farm, for kindly provide the young caimans.
193
194
195

196 **REFERENCES**

197 Ávila RW, Ferreira VL (2004) Riqueza e densidade de vocalizações de anuros (Amphibia) em
198 uma área urbana de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Biologia 21:
199 887-892.

200 Borteiro C, Gutiérrez F, Tedros M., Kolenc F (2009) Food habits of the Broad-snouted
201 Caiman (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae) in northwestern Uruguay .Studies on
202 Neotropical Fauna and Environment 44: 31–36.

203 Desser SS (1990) Tissue “cysts” of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus*
204 *carolinensis*: the significance of these cysts in species of Hepatozoon. Journal of Parasitology
205 76: 257-259.

206 Gordo M, Campos Z (2003) Listagem dos Anuros da Estação Ecológica Nhumirim e
207 arredores, Pantanal Sul. EMBRAPA-Pantanal, Corumbá. 21 p.

208 Johnson EM, Allen KE, Pancieira RJ, Ewing SA, Little SE (2009) Experimental transmission
209 of *Hepatozoon americanum* to New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and
210 infectivity of cystozoites for a dog. Veterinary Parasitology 164: 162-166.

211 Johnson EM, Allen KE, Breshears MA, Pancieira RJ, Little SE, Ewing SA (2008)
212 Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. Veterinary Parasitology
213 151: 164-169.

214 Lainson R, Paperna I, Naiff RD (2003) Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909)
215 Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana*
216 *catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98: 103-
217 113.

218 Landau I, Michel JC, Chabaud AG (1972) Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*;
219 discussion sur les caracteres fondamentaux d'un cycle de Coccidie. Zeitschrift für
220 Parasitenkund 38: 250-270.

221 Magnusson WE, Silva EV, Lima AP (1987) Diets of amazonian crocodilians. Journal
222 of Herpetology 21: 85-95.

223 Paperna I, Lainson R (2004) *Hepatozoon* cf. *terzii* (Sambon and Seligman, 1907) infection in
224 the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: Transmission to the mosquito *Culex*
225 *quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. Parasite 11: 175-181.

226 Prado CPA, Haddad C (2003) Testes size in leptodactylid frogs and occurrence of multimale
227 spawning in the genus *Leptodactylus* in Brazil. Journal of Herpetology 37: 354-362.

228 Santos AS, Stoll MN, Pinheiro MS, Campos Z, Magnusson WE, Mourão G (1996) Diets of
229 *Caiman crocodilus yacare* from different habitats in Brazilian Pantanal. Herpetological
230 Journal 6: 111-117.

231 Silveira R da, Magnusson WE (1999) Diets of splectacled and black caiman in the
232 Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. Journal of Herpetology 33: 181-192.

233 Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D (2008) Rodents as intermediate
234 hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: epatozoidae) from the African ball
235 python, *Python regius*? Folia Parasitologica 55: 13–16.

236 Smith TG, Desser SS, Martin DS (1994) The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp.
237 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake
238 (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an
239 intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). Parasitology Research 80: 559-
240 568.

241 Uetanabaro M, Prado CPA, Rodrigues DJ, Gordo M, Campos Z (2008) Field guide to the
242 anurans of the south Pantanal and surrounding cerrados. Federal University of Mato Grosso
243 do Sul, Brazil. 196 p.

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

- 247 Viana LA, Paiva F, Coutinho ME, Lourenço-de-Oliveira R. (2010a) *Hepatozoon caimani*
248 (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal region,
249 Brazil. Journal of Parasitology 96: 83-88.
- 250 Viana LA, Soares P, Paiva F, Lourenço-de-Oliveira R (2010b) Caiman biting mosquitoes and
251 the natural vector of *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae). Journal of Medical
252 Entomology (In press).
- 253 Wallace KM, Leslie AJ (2008) Diet of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in Okavango
254 Delta, Botswana. Journal of Herpetology 42: 361-368.

1

2

3

CAPÍTULO 4

4

5

6

7

8

9

10

DINÂMICA INFRAPOPULACIONAL DO *HEPATOZOON CAIMANI*

11

EM JACARÉS *CAIMAN YACARE* E *CAIMAN LATIROSTRIS*

12 RESUMO

13

14 Estudos têm demonstrado que hemogregarinas, como *Hepatozoon*, podem ser
15 encontradas por períodos relativamente longos em seus hospedeiros vertebrados,
16 sobretudo em répteis. No presente estudo, realizamos o acompanhamento da
17 parasitemia do protozoário *Hepatozoon caimani* em dois de seus hospedeiros
18 crocodilianos, *Caiman yacare* e *C. latirostris*. Jacarés *C. yacare* foram
19 experimentalmente infectados pelo parasito mediante a ingestão de vísceras do anuro
20 *Leptodactylus chaquensis* ou de mosquitos *Cx. (Melanoconion) spp.* com oocistos
21 esporulados. Do mesmo modo, as infecções do *C. latirostris* foram realizadas pela
22 ingestão de vísceras dos anuros *Scinax nasicus* e *L. podicipinus*, previamente
23 alimentados com mosquitos contendo oocistos esporulados. O monitoramento das
24 infecções ocorreu no período de três a seis meses. Não houve eliminação do parasito
25 em nenhum dos animais experimentalmente infectados no período de estudo de até
26 seis meses, e os mais elevados níveis de parasitemia foram observados no *C. yacare*
27 que ingeriu *Cx. theobaldi* infectado. Neste animal foram registrados 83
28 gametócitos/2.000 hemácias contadas. São discutidos alguns fatores associados à
29 longa duração das infecções pelo *H. caimani* nos jacarés e a consequência deste fato
30 na prevalência do parasito no ambiente silvestre.

31 INTRODUÇÃO

32 O termo infrapopulação é utilizado para designar todos os parasitos de uma espécie
33 encontrados em apenas um indivíduo hospedeiro, em um momento particular (Margolis et al.
34 1982, Bush et al. 1997). O parasito *Hepatozoon caimani* apresenta prevalência elevada na
35 população do seu hospedeiro vertebrado, o jacaré *Caiman yacare* na região do Pantanal Sul,
36 onde aproximadamente 76% dos crocodilianos apresentaram a infecção (Viana e Marques
37 2005, Viana et al. 2010a). Os níveis elevados de prevalência do parasito no ambiente silvestre
38 provavelmente se devem, em parte, pela ocorrência de diferentes vias de transmissão para o
39 *C. yacare*, tais como ingestão de mosquitos *Cx. (Melanoconion)* spp. infectados contendo
40 oocistos esporulados (Viana et al. 2010b), predação de hospedeiros paratênicos como anuros,
41 canibalismo entre *C. yacare* (Viana et al. 2010c), além de peixes infectados (R. Lourenço-de-
42 Oliveira, dados não publicados), todos contendo cistos com cistozoítos em suas vísceras, no
43 caso dos vertebrados.

44 Diversos estudos têm registrado que, usualmente, hemoparasitos podem ser
45 encontrados por períodos relativamente longos na circulação sanguínea de seus hospedeiros
46 reptilianos (Ball et al. 1967, Bromwich e Schall 1986, Salkeld e Schwarzkopf 2005), e
47 mamíferos (Ewing et al. 2003). Tal fenômeno certamente tem consequências diretas sobre a
48 prevalência destes parasitos nas populações naturais de seus hospedeiros (Široký et al. 2005).
49 No presente estudo, monitoramos a infrapopulação do parasito *H. caimani* por um período de
50 três a cinco meses nos seus hospedeiros vertebrados, os jacarés *C. yacare* e *C. latirostris*, após
51 a realização de infecções experimentais nos mesmos com vísceras de anuros e/ou mosquitos
52 infectados.

53

54

55

56

57 **MATERIAIS E MÉTODOS**

58 As informações pertinentes sobre obtenção, manutenção e infecções experimentais de
59 anuros e mosquitos utilizados neste estudo e dos jacarés *C. yacare* e *C. latirostris*, encontram-
60 se na metodologia descrita com detalhes nos Capítulos 2 e 3. No mesmo também estão as
61 informações sobre o exame sanguíneo dos jacarés. As amostragens de sangue para o
62 acompanhamento da parasitemia dos jacarés experimentalmente infectados foram realizadas
63 inicialmente em intervalos de aproximadamente sete dias e posteriormente uma vez ao mês. O
64 período de monitoramento da infrapopulação do *H. caimani* nos jacarés experimentalmente
65 infectados foi de três a no máximo seis meses. A amostragem não pôde ser estendida devido a
66 morte de todos os animais com aproximadamente seis meses, ou antes, disso. Acreditamos
67 que tal fato tenha ocorrido por dificuldades na manutenção do aquecimento da água na piscina
68 dos jacarés, devido a um defeito no termostato, nela incluído.

69 Os procedimentos em relação à utilização de animais silvestres foram autorizados pelo
70 IBAMA, Ministério do Meio Ambiente, protocolo número 02014.000785/2006-91.

71

72 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

73 Resumidamente, jacarés limpos *C. yacare* e *C. latirostris* foram infectados por via
74 oral, mediante alimentação dos mesmos com pedaços de vísceras de anuros previamente
75 infectados pela ingestão de mosquitos contendo oocisto esporulados. Outra fonte de infecção
76 foi à ingestão direta de mosquitos com oocistos esporulados (Tabela 1). O sangue dos jacarés
77 foi examinado a partir do 15º dia após a inoculação *per os*, através de esfregaços sanguíneos
78 corados com Giemsa. A parasitemia foi estimada pela contagem do número de gametócitos
79 em 2.000 hemácias no aumento de 40x.

80

81

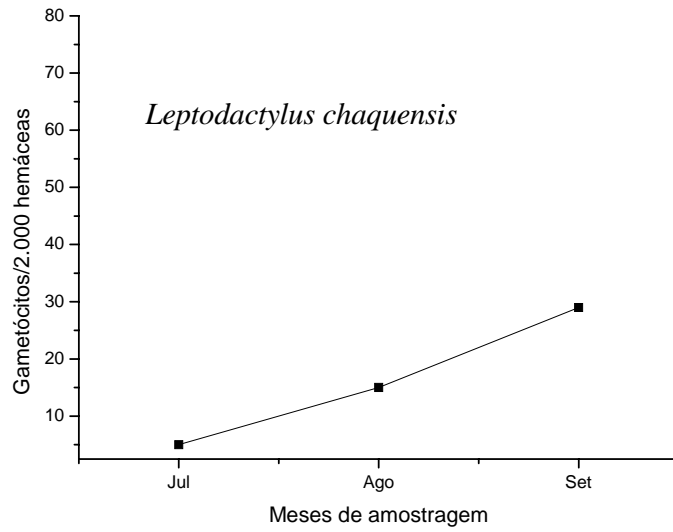
82

83 Tabela 1. Jacarés *Caiman yacare* e *Caiman latirostris* e suas respectivas fontes de infecção
84 pelo *H. caimani*, vísceras de anuros ou mosquitos com oocistos esporulados.

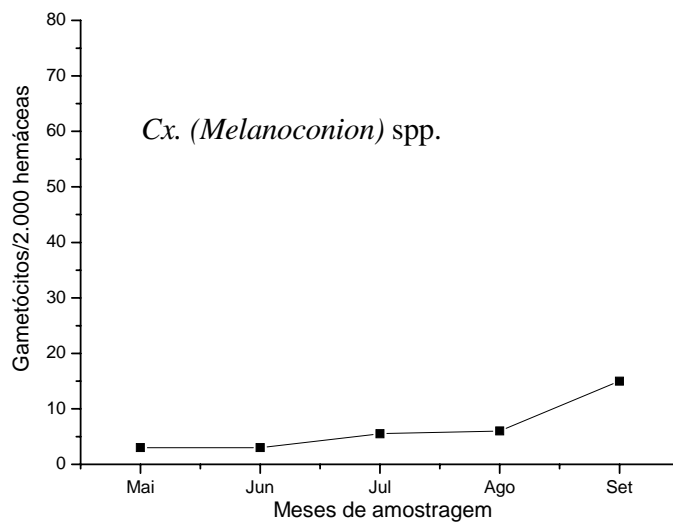
Nº DE ORDEM	ESPÉCIE	FONTE DE INFECCÃO	PERÍODO MONITORADO (em meses)
1	<i>C. yacare</i>	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	3
2	<i>C. yacare</i>	<i>Cx. (Melanoconion) spp.</i> ^a	5
3	<i>C. yacare</i>	<i>Cx. (Mel.) theobaldi</i>	6
4	<i>C. latirostris</i>	<i>Scinax nasicus</i>	4
5	<i>C. latirostris</i>	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	5

85 ^a Próximo a *Cx. clarki*.

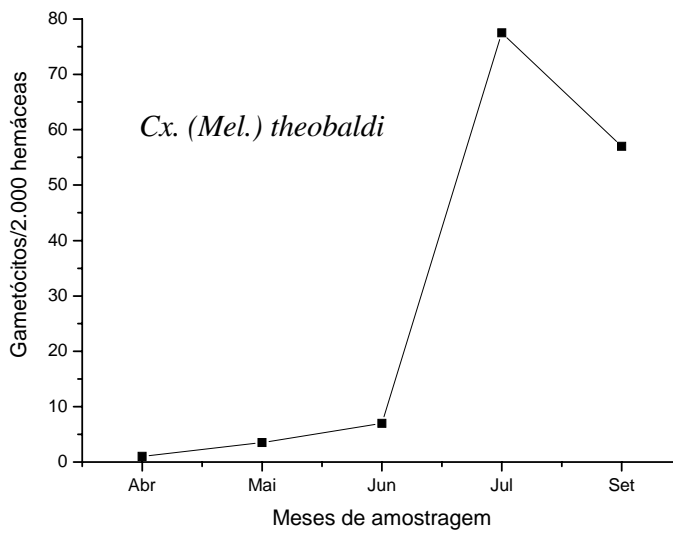
86



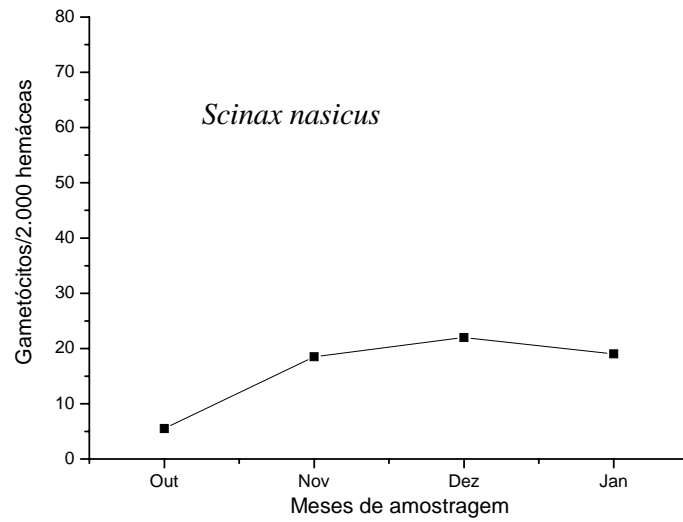
87



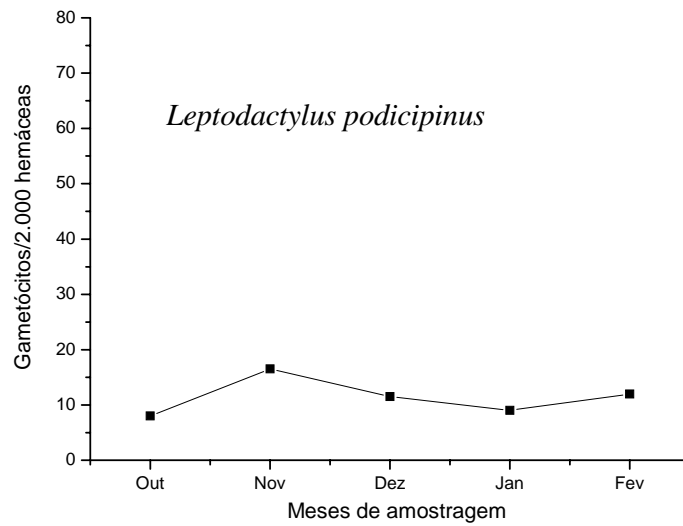
88



89 Figura 1. Acompanhamento da parasitemia do *Hepatozoon caimani* nos jacarés *Caiman*
90 *ycare* por fonte de infecção.



91



92

93

94 Figura 2. Acompanhamento da parasitemia do *Hepatozoon caimani* nos jacarés *Caiman*
 95 *latirostris* por fonte de infecção.

96 De um modo geral, todas as infrapopulações monitoradas apresentaram um aumento
97 com o passar do tempo (Figuras 1-2). Contudo, no jacaré *C. latirostris*, que recebeu as
98 vísceras do anuro *L. podicipinus*, a parasitemia flutuou durante cinco meses sobre o valor
99 médio de aproximadamente 11 gametócitos do *H. caimani*/2.000 hemácias (Figura 2).
100 Parasitemias maiores foram observadas no jacaré *C. yacare* inoculado com o mosquito *Cx.*
101 *theobaldi*. Este jacaré apresentou quase o dobro (83 gametócitos) de parasitas observados nos
102 outros crocodilianos que ingeriram vísceras de hospedeiros paratênicos, cujos picos foram de
103 aproximadamente 24-29 gametócitos/2.000 hemácias.

104 Flutuações sazonais de hepatozoídeos têm sido observadas em diferentes serpentes
105 naturalmente infectadas (Hull e Camin 1960, Santos et al. 2005). Santos et al. (2005)
106 observaram que o parasito *H. terzii*, da serpente *Boa constrictor*, não foi detectado durante
107 dois meses, vindo a ressurgir em níveis relativamente baixos, posteriormente. Existem poucas
108 evidências de eliminação de infecções por hemogregarínídeos em seus hospedeiros
109 vertebrados reptilianos. Salkeld e Schwarzkopf (2005), em um estudo sobre a epizootiologia
110 do *H. hinuliae* no lagarto *Eulamprus quoyii*, mediante a realização de recapturas do
111 hospedeiro vertebrado, os autores observaram a aparente eliminação do hepatozoídeo em seis
112 lagartos. Contudo, Ujvari et al. (2004) demonstraram que 25 serpentes aparentemente
113 negativas para *Hepatoozoon* sp., mostraram-se positivas para o parasito quando do emprego
114 de uma PCR, tendo como alvo a região do gene 18S do DNA ribossômico. Tais observações
115 sugerem a necessidade da utilização de técnicas moleculares para a conclusão de uma
116 eliminação real das infecções de hepatozoídeos pelos seus hospedeiros reptilianos.

117 Embora não tenhamos conseguido monitorar os jacarés experimentalmente infectados
118 por um período superior a seis meses, estudos realizados, no campo, com recaptura de
119 lagartos *Lacerta vivipara*, infectados por uma hemogregarina não identificada, demonstraram
120 níveis semelhantes de parasitemia durante dois anos de amostragens (Sorci 1996). Não se
121 pode excluir a possibilidade de reinfecções no caso do lagarto *L. vivipara* observado por Sorci

139 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 140 Ball, G.H.; Chao, J.; Telford, S.R., Jr. 1967. The life history of *Hepatozoon*
141 *rarefasciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarchon corais*
142 (Colubridae), and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae).
143 *Journal of Parasitology* 53: 897-909.
- 144 Bromwich, C.R. e Schall, J.J. 1986. Infection dynamics of *Plasmodium mexicanum*, a
145 malarial parasite of lizards. *Ecology* 67: 1227-1235.
- 146 Bush, A.O.; Lafferty, K.D.; Lotz, J.M.; Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on
147 its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* 83: 575-583.
- 148 Ewing, S.A.; Panciera, R.J.; Mathew, J.S. 2003. Persistence of *Hepatozoon americanum*
149 (Apicomplexa: Adeleorina) in a naturally infected dog. *Journal of Parasitology* 89: 611-
150 613.
- 151 Davies, A.J. e Johnston, M.R.L. 2000. The biology of some intraerythrocytic parasites of
152 fishes, amphibia and reptiles. *Advances in Parasitology* 45: 1-107.
- 153 Hull, R.W. e Camin, J.H. 1960. Haemogregarines in snakes: the incidence and identity of the
154 erythrocytic stages. *Journal of Parasitology* 46: 515-523.
- 155 Margolis, L.; Esch, G.W.; Holmes, J.C.; Kuris, A.M.; Schad, G.A. 1982. The use of
156 ecological terms in Parasitology (report of an *ad hoc* committee of the American
157 Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology* 68: 131-133.
- 158 Salkeld, D.J. e Schwarzkopf, L. 2005. Epizootiology of blood parasites in an Australian
159 lizard: a mark-recapture study of a natural population. *International Journal for*
160 *Parasitology* 35: 11-18.
- 161 Santos, M.M.V.; O'Dwyer, L.H.; Silva, R.J. 2005. Seasonal variation of *Hepatozoon* spp.
162 (Apicomplexa: Hepatozoidae) parasitemia from *Boa constrictor amarali* (Serpentes,
163 Boidae) and *Hydrodynastes gigas* (Serpentes, Colubridae). *Parasitology Research* 97:
164 94-97.
- 165 Široký, P.; Kamler, M.; Modrý, D. 2005. Prevalence of *Hemolivia mauritanica*
166 (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the
167 genus *Testudo* in the east mediterranean region. *Folia Parasitologica* 52: 359-361.
- 168 Široký, P.; Kamler, M.; Modrý, D. 2004. Long-term occurrence of *Hemolivia* cf.
169 *mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in captive *Testudo*

122 (1996). Nós tivemos a oportunidade de verificar que o *H. caimani* pôde ser encontrado por
123 pelo menos um ano no sangue de um *C. yacare* juvenil naturalmente infectado, oriundo do
124 Pantanal e mantido em laboratório fora da área de transmissão como fonte de infecção em
125 experimentos com possíveis mosquitos vetores (L.Viana, dados não publicados), reforçando a
126 hipótese de que infecções longas possam ocorrer em jacarés *C. yacare*, e provavelmente
127 também em *C. latirostris*, em infecções naturais no campo.

128 A ocorrência de ciclos merogônicos constantes de hemogregarinas em répteis
129 infectados, são sugeridos como os responsáveis pela duração relativamente longa das
130 infecções (Hull e Camin 1960). Outro fator envolvido pode ser a longa duração dos eritrócitos
131 de répteis. Por exemplo, na tartaruga *Terrapene carolina* (600-800 dias) ou no aligátor
132 *Alligator mississippiensis* a duração dos eritrócitos varia de 300 a 1320 dias, dependendo da
133 temperatura de manutenção do animal (Davies e Johnston 2000).

134 A consequência imediata das infecções relativamente longas para hepatozoídeos,
135 como o *H. caimani*, é que os vertebrados podem servir como fonte de infecção perene para
136 seus vetores, contribuindo para a existência de prevalências geralmente altas na população de
137 seus hospedeiros répteis na natureza e para a perpetuação da espécie no tempo e no espaço
138 (Široký et al. 2004, Viana et al. 2010a).

- 170 *marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence for cyclic merogony? Journal of
171 Parasitology 90: 1391-1393.
- 172 Sorci, G. 1996. Patterns of haemogregarine load, aggregation and prevalence as a function of
173 host age in the lizard *Lacerta vivipara*. Journal of Parasitology 82: 676-678.
- 174 Ujvari, B.; Madsen, T.; Olsson, M. 2004. High prevalence of *Hepatozoon* spp.
175 (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from
176 tropical Australia. Journal of Parasitology 90: 670-672.
- 177 Viana, L.A. e Marques, E.J. 2005. Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in
178 *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) from Pantanal, Corumbá, MS,
179 Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 14: 173-175.
- 180 Viana, L.A.; Paiva, F.; Coutinho, M.E.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2010a. *Hepatozoon caimani*
181 (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal
182 region, Brazil. Journal of Parasitology 96: 83-88.
- 183 Viana, L.A.; Soares, P.; Paiva, F.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2010b. Caiman biting mosquitoes
184 and the natural vector of *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae). Journal of
185 Medical Entomology (manuscrito aceito para publicação)
- 186 Viana, L.A.; Soares, P.; Silva, J.E.; Paiva, F.; Coutinho, M.E.; Lourenço-de-Oliveira, R.
187 2010c. Anuros como hospedeiros paratênicos do *Hepatozoon caimani* e transmissão
188 para jacarés *Caiman yacare* e *Caiman latirostris*. (Capítulo 3).

CAPÍTULO 5

**TRANSMISSÃO DE *HEPATOZOON CAIMANI* (APICOMPLEXA:
HEPATOZOIDAE) PARA O JACARÉ *CAIMAN YACARE* (CROCODYLIA:
ALLIGATORIDAE) ATRAVÉS DO CANIBALISMO**

Manuscrito em preparação para publicação no **The Journal of Parasitology**

Este trabalho terá como autores: **Lúcio André Viana**, Fernando Paiva e Ricardo

Lourenço-de-Oliveira

1 **TRANSMISSÃO DE *HEPATOZOON CAIMANI* (APICOMPLEXA:**
2 **HEPATOZOIDAE) PARA O JACARÉ *CAIMAN YACARE* (CROCODYLIA:**
3 **ALLIGATORIDAE) ATRAVÉS DO CANIBALISMO**

4
5
6
7 Lúcio André Viana, Fernando Paiva[†], Ricardo Lourenço-de-Oliveira

8
9 Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil
10 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 21045-900

11
12
13 [†]Laboratório de Parasitologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências
14 Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária,
15 CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

16
17 Corresponding author: Lúcio A. Viana

18 Tel: (55-21) 2562-1262

19 e-mail: lucviana74@gmail.com

20 RESUMO

21 O comportamento de canibalismo em crocodilianos parece ocorrer geralmente sob condições
22 estressantes, associadas à baixa quantidade de alimento disponível ou principalmente como
23 defesa de seus territórios. A ocorrência de cistos contendo cistozoítos no fígado de jacarés
24 *Caiman crocodilus* experimentalmente infectados pelo *Hepatozoon caimani* sugere que a
25 predação intraespecífica possa causar a transmissão do parasito entre jacarés. O objetivo do
26 estudo foi verificar a possibilidade de transmissão do *H. caimani* pelo canibalismo entre
27 jacarés *C. yacare*. *Caiman yacare* não infectados foram alimentados com vísceras de um
28 jacaré *C. yacare* silvestre e naturalmente infectado pelo *H. caimani*. O exame a fresco do
29 fígado do jacaré naturalmente infectado revelou formas císticas compatíveis
30 morfometricamente com o *H. caimani*. Um gametócito morfológicamente idêntico ao *H.*
31 *caimani* foi observado na circulação sanguínea de um dos jacarés após 168 dias da ingestão.
32 O encontro do período pré-patente relativamente longo, as prováveis condições em que o
33 canibalismo entre *C. yacare* possam ocorrer, e a avaliação da importância do canibalismo na
34 transmissão do *H. caimani* são discutidas.

35

36 INTRODUÇÃO

37

38 Os parasitos do gênero *Hepatozoon* possuem ciclos de vida complexos que podem
39 envolver diversos hospedeiros e a transmissão para os hospedeiros vertebrados ocorre por
40 diversas vias (Landau et al. 1972, Desser 1993, Smith e Desser 1997). No caso do
41 *Hepatozoon caimani*, parasito de algumas espécies de crocodilianos na América do Sul, o
42 ciclo parasitário ocorre da seguinte maneira: uma vez no sistema digestivo do hospedeiro
43 vertebrado, os esporozoítos penetram em células da *lamina propria* do intestino delgado dos
44 jacarés. Em seguida, ocorre a multiplicação assexuada, merogonia, gerando células filhas
45 denominados merozoítos. Parte destes mantém repetidos ciclos sexuais destinados à

46 manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado, ao passo que outros penetram em
47 eritrócitos e transformam-se em gametócitos, formas sexuadas, que vão se fecundar no
48 interior do inseto vetor e dar origem a fase assexuada, denominada de esporogonia, que
49 culmina com a formação de milhares de esporozoítos. A ingestão de vetores invertebrados
50 infectados com oocistos contendo esporozoítos consiste na via mais conhecida na transmissão
51 para os hospedeiros vertebrados.

52 Contudo, a infecção por hepatozoídeos em vertebrados, muitas vezes, acarreta na
53 formação de cistos, que apresentam, em seu interior, formas infectantes denominadas de
54 cistozoítos (Landau et al. 1972, Desser 1990, Johnson et al. 2008, Johnson et al. 2009). Por
55 exemplo, Landau et al. (1972) demonstraram a transmissão do parasito *Hepatozoon*
56 *domerguei* para diferentes espécies de lagartos e serpentes. Ou seja, lagartos que haviam
57 ingerido mosquitos *Cx. fatigans* e *Anopheles stephensi* contendo esporozoítos apresentaram
58 posteriormente gametócitos na circulação sanguínea e cistos com cistozoítos em suas vísceras.
59 Em seguida serpentes que ingeriram vísceras destes lagartos infectados apresentaram
60 gametócitos intraeritrocíticos do *H. domerguei*. Desser (1990) registrou a ocorrência de
61 cistos com um cistozoíto nos pulmões de esquilos *Sciurus carolinensis*, naturalmente
62 infectados com o parasito *H. griseisciuri*. Contudo, o autor não realizou experimentos de
63 transmissão utilizando os cistos encontrados nas vísceras do esquilo.

64 A transmissão de hepatozoídeos pela predação de hospedeiros paratênicos parece ser
65 importante quando os hospedeiros vertebrados que, por conta de seus hábitos, possuem pouca
66 ou nenhuma possibilidade de ingerirem os vetores invertebrados, como no caso de serpentes e
67 ou crocodilianos. Com efeito, a ingestão de artrópodes vetores, tais como mosquitos, deve
68 ocorrer acidentalmente para os predadores citados (Smith et al. 1994, Lainson et al. 2003,
69 Paperna e Lainson 2004). Os jacarés *C. yacare* incluem pequenos artrópodes em sua dieta
70 basicamente no seu primeiro ano de vida. Entretanto, a presença de dípteros, como culicídeos
71 não tem sido observada na sua dieta (Santos et al. 1996). E, conforme os crocodilianos

72 aumentam de tamanho, a frequência de artrópodes em sua dieta de uma maneira geral
73 diminui, uma vez que principalmente peixes passam a ser as presas mais prevalentes
74 (Magnusson et al. 1987, Silveira e Magnusson 1999). Assim, cistos do parasito *H.*
75 *caimani* foram observados no fígado de jacarés *C. crocodilus* após a ingestão de vísceras
76 infectadas dos anuros *Rana catesbeiana* e *Leptodactylus fuscus* (Lainson et al. 2003). Da
77 mesma maneira, cistos foram encontrados na serpente *Boa constrictor constrictor* após a
78 ingestão do lagarto *Tropiduros torquatos*, infectado com cistos do *Hepatozoon terzii* (Paperna
79 e Lainson 2004).

80 Viana et al. (2010a) identificaram onze espécies de culicídeos que realizavam repasto
81 sanguíneo em jacarés *Caiman yacare*, na região do Pantanal, no Brasil. As infecções naturais
82 por *H. caimani* em vetores foram encontradas exclusivamente em mosquitos do gênero *Culex*, e
83 a espécie *Cx. (Melanoconion) theobaldi* foi incriminada como principal vetor do *H. caimani*
84 para os jacarés *C. yacare*. Tal fato se deve a elevada abundância anual desta espécie picando
85 jacarés, maior taxa de infecção natural pelo parasito, e ao sucesso na realização de infecções
86 experimentais para jacarés limpos, mediante a ingestão do *Cx. theobaldi* contendo oocistos
87 maduros. Porém, hipoteticamente, há poucas chances de jacarés se infectarem ingerindo
88 mosquitos infectados como comentamos acima e vias alternativas de transmissão necessitam
89 ser investigadas.

90 Tendo visto que cistozoítos funcionam como unidades de transmissão para
91 hepatozoídeos entre hospedeiros vertebrados e a existência do comportamento de canibalismo
92 entre crocodilianos, mesmo que em baixa frequência (Lang 1987, Rootes e Chabreck 1993), o
93 objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência da transmissão do parasito *H. caimani* para *C.*
94 *yacare*, através do canibalismo.

95

96

97

98 **MATERIAIS E MÉTODOS**

99

100 *Animais*

101 Para realização do estudo foram utilizados quatro *C. yacare* juvenis com
102 aproximadamente 18 meses de idade, e de 25cm de comprimento rostro-cloacal. Os mesmos
103 foram obtidos do criatório comercial Cacimba de Pedra, localizado no município de Miranda,
104 MS. Os animais foram coletados ainda como ovos no ambiente silvestre, incubados
105 artificialmente e criados em condições de cativeiro até o momento de sua transferência para o
106 laboratório. Os crocodilianos foram mantidos à temperatura ambiente, em um tanque de fibra-
107 de-vidro (50% de área seca e 50% com água com aproximadamente 15cm de profundidade),
108 coberto por um tecido, para impedir o acesso de mosquitos e outros insetos. A temperatura da
109 água foi mantida constante mediante a utilização de um termostato ($\approx 26^{\circ}\text{C}$) A alimentação
110 foi baseada em carne bovina, oferecida quatro vezes por semana.

111 Um *C. yacare* adulto foi capturado nas proximidades da Base de Estudos do Pantanal
112 (BEP), da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), localizada no município de
113 Corumbá/MS (19°34'37"S 57 °00'42"W). O animal foi examinado para presença de
114 gametócitos do *H. caimani*, mediante a observação de esfregaços sanguíneos, achando-se com
115 parasitemia de cinco gametócitos/2000 hemáceas contadas. A obtenção de amostras
116 sanguíneas foi realizada pelo corte da ponta das unhas em intervalos semanais. O diagnóstico
117 do parasito foi confirmado pelas características morfométricas dos gametócitos sob aumento
118 de 1.000x, segundo a redescrição de Lainson et al. (2003). O jacaré naturalmente infectado foi
119 sacrificado e amostras do tecido hepático foram comprimidas entre lâminas e lamínulas para
120 exame a fresco.

121

122

123

124 *Infecção experimental*

125 Antes da realização dos experimentos, o sangue dos jacarés juvenis foi examinado por
126 duas vezes quanto à presença de hepatozoídeos, mostrando-se negativos. Porções do fígado
127 do jacaré *C. yacare* naturalmente infectado pelo parasito foram inoculados na porção inicial
128 do esôfago de dois jacarés *C. yacare* limpos. Outros dois jacarés juvenis da mesma origem
129 foram utilizados como controle e mantidos nas mesmas condições que os animais inoculados.

130 A presença de gametócitos do *H. caimani* nos jacarés juvenis inoculados foi verificada
131 mediante a observação de esfregaços sanguíneos fixados com metanol e corados com Giemsa,
132 com a periodicidade e método escritos acima.

133 A captura do *C. yacare* infectado no Pantanal e manutenção dos animais limpos na
134 Universidade Federal do Mato Grosso do Sul foi autorizada pelo IBAMA, Ministério do Meio
135 Ambiente (protocolo 02014.000785/2006-91).

136

137 **RESULTADO E DISCUSSÃO**

138 O exame a fresco do fígado do jacaré naturalmente infectado revelou formas císticas
139 compatíveis morfometricamente com o *H. caimani*. Dentre os dois jacarés juvenis que
140 ingeriram o fígado do *C. yacare* naturalmente infectado pelo *H. caimani*, foi observado
141 somente um gametócito intraeritrocitário, em apenas um dos crocodilianos. O período pré-
142 patente foi de 168 dias após ingestão das vísceras do *C. yacare* infectado. Os dois *C. yacare*
143 mantidos como controles apresentaram-se sempre negativos durante o exame dos esfregaços.

144 O ciclo do *H. caimani* no jacaré infectado através da ingestão de animais pode
145 demandar mais tempo para que a parasitemia seja patente, e a merogonia a partir das formas
146 infectantes ingeridas ainda é obscura no caso deste parasito (Lainson et al. 2003). O período
147 pré-patente de 168 dias para o aparecimento do gametócito na circulação sanguínea foi longo
148 em comparação ao observado pela ingestão das vísceras infectadas de anuros, 74-80 dias, ou

149 de 41-94 dias após a ingestão mosquitos *Culex* (*Culex*) *bidens* e *Cx.* (*Melanoconion*) spp. com
150 esporozoítos formados (Viana et al. 2010a, 2010b).

151 Ainda não se sabe quanto tempo é necessário para que se estabeleça a merogonia
152 cíclica e responsável pela manutenção da infecção nos jacarés por períodos relativamente
153 longos (Capítulo 4). Assim, não se pode descartar a possibilidade do parasito ampliar a
154 merogonia, antes de investir na gametogonia no hospedeiro *C. yacare*. Esta hipótese pode
155 explicar porque foi encontrado somente um gametócito em um exemplar do *C. yacare*
156 experimentalmente infectado com 168 dias após a inoculação.

157 Segundo Polis (1981), em sua revisão sobre o fenômeno da predação intraespecífica,
158 aproximadamente 1.300 espécies de animais apresentam o comportamento de canibalismo. O
159 mesmo está associado à transmissão de diversos patógenos para o homem e animais
160 silvestres, seja pela predação de indivíduos vivos ou mesmo por necrofagia (Rudolf e
161 Antonovics 2006). O único crocodiliano que apresenta registros sistemáticos de predação
162 intraespecífica é a espécie *Alligator mississippiensis*, encontrada na região sul da América do
163 Norte (ver revisão em Rootes e Chabreck 1993). Embora, não haja o registro de canibalismo
164 em estudos sobre a dieta de algumas espécies de jacarés sulamericanos (Thorbjarnarson 1993,
165 Santos et al. 1996, Silveira e Magnusson 1999, Horna et al. 2001, Marioni et al. 2008,
166 Borteiro et al. 2008), acredita-se que este tipo de predação deva ocorrer entre crocodilianos
167 em frequências relativamente baixas na natureza (Lang 1987).

168 Contudo, no Pantanal a duração da estiagem pode variar de ano a ano, resultando
169 numa forte pressão sobre as populações animais e vegetais (Brown 1986). A baixa quantidade
170 de alimentos disponíveis em coleções de água remanescentes durante a estação de seca,
171 somado à elevada densidade de jacarés *C. yacare* nestes locais, podem compor um cenário
172 propício para a ocorrência de predação intraespecífica entre jacarés. A elevada densidade de
173 uma dada população animal em um determinado local é uma das principais causas da
174 predação intraespecífica (Polis 1981). Muitas vezes tal fenômeno é usualmente associado com

175 espécies que mantêm ativamente seus territórios e altas concentrações propicia a violação do
176 espaço mínimo entre os indivíduos, levando ao ataque entre os animais. A morte de
177 coespecíficos do jacaré *C. yacare* em condições ambientais estressantes poderia aumentar a
178 possibilidade de consumo de carcaças entre os jacarés. Estes crocodilianos podem ser vistos
179 alimentando-se de carcaças de animais em decomposição, geralmente peixes (L. Viana,
180 observação pessoal). No Pantanal ainda ocorrem episódios de caça ilegal de jacarés *C. yacare*
181 para o consumo de carne (Z. Campos\EMBRAPA-Pantanal, observações pessoais). Após
182 serem mortos e terem suas caudas retiradas, os caçadores descartam o restante da carcaça dos
183 animais nos locais de captura e esta pode então servir de alimento para outros jacarés *C.*
184 *yacare* nas proximidades. Contudo, não se sabe se os cistos do *H. caimani* podem permanecer
185 viáveis por períodos relativamente longos durante o processo de decomposição.

186 Em relação à contribuição do canibalismo na transmissão do *H. caimani* em condições
187 naturais é importante ter em mente que o *C. yacare*, como outros crocodilianos, é
188 extremamente oportunista em relação à captura de suas presas, e sob condições ambientais
189 propícias, a predação intraespecífica pode vir a ocorrer. Essa via de transmissão muito
190 provavelmente é menos importante do que infecções através da ingestão de cistozoítos em
191 vísceras de anuros (Capítulo 3) ou de peixes (Lourenço-e-Oliveira, dados não publicados) e
192 de mosquitos *Cx. (Melanoconion) spp.* com esporozoítos do parasito.

193

194 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 195 Borteiro C, Gutiérrez F, Tedros M, Kolenc F (2008) Food habits of the broad-snouted caiman
196 (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae) in northwestern Uruguay. Stud Neotrop
197 Fauna E 44: 31-36.
- 198 Brown KS Jr (1986) Zoogeografia da região do Pantanal Mato-grossense. In. Anais do
199 Iº Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Embrapa Pantanal,
200 Corumbá, Brasil. p. 137-138.
- 201 Desser SS (1990) Tissue “cysts” of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus*
202 *carolinensis*: the significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. J Parasitol 76: 257-
203 259.
- 204 Desser, S.S. 1993. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In. Parasitic Protozoa, vol.
205 4. Ed. Levine, N. Academic Press, New York. pp. 247-272.
- 206 Horna JV, Cintra R, Ruesta PV (2001) Feeding ecology of black caiman *Melanosuchus niger*
207 in a western Amazonian forest: the effects of ontogeny and seasonality on diet
208 composition. Ecotropica 7: 1-11.
- 209 Johnson EM, Allen KE, Pancieira RJ, Ewing SA, Little SE (2009) Experimental transmission
210 of *Hepatozoon americanum* to New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and
211 infectivity of cystozoites for a dog. Vet Parasitol 164: 162-166.
- 212 Johnson EM, Allen KE, Pancieira RJ, Little SE, Ewing SA (2008) Infectivity of *Hepatozoon*
213 *americanum* cystozoites for a dog. Vet Parasitol 154: 148-150.
- 214 Lainson R, Paperna I, Naiff RD (2003) Development of *Hepatozoon caimani* (Carini,
215 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the
216 frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:
217 103-113.
- 218 Landau I, Michel JC, Chabaud AG (1972) Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*;
219 discussion sur les caracteres fondamentaux d'un cycle de Coccidie. Z Parasitenkd 38: 250-
220 270.
- 221 Lang JW (1987) Crocodilian behaviour: implications for management. In Wildlife
222 management of crocodiles and alligators. Webb GJW, Manolis SC, Whitehead PJ
223 (eds.). Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton. p. 273-294.

- 224 Magnusson WE, Silva EV, Lima AP (1987) Diets of amazonian crocodilians. J
225 Herpetol 21: 85-95.
- 226 Marioni B, Silveira R da, Magnusson WE, Thorbjarnarson JB (2008) Feeding behavior
227 of two sympatric caiman species, *Melanosuchus niger* and *Caiman crocodilus*, in
228 the brazilian amazon. J Herpetol 42: 768-772.
- 229 Paperna I, Lainson R (2004) *Hepatozoon* cf. *Terzii* (Sambon e Seligman, 1907) infection in
230 the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: transmission to the mosquito
231 *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropiduros torquatus*. Parasite 11: 175-181.
- 232 Polis GA (1981) The Evolution and Dynamics of Intraspecific Predation. Annual Annu Rev
233 Ecol Syst Rev Ecol Syst 12: 225-251.
- 234 Rootes WL, Chabreck RH (1993). Cannibalism in the american alligator. Herpetologica 49:
235 99-107.
- 236 Rudolf VHW, Antonovics J (2007) Disease transmission by cannibalism: rare event or
237 common occurrence? Proc R Soc B 274: 1205-1210.
- 238 Santos AS, Stoll MN, Pinheiro MS, Campos Z, Magnusson WE, Mourão G (1996)
239 Diets of *Caiman crocodilus yacare* from different habitats in Brazilian Pantanal.
240 Herpetol J 6: 111-117.
- 241 Silveira R da, Magnusson WE (1999) Diets of spectacled caiman and black caiman in
242 the Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. J Herpetol 33: 181-192.
- 243 Smith TG e Desser SS (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Hepatozoon* Miller,
244 1908 (Apicomplexa: Adeleorina). Syst Parasitol 36: 213-221.
- 245 Smith TG, Desser SS, Martin DS (1994) The development of *Hepatozoon sipedon* n.
246 sp. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water
247 snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C.*
248 *territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*).
249 Parasitol Res 80: 559-568.
- 250 Thorbjarnarson JB (1993) Diet of the spectacled caiman (*Caiman crocodilus*) in the
251 central Venezuelan llanos. Herpetologica 49: 108-117.
- 252 Viana LA, Soares P, Paiva F, Lourenço-de-Oliveira R (2010a) Caiman biting mosquitoes and
253 the natural vector of *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae). J Med Entomol
254 (manuscrito aceito para publicação).

- 255 Viana LA, Soares P, Silva JE, Paiva F, Coutinho ME, Lourenço-de-Oliveira R (2010b)
- 256 Anuros como hospedeiros paratênicos do *Hepatozoon caimani* e transmissão para jacarés
- 257 *Caiman yacare* e *Caiman latirostris*. (Capítulo 3)

10. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES

O presente trabalho reúne um conjunto de observações resultantes de investigações que se iniciaram inspiradas em estudos realizados por R. Lainson. Lainson (1995) registrou o primeiro encontro de um hemosporídeo em um membro da ordem Crocodylia. No mesmo estudo, foi realizada a descrição do parasito malárico *Progarnia archosauriae* em jacarés *C. crocodilus*, na Ilha de Marajó, Estado do Pará. O autor observou a ocorrência de merogônia frequentemente envolvendo linfócitos e monócitos, mas podendo ocorrer também em trombócitos e eritrócitos jovens. Já, os gametócitos foram observados em linfócitos, monócitos e trombócitos.

Tal fato inusitado levou à hipótese da ocorrência de esporozoários maláricos em outras espécies de crocodilianos e em outros biomas, tal como o jacaré *Caiman yacare* na região do Pantanal. Logo, em 2000, foi realizado um estudo com o objetivo de verificar a ocorrência de parasitos sanguíneos no *C. yacare* no Pantanal, especificamente na subregião do Rio Negro (Viana e Marques 2005).

Na amostra de jacarés examinados (n=28), 71% apresentaram hemoparasitos, mas não foram encontrados parasitos maláricos como no estudo da Amazônia. Além disso, a identidade da hemogregarina encontrada na amostra não foi confirmada. Contudo, na região do Pantanal, os jacarés *C. yacare* podem ser observados formando grupos relativamente grandes, sobretudo no período de estiagem. Atualmente a espécie apresenta uma das maiores densidades entre os crocodilianos no mundo, podendo ser encontrados aproximadamente 100

indivíduos/km² dentro das diversas sub-regiões do Pantanal (Coutinho e Campos 1996). Além de ser espécie criada em algumas fazendas com a finalidade de obtenção de pele e carne. Esse panorama favoreceu a realização de estudos mais detalhados e que pudessem oferecer dados mais ricos sobre a história natural e especialmente sobre a transmissão de hemogregarinas no Pantanal.

Prevalência

De modo geral, os estudos realizados com hepatozoídeos de répteis envolvem relativamente poucos indivíduos com o objetivo principal de descrever novas espécies, e onde as formas comumente registradas são gametócitos intraeritrocitários presentes na circulação sanguínea (Desser 1993). Estudos sobre a prevalência e intensidade de infecção por hemogregarínídeos têm sido realizados em algumas populações naturais de lagartos (Schall 1986, Reardon e Norbury 2004, Salkeld e Schwarzkopf 2005, Amo et al. 2005a, 2005b, Naldo et al. 2009), serpentes (Lowichik e Yaeger 1987, Thoisy et al. 2000, O'Dwyer et al. 2003, Ujvari et al. 2004) e tartarugas (Široký et al. 2005, Mihalca et al. 2008). Contudo, a distribuição da carga parasitária dos hepatozoídeos, assim como os seus vetores naturais e possíveis vertebrados que podem atuar como hospedeiros intermediários nos ciclos são desconhecidos para a quase totalidade das espécies.

No sistema parasito-hospedeiro formado pelo parasito *H. caimani* e seu hospedeiro vertebrado, o jacaré *C. yacare*, o conhecimento do parasitismo no ambiente natural se restringia aos níveis de prevalência na população silvestre do *C. yacare*. O estudo realizado por Viana e Marques (2005) havia mostrado que hemogregarinas semelhantes ao *H. caimani* poderiam ser encontradas em níveis relativamente altos na população do crocodiliano (71%, n=28). Contudo, a quantidade e amostragem no que concerne à faixa etária dos animais examinados não permitiram aprofundamentos em relação a questões como quais subpopulações (gênero e tamanho/idade) estariam em maior risco de contrair a infecção ou que apresentariam maior prevalência e/ou carga parasitária pelo *H. caimani*.

Logo, uma das preocupações iniciais na formulação desta tese foi aumentar a quantidade de jacarés *C. yacare* amostrados, em um número que fosse estatisticamente significativo para se verificar a prevalência numa dada população e realizar estratificações na mesma. Postulava-se que a prevalência aumentaria com o tamanho/idade dos jacarés, provavelmente devido a um maior tempo de exposição aos vetores e à maior probabilidade dos *C. yacare* terem predado hospedeiros intermediários. A quantidade de crocodilianos amostrados permitiu a comprovação da hipótese acima, quando observamos (Capítulo 1) que os crocodilianos maiores apresentaram os maiores níveis de prevalência. E, com a estratificação da população do *C. yacare*, segundo tamanho/idade, pode-se verificar que os indivíduos filhotes mostraram-se sempre negativos, ao contrário dos animais adulto jovens e adultos, com 100% de infecção. O grupo de animais de juvenis, de 26-50 cm de comprimento do focinho a cloaca, e que potencialmente achavam-se com 1,5-2 anos de vida, mostraram prevalência de 63%.

Foram desenvolvidas técnicas moleculares para o diagnóstico de hepatozoídeos de alguns répteis, como a serpente australiana *Liasis fuscus* (Ujvari et al. 2004) e diversos anfíbios do gênero *Rana* (Smith et al. 1999, Boulianne et al. 2007). Oligonucleotídeos baseados em genes das subunidades ribossômicas foram desenvolvidos por Perkins e Keller (2001) para diagnóstico e estudos filogenéticos de hemogregarinas em lagartos. Smith et al. (1999) utilizou seqüências de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossômico para estimar as relações evolutivas entre espécies de hepatozoídeos encontrados em serpentes, anuros e mosquitos no Canadá. Boulianne et al. (2007) obteve a diferenciação entre os hepatozoídeos de anuros, *H. clamatae* e *H.*

catesbiana. Porém, por não dispormos de métodos moleculares com especificidade de diagnóstico para o *H. caimani*, neste estudo empregamos métodos tradicionais como a microscopia.

Por conta disso pode-se hipotetizar que, o resultado que revelou a alta quantidade de animais negativos dentre os jacarés mais jovens, todos os filhotes e 37% dos animais juvenis, poderia ser devido à ocorrência de cargas parasitárias sub-patentes do *H. caimani* não detectadas nos exames ao microscópio. Contudo, acreditamos que os animais realmente não apresentaram infecções, especificamente os filhotes, devido a diferenças quanto ao comportamento alimentar entre os jacarés filhotes-juvenis e os animais adulto jovens e adultos. Apesar dos filhotes poderem se infectar ao ingerirem mosquitos com esporozoítos formados, como demonstrado em infecções experimentais que realizamos (Capítulo 2), no ambiente natural as infecções devem ocorrer principalmente quando jacarés menores passam a ingerir vertebrados, contendo cistos do parasito. Mesmo que artrópodes sejam a fonte inicial de alimento para jacarés no primeiro ano de vida, insetos tão pequenos como mosquitos não parecem ser elementos comuns na dieta (Santos et al. 1996). Porém, conforme os crocodilianos juvenis vão adicionando gradualmente vertebrados a sua dieta, as infecções aparecem nesta categoria. Reforça esta hipótese, o fato de que ao examinarmos 20 *C. yacare*, entre filhotes e juvenis (29,6cm de CRC em média, 18.2-34.3cm), mantidos em uma área enzoótica do *H. caimani*, desde a eclosão até aproximadamente um ano, não detectamos infecções pelo *H. caimani* (Viana, dados não publicados). O local onde os animais eram mantidos era murada, impedindo a entrada de vertebrados, mas permitia o acesso de artrópodes silvestres utilizados como alimentação natural para os filhotes.

Estudos realizados por Coutinho (2003) mostraram que, no Pantanal, a condição corporal do *C. yacare* é menor entre os meses de julho e dezembro. A passagem pelo período de estiagem no Pantanal leva a uma diminuição gradual das coleções de água temporária no campo, tais como lagoas e charcos, locais comumente utilizados durante o ano pelos jacarés na região. A queda da condição corporal dos jacarés se deve ao aumento da densidade entre os indivíduos nos remanescentes aquáticos e à gradual diminuição de alimento nestes locais. Consequentemente, imagina-se que poderia haver a elevação da carga parasitária em animais examinados no período de seca (Opplinger et al. 1998, Brown et al. 2000, Sandland e Minchella 2003). Porém, nossos resultados não mostraram nenhuma relação entre cargas parasitárias e a estação do ano em que os jacarés foram examinados.

O método adequado para se investigar a variação da carga parasitária, seria o monitoramento dos mesmos indivíduos ao longo do ano. Durante a presente tese, programamos o exame de animais teoricamente retidos em uma lagoa, numa área enzoótica no município de Miranda (MS), no Pantanal. Porém, dos 38 animais examinados e marcados numa primeira coleta, em dezembro de 2008, apenas cinco e nenhum foram capturados na 2^o e 3^a campanha, respectivamente. Infelizmente, houve uma diminuição da quantidade de animais no local de estudo devido a fuga dos jacarés da área do lago por aberturas na cerca, e a investigação teve de ser interrompida.

Os crocodilianos são organismos que minimizam seu gasto energético e, como outros répteis, apresentam taxas metabólicas menores em relação a

mamíferos, por exemplo. Schall (1986), estudando o efeito do parasitismo de uma hemogregarina no lagarto *Cnemidophorus arubensis*, não observou nenhum efeito adverso sobre variáveis fisiológicas e comportamentais em hospedeiros infectados. Também não observou diferenças sazonais quanto à prevalência ou carga parasitária. Por outro lado, resultados contrários foram obtidos em lagartos parasitados por uma espécie de hemogregarina não identificada. Ou seja, após sofrerem autotomia de suas caudas, os lagartos parasitados apresentaram um período maior para a reconstituição da mesma que os não infectados, além de alterações fisiológicas (Opplinger et al. 1996, Opplinger e Clobert 1997).

Um das poucas generalizações em estudos sobre o parasitismo em populações naturais é a constatação de que os parasitos se distribuem de maneira agregada nos seus hospedeiros (Poulin 2007), ou seja, em uma amostra populacional, as maiores cargas parasitárias devem ser encontradas em relativamente poucos indivíduos (Anderson e Gordon 1982, Esch e Fernández 1993, Poulin 1993). Estudos têm demonstrado que tal padrão pode ocorrer devido a fatores como diferenças comportamentais, fisiológicas ou imunológicas (ver revisão em Shaw et al. 1998). A distribuição agregada do *H. caimani* na população de jacarés *C. yacare* examinada neste estudo não pode ser explicada pelo peso ou tamanho/idade dos hospedeiros. O jacaré *C. yacare* difere no seu comportamento entre as fases de filhote-juvenis e adultos, e tais grupos geralmente não se sobrepõem em uma mesma lagoa, além de diferirem quanto ao hábito alimentar. Se inicialmente, os filhotes se alimentam de pequenos artrópodes, aqueles na fase juvenil iniciam já uma gradual incorporação de pequenos vertebrados, como pequenos anuros e peixes (Santos et al. 1996). Os

crocodilianos adultos são caracterizados como oportunistas e generalistas, consumindo diversos grupos de vertebrados e invertebrados, e suas escolhas dependem, em muito, dos itens disponíveis no ambiente em torno (Magnusson et al. 1987, Silveira e Magnusson. 1999).

Diferenças fisiológicas são encontradas, evidentemente, entre machos e fêmeas. Mas não detectamos diferenças significativas com relação à carga parasitária segundo o gênero. Estudos têm demonstrado que hospedeiros machos são mais susceptíveis ao parasitismo devido a diferenças comportamentais que exigem maior gasto energético, como competição por território ou por fêmeas, e fatores fisiológicos, como a produção de testosterona, hormônio muitas vezes associado à imunossupressão em machos (Zuk e McKean 1996, Salkeld e Schwarzkopf 2005). Logo, postulou-se que a prevalência e/ou carga parasitária do *H. caimani* poderiam diferir quanto ao gênero nos jacarés *C. yacare*. Em nossos resultados não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação ao gênero e entre a prevalência e a carga parasitária. Não se pode descartar a hipótese de que o número relativamente baixo de fêmeas capturadas pode ter exercido alguma influência nos resultados obtidos.

Em relação à influência da agregação do *H. caimani* na transmissão entre os jacarés *C. yacare* pelos seus vetores, os mosquitos, podemos supor que as maiores cargas parasitárias possam se traduzir em uma maior transmissibilidade aos vetores no ambiente natural. Curiosamente, tivemos a oportunidade de encontrar um jacaré juvenil com 200 gametócitos/2.000 hemácias, a maior carga

parasitária registrada no estudo. Para efeito de comparação, essa carga corresponde a quase vinte vezes o valor médio total encontrado para a população amostrada do *C. yacare* (13.5 ± 13.0 ; $n = 174$; amplitude de 1-96 parasitos). O citado animal foi utilizado experimentalmente como fonte de repasto sanguíneo para mosquitos *Culex quinquefasciatus*, *Aedes fluviatilis* e *Ae. albopictus*, colonizados em laboratório. Para nossa surpresa, todos os culicídeos de ambas as espécies que realizaram repasto no jacaré juvenil morreram, em sua grande maioria um dia após o repasto no jacaré (R Lourenço-de-Oliveira, dados não publicados). Na verdade, grande parte dos insetos infectados tornaram-se moribundos ou morreram seis horas após o repasto. Talvez a numerosa migração dos zigotos através do epitélio do estômago seja a causa desta mortalidade precoce. Em infecções de mosquitos com filárias, *Dirofilaria immitis*, há dois principais momentos de mortalidade do vetor. Quando a parasitemia é elevada nas primeiras horas após o repasto, momento da migração dos parasitos para fora da luz intestinal, e cerca de 2-3 semanas depois, quando da migração das formas infectantes L3 para a cabeça do inseto (Brito et al. 1999, Ahid et al. 2000, Serrão et al. 2001).

Embora o estudo não tenha sido conduzido com os vetores naturais, devido à impossibilidade do estabelecimento de uma colônia estável em condições de laboratório, os resultados sugerem que cargas parasitárias muito elevadas podem diminuir o sucesso de transmissão para os vetores, exatamente por causar a morte dos mesmos. O parasito *Plasmodium mexicanum* é encontrados nos eritrócitos do lagarto *Sceloporus occidentalis*, e é transmitido pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia vexator*, mediante a inoculação dos

esporozoítos presentes nas glândulas salivares do inseto. Schall (2000) verificou que as maiores taxas de infecção por *P. mexicanum* em *L. vexator* eram observadas quando a parasitemia no lagarto era de 1 a 20 gametócitos do *P. mexicanum*/1000 do eritrócitos. Ou seja, a maior quantidade de infecções no vetor foram observadas em densidades relativamente baixas dos gametócitos na circulação sanguínea do lagarto. Em parasitemias entre 20-50 gametócitos de *P. mexicanum*/1000 havia uma estabilização da taxa de infecção em valores relativamente baixos nos flebótomos. Provavelmente, hospedeiros com elevada carga parasitária do *H. caimani* na população do *C. yacare* podem diminuir a sobrevivência dos mosquitos vetores, um fator considerado crítico para a transmissão. Com efeito, o desenvolvimento esporogônico no vetor leva aproximadamente 25 dias para a formação dos esporozoítos, as formas infectantes para os animais vertebrados (Pessoa et al. 1972, Lainson et al. 2003, Viana et al. 2010b).

Um dos fatores que pode ter influenciado na alta prevalência do *H. caimani* na população natural do *C. yacare* pode estar associado à duração das infecções nestes hospedeiros. Um estudo do acompanhamento do parasitismo do *H. caimani* em jacarés *C. yacare* revelou que após uma única infecção experimental gametócitos podem ser detectados por um período de até seis meses nos animais (Capítulo 4). Logo, postula-se que variações da prevalência do *H. caimani* na população do *C. yacare* possam ser encontradas somente em estudos empreendidos em períodos mais longos do que o aqui realizado. Pelo menos dois fatores parecem explicar a longa duração das infecções em hospedeiros

reptilianos: a existência de ciclos merogônicos repetidos (Široký et al. 2004) e a longa duração das células sanguíneas em crocodilianos (Campbell 1996).

Um dos fatores mais importantes que influenciam a prevalência de um parasito em uma população de hospedeiros estão relacionados a diversos aspectos biológicos e ecológicos do vetor, tais como abundância, a taxa de picada, susceptibilidade ao parasita e sobrevivência (Koella 1999).

Vetor

Dentre as aproximadamente 300 espécies descritas no gênero *Hepatozoon*, praticamente nada se conhece sobre os vetores naturais e o desenvolvimento esporogônico que ocorre nestes organismos. A falta de informações tem influência direta em questões ainda não esclarecidas sobre a taxonomia e filogenia dos hepatozoídeos (Smith e Dessler 1997, Mathew et al. 2000, Jakes et al. 2003). Estudos filogenéticos com base em dados morfológicos, ultraestruturais e moleculares sugerem que o gênero *Hepatozoon* pode ser futuramente dividido em dois gêneros (Smith e Dessler 1997). Contudo, a organização do gênero depende da identificação dos vetores e do conhecimento acerca do desenvolvimento esporogônico das espécies nos vetores.

A verificação do desenvolvimento esporogônico também é extremamente importante na identificação correta das famílias Hemogregarinidae e Hepatozoidae, uma vez que a morfologia dos gametócitos, praticamente o único dado comumente descrito para a maioria das espécies, não permite diferenciações seguras entre essas famílias. Nos hepatozoídeos, os oocitos são relativamente

maiores e apresentam milhares de esporozoítos formados no seu interior. Já os membros da família Hemogregarinidae apresentam oocistos menores e produzem quantidades relativamente reduzidas de esporozoítos por oocisto (Desser 1993).

O ciclo de vida das espécies de hepatozoídeos que infectam crocodilianos é parcialmente conhecido e o desenvolvimento esporogônico foi registrado em dois grupos de invertebrados. Hoare (1932) observou oocistos com muitos esporocistos do parasito *H. pettiti* em moscas tsetse da espécie *Glossina palpalis* criadas em laboratório que realizaram experimentalmente repasto sanguíneo sobre o *Crocodylus niloticus*. Infelizmente, o autor não realizou tentativas de infecção experimental para crocodilos limpos e nem demonstrou a transmissão do parasito para crocodilos pela ingestão das moscas. Em um estudo sobre a hemogregarina *Haemogregarina crocodilorum*, no aligátor norte americano *Alligator mississippiensis*, sanguessugas obtidas diretamente de aligátos infectados com o parasito apresentaram no seu interior gametócitos livres e em sizígia. Sanguessugas dissecadas com 139 dias após repasto sobre os crocodilianos apresentaram oocistos com esporozoítos formados (Khan et al. 1980). Contudo, a transmissão da *H. crocodilorum* não foi conseguida com a ingestão de sanguessugas do gênero *Placobdella* infectadas por *A. mississippiensis* limpos. Ou seja, praticamente nada é conhecido sobre os vetores naturais de *Hepatozoon* spp. de crocodilianos.

Um dos aspectos mais relevantes no estudo sobre o ciclo do *H. caimani*, desde a sua descrição há 100 anos, era a identificação do hospedeiro invertebrado no ambiente natural. Na região do Pantanal alguns grupos de invertebrados que

realizam naturalmente repasto sanguíneo em jacarés *C. yacare* eram considerados potenciais vetores do *H. caimani*.

Sanguessugas, provavelmente do gênero *Placobdella* (F. Paiva, com. pessoal), podem ser encontradas com frequência no assoalho bucal dos jacarés *C. yacare*, ou mesmo sobre a lateral do corpo, onde o tegumento é menos queratinizado, e diretamente sobre as placas ósseas, no dorso dos jacarés (L. Viana, obs. pessoal). Sanguessugas coletadas em jacarés naturalmente infectados foram colocadas para realização de repasto sanguíneo sobre jacarés limpos e posteriormente foram inoculadas oralmente em outro grupo de jacarés limpos (L. Viana, dados não publicados). O experimento foi realizado por duas vezes, mas o resultado foi sempre negativo, o que vai de encontro aos resultados obtidos em outros estudos com a sanguessuga *Haementeria lutzi* (Pêssoa et al. 1972, Lainson et al. 2003).

Barros (1999) verificou que o tabanídeo *Phaeotabanus fervens* foi provavelmente atraído pelo *C. yacare*. Estes tabanídeos foram registrados voando junto a uma janela de alojamento onde haviam exclusivamente jacarés confinados para abate. Porém, o autor não observou a hematofagia de mutucas sobre o jacaré *C. yacare*. Contudo, Ferreira et al. (2002) registraram o repasto sanguíneo de quatro espécies de tabanídeos sobre o jacaré *C. crocodilus* na região amazônica. Durante o levantamento de hemoparasitos no *C. yacare*, Viana e Marques (2005) observaram o repasto sanguíneo nos répteis por culicídeos, tanto anofelinos quanto culicídeos, durante o manuseio dos mesmos para obtenção de amostras sanguíneas. Porém, estudos de infecção experimental para

o esclarecimento da esporogonia do *H. caimani* haviam empreendido invertebrados como sanguessugas, triatomíneos e mosquitos, mas as infecções só foram obtidas em culicídeos (Pessoa et al. 1972, Lainson et al. 2003, Paperna e Lainson 2003). Consequentemente, na procura pelos vetores naturais do *H. caimani* na região do Pantanal, definimos como estratégia o levantamento das espécies de culicídeos que realizam repasto sanguíneo no jacaré *C. yacare*.

Os hepatozoídeos são considerados pouco específicos, tanto para os hospedeiros invertebrados quanto vertebrados (Smith 1996) e níveis de especificidade relativamente baixos têm sido observados para os vetores da família Culicidae, nos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Ball et al. 1967, Booden et al. 1970, Smith 1996). Um dos estudos clássicos que exemplifica a baixa especificidade dos hepatozoídeos para os seus vetores invertebrados foi realizado por Ball et al. (1967). Neste, a esporogonia do *H. rarefaciens* foi realizada com sucesso nos mosquitos *Culex tarsalis*, *Anopheles albimanus* e *Aedes sierrensi*. A transmissão do parasito também foi obtida após a ingestão dos mosquitos *Cx. tarsalis* que haviam realizado repasto sanguíneo sobre a serpente infectada *Drymarchon coralis*, foram ingeridos pela serpente *Constrictor constrictor*. Posteriormente, gametócitos intraeritrocíticos do *H. rarefaciens* foram registrados na circulação sanguínea da *C. constrictor*.

Portanto, postulamos que o parasito poderia realizar seu ciclo esporogônico em várias espécies e gêneros de mosquitos. Foi coletado um total de 5272 mosquitos, utilizando-se jacarés *C. yacare* silvestres como isca. Os exemplares foram distribuídos em cinco gêneros, e em onze espécies. Contudo, ao dissecar os

mosquitos após a captura encontramos infecções naturais pelo *H. caimani* somente nos indivíduos do gênero *Culex*, sobretudo no subgênero *Cx. (Melanoconion)*. A espécie *Cx. theobaldi* que determinamos como o vetor principal e primário, apresentou a maior quantidade de infecções naturais, além de ser a espécie mais abundante durante as amostras realizadas por aproximadamente um ano e meio, e ter sido encontrada infectada em vários meses durante este período (Capítulo 2). Transmitimos o parasito para jacarés limpos através da ingestão de mosquitos infectados e incriminamos pela primeira vez *Cx. (Melanoconion)*, especialmente *Cx. theobaldi*, como vetores para um crocodiliano.

O Pantanal compreende diversas subregiões com composição vegetal e fatores abióticos particulares, constituindo efetivamente um mosaico de ambientes (Adámoli 1986). Como nosso estudo foi realizado apenas na subregião do Rio Negro e a fauna de culicídeos na região do Pantanal é praticamente desconhecida, não se pode descartar que, em outras subregiões, a composição da fauna de culicídeos possa apresentar outras espécies que realizem repasto sanguíneo sobre os jacarés *C. yacare* e sejam susceptíveis ao desenvolvimento do *H. caimani*.

Em nossos trabalhos de campo durante a estação das chuvas, tivemos a oportunidade de encontrar quantidades relativamente altas de criadouros de *Cx. (Melanoconion)* spp. Os criadouros eram formados por numerosas poças de água não turva, com uma camada de folhas desprendidas das árvores ao fundo (L. Viana, observação pessoal). Jacarés *C. yacare* podem ser comumente observados

imóveis nestes locais, de modo que, esta sobreposição de hábitos e habitats pode favorecer o contato vetor-hospedeiro, ou seja, os eventos de repasto sanguíneo dos mosquitos sobre jacarés infectados. Na realização das capturas dos jacarés, durante o período noturno, constatamos a realização de repasto sanguíneo dos mosquitos em jacarés que se encontravam imersos na água. Nesta condição, os crocodilianos geralmente deixam expostos somente parte de sua cabeça. Verificamos que, ainda assim, o repasto se processa abundantemente ao redor dos olhos dos jacarés.

A maior dificuldade encontrada para realização desta etapa do estudo foi a identificação específica dos mosquitos do gênero *Culex*, sobretudo do subgênero *Cx. (Melanoconion)*. A taxonomia deste grupo ainda carece de estudos para o esclarecimento das relações entre as espécies, o que se reflete na dificuldade do encontro de chaves dicotômicas que permitam a identificação segura das fêmeas das espécies, objetivo alcançado somente com maior grau de certeza pela observação da morfologia da genitália masculina (Forattini 2002). As espécies do subgênero *Cx. (Melanoconion)* spp. estão subdividas em duas seções: *Spissipes* e *Melanoconion*. A seção *Spissipes* é a única que foi objeto de revisão taxonômica (Forattini e Sallum 1989, Sallum e Forattini 1996). Contudo, os mosquitos *Cx. (Melanoconion)* encontrados realizando repasto sanguíneo em jacarés *C. yacare*, no presente estudo, eram da seção *Melanoconion*. Conseqüentemente, esforços foram realizados para a obtenção de mosquitos machos de *Cx. (Melanoconion)* presentes no local de estudo. Foram utilizadas armadilhas luminosas tipo “CDC” e estabelecemos uma criação em laboratório de proles individualmente obtidas de desovas de fêmeas ingurgitadas na ocasião das capturadas sobre os jacarés. Em

laboratório, foram obtidas oviposições e as formas imaturas de larva e pupa foram mantidas até a eclosão dos adultos, em aproximadamente 20 dias. Os mosquitos machos eclodidos tiveram suas genitálias dissecadas e posteriormente montadas para observação e identificação, mediante a comparação com descrições e ilustrações disponíveis em artigos sobre o subgênero *Cx. (Melanoconion)* (Rozeboom e Komp 1950, Sirivanakarn 1982, Pecor et al. 1992). Em seguida, a designação específica das fêmeas foi obtida pela comparação morfológica entre os machos identificados e as fêmeas coletadas no campo sobre os jacarés. Porém, em alguns casos, devido a grande semelhança entre fêmeas no momento da dissecção, alguns espécimes foram agrupados, como foi o caso de *Cx. idottus* e *Cx. clarki* (Capítulo 2).

É importante ressaltar que praticamente nada se sabia sobre a preferência de *Cx. theobaldi* e outro *Cx. (Melanoconion)*, tais como *Cx. idottus*, *Cx. bastagarius*, *Cx. clarki*, pelo sangue de jacarés. Essas espécies têm sido coletadas principalmente na fase larvar, em charcos, brejos e outros tipos de coleções de água, ou em armadilhas luminosas, que não definem a preferência por hospedeiros. Em coletas realizadas em cavalos, na mesma localidade onde fizemos as capturas de mosquitos em jacarés, anofelinos e outro culicídeos (como *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, *Aedes* e *Culex (Culex)*) compreenderam à quase totalidade das coletas em três equinos utilizados como iscas (R. Lourenço-de-Oliveira e T. Silva do Nascimento, dados não publicados). Portanto, esta tese contribui não somente com a descoberta dos principais vetores naturais de *Hepatozoon* de crocodilianos, mas também traz informações originais sobre o hábito hematofágico de algumas espécies de mosquitos.

Embora os culicídeos *Cx. (Melanoconion) ssp.* sejam componentes bióticos fundamentais no ciclo do *H. caimani* no Pantanal, a ingestão dos mesmos por jacarés *C. yacare* parece pouco provável. O encontro das infecções naturais mais precoces do *H. caimani* ocorre em jacarés juvenis, idade em que o animal passa a ingerir vertebrados (Viana et al, 2010a), juntamente com o exposto anteriormente, reforçam a hipótese da existência de uma via alternativa de transmissão pela predação de hospedeiros vertebrados insetívoros, infectados pelo *H. caiman*, passa a ter importância para infecção dos jacarés.

Hospedeiros intermediários

Ciclos complexos com a participação de diversos hospedeiros são comuns em vários grupos de parasitos e a predação pode ser uma importante via de transmissão para parasitos sob certas circunstâncias (Lafferty 1999). Se unidades de propagação, tais como cistos, puderem sobreviver em animais que são comumente presas de hospedeiros predadores, pode haver um aumento no sucesso de transmissão pela predação (Choisy et al. 2003).

Os hepatozoídeos apresentam ciclos de transmissão que variam em complexidade conforme o grupo de vertebrados que infectam. Os mais diversos podem ser encontrados em hospedeiros reptilianos, tais como lagartos (Smith 1996). Uma das interessantes adaptações dos hepatozoídeos para sua transmissão foi a inclusão de um hospedeiro vertebrado insetívoro, onde ao ingerirem o vetor infectado, o parasito, nas vísceras, se transforma em um cisto contendo formas

infectantes conhecidas como cistozoítos (Landau et al. 1972). Essa adaptação é um passo evolutivo importante para ciclos onde os vetores podem não ser ou definitivamente não são itens comuns na dieta dos hospedeiros vertebrados, e a predação pode apresentar-se como uma das estratégias para dispersão destes parasitos. Para hepatozoídeos de serpentes, animais não insetívoros, onde os principais vetores são mosquitos, a participação de hospedeiros intermediários parece ser de extrema importância para o sucesso das transmissões. Oocistos do parasito *H. sipedon* presentes em mosquitos *Cx. pipiens*, ao serem ingeridos pelo anuro *Rana pipiens* acabam por formar cistos do fígado do mesmo (Smith et al. 1994). A ingestão do anuro pela serpente *Nerodia sipedon sipedon* leva à transmissão do *H. sipedon*. Sloboda et al. (2008) registraram a transmissão de *H. ayorgbor*, parasito da serpente *Python regius*, para serpentes limpas após a ingestão de roedores com cistos no fígado. Em mamíferos, a transmissão do *H. americanum* também foi obtida para cães limpos, após a ingestão de roedores e coelhos portando cistos em suas vísceras (Johnson et al. 2008, Johnson et al. 2009).

O único estudo sobre transmissão de hepatozoídeos para crocodilianos, mediante a ingestão de hospedeiros intermediários foi realizado por Lainson et al. (2003). Cistos com cistozoítos do *H. caimani* existentes no fígado dos anuros *Rana catesbeiana* e *Leptodactylus fuscus* foram capazes de infectar *C. crocodilus* limpos após a ingestão do fígado infectado dos anuros.

Entre as possíveis vias de transmissão do *H. caimani* para seus hospedeiros crocodilianos, a predação de vertebrados com cistozoítos é

provavelmente o mecanismo mais frequente em condições naturais. A ingestão de culicídeos com oocistos formados por jacarés deve ocorrer de forma esporádica, acidentalmente, com o fechamento abrupto da boca do crocodiliano, prendendo mosquitos que poderiam estar realizando repasto sanguíneo na cavidade oral do mesmo, um mecanismo semelhante ao proposto por Hoare (1932) para a ingestão de moscas tsetse *Glossina palpalis* pelo *Crocodilus niloticus*.

No presente estudo, a transmissão experimental do *H. caimani* para o jacaré *C. yacare* foi obtida mediante a ingestão do fígado do anuro *Leptodactylus chaquensis* contendo cistos do parasito. De modo similar, obtivemos a transmissão do *H. caimani* através da ingestão dos anuros silvestres *Scinax nasicus* e *Leptodactylus fuscus* experimentalmente infectados para o jacaré-de-papo amarelo *C. latirostris*. Um levantamento da fauna de anuros realizado da região do Pantanal Sul, no município de Corumbá, entre os anos de 1993 e 1994 registrou 19 espécies distribuídas em quatro famílias e 14 gêneros (Gordo e Campos 2003). Postula-se que no Pantanal espécies de anuros de diferentes gêneros e/ou famílias possam ser susceptíveis ao *H. caimani* e potencialmente participar dos ciclos de transmissão do parasito para o *C. yacare* no ambiente natural.

Nossos dados, juntamente com os de Lainson et al (2003), reforçam a hipótese que o *H. caimani*, assim como outros hepatozoídeos, possuem uma especificidade relativa baixa para os seus hospedeiros intermediários. Tal estratégia pode ser vantajosa se os oocistos puderem permanecer viáveis por

períodos relativamente longos nas vísceras dos anuros, servindo como fontes de infecção perenes para os crocodilianos, o que precisa ser verificado.

Possivelmente, a fase do ciclo de maior risco de morte para o *H. caimani* esteja relacionada ao desenvolvimento no mosquito. Estes invertebrados, evidentemente são mais susceptíveis às variações ambientais e precisam sobreviver por pelo menos 25 dias para a finalização do desenvolvimento esporogônico do parasito. Outros vertebrados recentemente comprovados como hospedeiros intermediários foram peixes (R. Lourenço-de-Oliveira, dados não publicados). Estes animais são considerados um dos itens mais frequentes na dieta do *C. yacare* no Pantanal (Uetanabaro 1989, Santos et al. 1996). É provável que o *H. caimani* possa percorrer diversos elos da cadeia trófica, por diversos vertebrados, até chegar aos jacarés *C. yacare*.

Duas evidências nos levaram a verificar a possibilidade de mais uma via de transmissão do *H. caimani* mediante a predação, no caso, o canibalismo entre jacarés *C. yacare*. A primeira diz respeito ao fato de que muitas espécies de crocodilianos apresentam o comportamento de canibalismo (Lang 1987, Rootes e Chabreck 1993). A segunda, que jacarés *C. crocodilus* infectados pelo *H. caimani*, além de apresentarem gametócitos na circulação sanguínea, também possuem cistos com cistozoítos no fígado (Lainson et al. 2003). Nosso experimento consistiu da alimentação de dois *C. yacare* limpos com pedaços de fígado contendo cistozoítos de um jacaré coespecífico naturalmente infectado (Capítulo 5). Um dos jacarés alimentados apresentou um gametócito, após um período pré-patente relativamente longo (168 dias), quando comparado ao

período observado em infecções com vísceras de anuros (60-80 dias; Cap. 2) e de peixes (R. Lourenço-de-Oliveira, dados na publicados).

Em conjunto, os resultados obtidos após a realização de estudos abordando aspectos diferentes da interação entre o parasito *H. caimani* e seu hospedeiro vertebrado, o jacaré *C. yacare*, na região do Pantanal, permitem fazer algumas inferências. A prevalência relativamente elevada do *H. caimani* na população silvestre do *C. yacare* pode ser explicada pelos seguintes fatores:

- (i) O *H. caimani* apresenta um período de patência relativamente longo, pois parasitos puderam ser encontrados por aproximadamente seis meses em jacarés *C. yacare* experimentalmente infectados e monitorados. De um modo geral as infecções por hepatozoídeos são registradas como longas e com raríssimos registros de eliminação dos parasitos pelos hospedeiros vertebrados.
- (ii) Os insetos vetores são abundantes na área de estudo, podendo ser encontrados em quantidades relativamente altas ao longo do ano, sobretudo o mosquito *Cx. theobaldi*, que apresentou infecção natural em todos os meses de amostragem.
- (iii) A predação de vertebrados pelos jacarés *C. yacare*, tais como anuros e peixes contendo cistozoítos formados, pode ser a principal via de transmissão do *H. caimani* no ambiente natural, uma vez que tais vertebrados são itens frequentes na alimentação dos crocodilianos. Embora o canibalismo entre os *C. yacare* seja comprovado como uma via de transmissão, a mesma parece ocorrer esporadicamente, levando a uma baixa contribuição para a dispersão do parasito.

O *H. caimani* revelou baixa especificidade que permite explorar uma gama de hospedeiros vertebrados, que podem ser predados pelo *C. yacare* devido à coexistência destes animais nos diversos ambientes aquáticos do Pantanal. De

modo que, vários pontos da cadeia trófica podem contribuir para que o *H. caimani* possa alcançar seu hospedeiro vertebrado, o *C. yacare*. Uma vez no crocodiliano, o parasito pode ser encontrado por períodos relativamente longos na circulação sanguínea, servindo como fonte de infecção perene para os vetores *Cx. (Melanoconion) spp.*, abundantes na região do Pantanal, e aparentemente, com elevada predileção pela hematofagia em crocodilianos.

11. Conclusões

- O parasito *H. caimani* apresenta-se amplamente distribuído e com elevada prevalência na população natural do seu hospedeiro vertebrado, o jacaré *Caiman yacare*, na região do Pantanal. O principal fator relacionado a dinâmica de transmissão do agente parece estar associado às diferenças comportamentais dos jacarés em relação a alimentação, exibidas entre os animais filhotes e juvenis.
- Os vetores naturais do *H. caimani* na região do Pantanal são mosquitos do gênero *Culex*, sobretudo do subgênero *Melanoconion*, e a espécie *Cx. theobaldi* parece ser o principal vetor.
- A infecção sanguínea, isto é, a presença de gametócitos no sangue periférico do *C. yacare* do *H. caimani* pode ser observada por um período relativamente longo, pelo menos seis meses, após a infecção.
- Duas espécies de anuros do gênero *Leptodactylus* e uma de *Scinax* se mostraram susceptíveis à infecção pelo *H. caimani* e a transmissão pela predação de vertebrados, como anuros e peixes, provavelmente consiste em uma via importante para a infecção dos jacarés *C. yacare* no ambiente natural.
- O canibalismo é uma das vias de transmissão entre jacarés *C. yacare*, mas provavelmente apresenta pouca importância na transmissão do parasito.

12. Perspectivas

Os resultados gerados no presente trabalho podem ser considerados como o arcabouço inicial, onde novos estudos poderão ser idealizados para o aprofundamento no conhecimento desta relação parasito-hospedeiro *Hepatozoon-Caiman yacare*. O estudo de parasitos de crocodilianos é bastante interessante do ponto de vista evolutivo, pois estes vertebrados têm mudado relativamente pouco desde sua vida com os dinossauros, a aproximadamente 160 milhões de anos.

Em relação aos vetores do *H. caimani*, poderiam ser explorados quatro pontos da relação parasito-hospedeiro ainda desconhecidos para as espécies de hepatozoídeos.

(1) Apesar dos vetores naturais do *H. caimani*, os mosquitos *Cx. (Melanoconion)* spp., terem sido identificados no Pantanal, praticamente nada se conhece sobre a taxa de infecção experimental dos mesmos, ou seja, a competência vetorial das diferentes espécies. Realizamos um estudo piloto com esse objetivo, mas dificuldades na obtenção e criação de diferentes espécies de *Cx. (Melanoconion)* inviabilizaram momentaneamente os experimentos.

(2) Seria interessante verificar o efeito de diferentes cargas parasitárias sobre a quantidade de oocistos produzidos e sobrevivência do vetor.

(3) Ainda com relação a aspectos do vetor, o único grupo ainda não verificado quanto à participação na transmissão do *H. caimani* no Pantanal são os

tabanídeos. Logo, poderiam ser verificadas quais espécies de tabanídeos realizam repasto sanguíneo sobre o *C. yacare* no Pantanal e examinar a ocorrência de desenvolvimento esporogônico nos exemplares coletados.

A elevada mortalidade, em laboratório, de mosquitos infectados com *H. caimani* logo após a ingestão de sangue com alta concentração de gametócitos, ou não, como relatadas em outros estudos com hepatozoídeos de répteis (Ball et al. 1967, Paperna e Lainson 2003, Paperna e Lainson 2004, Lourenço-de-Oliveira, dados não publicados) merece ser investigada mediante abordagens ultraestruturais e parasito-imunológicos (resposta imune do vetor).

(4) *Culex (Melanoconion) theobaldi* e as demais espécies cogenéricas encontradas naturalmente infectadas ou sugando jacarés no Pantanal também seriam vetores deste parasito em outros biomas e para outras espécies de crocodilianos, como os da Amazônia e Mata Atlântica?

Outros dois aspectos que poderiam ser explorados estão associados à determinação das relações filogenéticas do *H. caimani* e verificar a identidade dos hepatozoídeos de outros hospedeiros crocodilianos, que não os do gênero *Caiman*.

(1) A subordem Adeleina, onde se incluem os hepatozoídeos, é tida como o grupo intermediário entre os hemosporídeos (ex. *Plasmodium*) e os coccídios (ex. *Toxoplasma*). Os hepatozoídeos são heteroxênicos e realizam o seu desenvolvimento merogônico em diversas vísceras, tais como fígado, baço e pulmões. Contudo, a merogonia o *H. caimani* foi encontrada somente na *lamina*

propria do intestino delgado do seu hospedeiro vertebrado, o jacaré *C. crocodilus*, um local geralmente associado desenvolvimento de coccídios monoxênicos e heteroxênicos. Estudos evolutivos sugerem que os crocodilianos mudaram relativamente pouco se comparados a outros grupos de vertebrados. Portanto, assumindo-se que parasitos e hospedeiros podem apresentar histórias evolutivas conjuntas (coevolução), um estudo das relações filogenéticas do *H. caimani* pode auxiliar na compreensão da história evolutiva dos hepatozoídeos e de outros apicomplexa.

(2) Lainson et al. (2003) postulou que todos os crocodilianos da América do Sul sejam infectados pela mesma espécie de hepatozoídeo, o *H. caimani*. Os únicos crocodilianos confirmados para o parasitismo pelo *H. caimani* são *Caiman latirostris*, *C. crocodilus* e *C. yacare*. Já foi registrado o encontro de gametócitos de um hepatozoídeo ainda não identificado na circulação sanguínea do jacaré *Melanosuchus niger* (Lainson et al. 2003). Tratar-se-ia do *H. caimani* ou outra espécie ? Embora a espécie *H. serrei* tenha sido descrita por Thiroux (1910) no jacaré *Paleosuchus trigonatus*, mas é possível que este hepatozoídeo seja, na verdade, o *H. caimani*. Estudos sobre a esporogonia do *H. serrei* precisam ser realizados. O único crocodiliano sul-americano ainda sem registro para o parasitismo por hepatozoídeos é *Paleosuchus palpebrosus*, provavelmente devido a ausência de estudos parasitológicos com esta espécie. Portanto, seria interessante realizar a amostragem nas três espécies de crocodilianos citados e comparar os hepatozoídeos encontrados segundo as características da esporogonia e mediante a utilização de marcadores moleculares, ainda não desenvolvidos, para o *H. caimani*. Além disso, poderiam ser identificados os

culicídeos que naturalmente realizam repasto sobre esses crocodilianos infectados, de modo a comparar as espécies de artrópodes envolvidos e caracteres morfométricos da fase esporogônica para uma melhor caracterização taxonômica dos hepatozoídeos encontrados.

13. Referências bibliográficas

- Adámoli, J. 1986. Fitogeografia do Pantanal. In Anais do Iº Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá. p. 105-106.
- Ahid, S.M.M.; Vasconcelos, P.S.S.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2000. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95: 769-775.
- Amo, L.; Fargallo, J.A.; Martínez-Padilla, J.; Millán, J.; López, P.; Martín, J. 2005a. Prevalence and intensity of blood and intestinal parasites in a field population of a Mediterranean lizard, *Lacerta lepida*. Parasitology Research 96: 413-417.
- Amo, L.; López, P.; Martín, J. 2005b. Prevalence and intensity of haemogregarine blood parasites and their mite vectors in the common wall lizard, *Podarcis muralis*. Parasitology Research 96: 378-381.
- Anderson, R.M. e Gordon, D.M. 1982. Processes influencing the distribution of parasite numbers within host populations with special emphasis on parasite-induced host mortalities. Parasitology 85: 373-398.
- Ball, G.H.; Chao, J.; Telford, S.R., Jr. 1967. The life history of *Hepatozoon rarefasciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae), and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). Journal of Parasitology 53: 897-909.
- Barros, T. 1999. Seasonality of *Pheaeotabanus fervens* (Diptera: Tabanidae) in the Pantanal region, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 91: 159.
- Booden, T.; Chao, J.; Ball, G.H. 1970. Transfer of *Hepatozoon* sp., from *Boa constrictor* to a lizard *Anolis carolinensis*, by mosquito vectors. Journal of Parasitology 56: 832-833.
- Boulianne, B.; Evans, R.C.; Smith, T.G. 2007. Phylogenetic analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. Journal of Parasitology 93: 1435-1441.

- Brito, A.C.; Fontes, G.; Rocha, E.M.M.; Rocha, D.A.M.; Regis, L. 1999. Development of *Dirofilaria immitis* (Leydi) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceió, Alagoas, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 575-576.
- Brown, M.J.F.; Loosli, R.; Schmid-Hempel, P. 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. Oikos 91: 421-427.
- Campbell, T. W. 1996. Clinical Pathology. In Reptile medicine and surgery, D.R. Mader (ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, p. 248-257.
- Choisy, M.; Brown, S.P.; Lafferty, K.D.; Thomas, F. 2003. Evolution of trophic transmission in parasites: why add intermediate hosts? American Naturalist 162:172-181.
- Coutinho, M. e Campos, Z. 1996. Effect of habitat and seasonality on the densities of caiman in southern Pantanal, Brazil. Journal of Tropical Ecology 12: 741-747.
- Coutinho, M. E. 2003. Population ecology and the conservation and management of *Caiman yacare* in the Pantanal, Brazil. PhD Dissertation. University of Queensland, City, Austrália, 272 p.
- Desser, S.S. 1993. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In. Parasitic Protozoa, vol. 4. Ed. Levine, N. Academic Press, New York. pp. 247-272.
- Esch, G. W. e Fernández, J.C. 1993. A functional biology of parasitism: Ecological and evolutionary implications. Chapman & Hall, London, U.K., p. 337.
- Ferreira, R.L.M.; Henriques, A.L.; Rafael, J.A. 2002. Activity of Tabanids (Insecta: Diptera: Tabanidae) Attacking the Reptiles *Caiman crocodilus* (Linn.) (Alligatoridae) and *Eunectes murinus* (Linn.) (Boidae), in the Central Amazon, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97: 133-136.
- Forattini O.P. 2002. Culicidologia Médica. Vl. 2. EDUSP. São Paulo. 860 p.
- Forattini, O.P. e Sallum, M.A.M. 1989. Taxonomic study redescription of *Culex (Melanoconion) theobaldi* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84: 201-208.

- Gordo, M. e Campos, Z. 2003. Listagem dos Anuros da Estação Ecológica Nhumirim e Arredores, Pantanal Sul. Documentos EMBRAPA-Pantanal. 21 p.
- Hoare, C.A. 1932. On protozoal blood parasites collected in Uganda: with an account of the life cycle of the crocodile heamogregarine. *Parasitology* 24: 210-224.
- Jakes, K.; O'Donoghue, P.J.; Cameron, S.L. 2003. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon (Haemogregarina) boigae*, *Hepatozoon* sp., *Haemogregarina clelandi* and *Haemoproteus chelodina* from Australian reptiles to other Apicomplexa based on cladistic analyses of ultrastructural and life-cycle characters. *Parasitology* 126: 555-559.
- Johnson, E.M.; Allen, K.E.; Breshears, M.A.; Pancieira, R.J.; Little, S.E.; Ewing, S.A. 2008. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. *Veterinary Parasitology* 151: 164-169.
- Johnson, E.M.; Allen, K.E.; Pancieira, R.J.; Ewing, S.A.; Little, S.E. 2009. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and infectivity of cystozoites for a dog. *Veterinary Parasitology* 164: 162-166.
- Khan, R.A.; Forrester, D.J.; Goodwin, T.M.; Ross, C.A. 1980. A haemogregarine from the american alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Parasitology* 66: 324-328.
- Koella, J.C. 1999. An evolutionary view of the interactions between anopheline mosquitoes and malaria parasites. *Microbes and Infection* 1: 303-308.
- Lafferty, K.D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitology Today* 15: 111-115.
- Lainson, R. 1995. *Progarnia archosauriae* nov. gen., nov. sp. (Haemosporina: Garnidae), a blood parasite of *Caiman crocodilus crocodilus* (Archosauria: Crocodylia), and comments on the evolution of reptilian and avian haemosporines. *Parasitology* 110: 513-519.
- Lainson, R.; Paperna, I.; Naiff, R.D. 2003. Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the caiman *Caiman c.*

- crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98: 103-113.
- Landau, I.; Michel, J.C.; Chabaud, A.G. 1972. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caracteres fondamentaux d'un cycle de Coccidie. Zeitschrift für Parasitenkunde 38: 250-270.
- Lang, J.W. 1987. Crocodilian behaviour: implications for management. In Wildlife management of crocodiles and alligators. Webb GJW, Manolis SC, Whitehead PJ (eds.). Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton. p. 273-294.
- Lowichik, A. e Yaeger, R.G. 1987. Ecological aspects of snake hemogregarine infections from two habitats in southeastern Louisiana. Journal of Parasitology 73: 1109-1115.
- Magnusson, W.E.; Silva, E.V.; Lima, A.P. 1987. Diets of amazonian crocodilians. Journal of Herpetology 21: 85-95.
- Mathew, J.S.; Van der Bussche, R.A.; Ewing, S.A.; Malayer, J.R.; Latha, B.R.; Panciera, R.J. 2000. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life cycle characters. Journal of Parasitology 86: 366-372.
- Mihalca, A.D.; Racka, K.; Gherman, C.; Ionescu, D.T. 2008. Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from România. Parasitology Research 102: 1081-1083.
- Murata, T.; Inoue, M.; Tateyama, S.; Taura, Y.; Nakama, S. 1993. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. The Journal of Veterinary Medical Science 55: 867-868.
- Naldo, J.L.; Libanan, N.L.; Samour, J.H. 2009. Health assessment of a spiny-tailed lizard (*Uromastyx* spp.) population in Abu Dhabi, United Arab Emirates. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 40: 445-452.
- O'Dwyer, L.H.; Moço, T.C.; Barrella, T.H.; Vilela, F.C.; Silva, R.J. 2003. Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) among recently captured Brazilian snakes. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 55: 309-314.

- Opplinger, A. e Clobert, J. 1997. Reduced tail regeneration in the common Lizard, *Lacerta vivipara*, parasitized by blood parasites. *Functional Ecology* 11:652–655,
- Opplinger, A., J. Clobert, J. Lecomte, P. Lorenzon, K. Boudjemadi, and H. B. John-Alder. 1998. Environmental stress increase the prevalence and intensity of blood parasite infection in the common lizard *Lacerta vivipara*. *Ecology Letters* 1: 129-138.
- Opplinger, A.; Célérier, M.L.; Clobert, J. 1996. Physiological and behavior changes in common lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitology* 113: 433–438
- Paperna, I. e Lainson, R. 2003. Ultrastructural studies on the sporogony of *Hepatozoon* spp. in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 fed on infected *Caiman crocodilus* and *Boa constrictor* from northern Brazil. *Parasitology* 127: 147-154.
- Paperna, I. e Lainson, R. 2004. *Hepatozoon terzii* (Sambon e Seligman, 1907) infection in the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. *Parasite* 11: 175-181.
- Pecor, J. E., V. L. Mallampalli, R. E. Harbach, and E. L. Peyton. 1992. Catalog and illustrated review of the subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Contrib. Am. Entomol. Inst.* 27: 1-228.
- Perkins, S.L. e Keller, A.K. 2001. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotides. *Journal of Parasitology* 87: 870-876.
- Pessôa, S.B.; de Biasi, P.; de Souza, D. 1972. Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini 1909), parasita do jacaré-de-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex dolosus* (L. Arribálzaga). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 70: 379-383.

- Poulin R. 1993. The disparity between observed and uniform distributions: A new look at parasite aggregation. *International Journal of Parasitology* 23: 937-944.
- Poulin, R. 2007. Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology* 134: 763-776.
- Reardon, J.T. e Norbury, G. 2004. Ectoparasite and hemoparasite infection in a diverse temperate lizard assemblage at Macraes Flat, South Island, New Zealand. *Journal of Parasitology* 90: 1274-1278.
- Rootes, W.L. e Chabreck, R.H. 1993. Cannibalism in the american alligator. *Herpetologica* 49: 99-107.
- Rozeboom, L. E. e Komp, W.H.W. 1950. A review of the species of *Culex* of the subgenus *Melanoconion* (Diptera, Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America* 43: 75-114.
- Salkeld, D. J., e L. Schwarzkopf. 2005. Epizootiology of blood parasites in an Australian lizard: a mark-recapture study of a natural population. *International Journal for Parasitology* 35: 11-18.
- Sallum, M.A.M. e Forattini, O.P. 1996. Revision of the Spissips section of *Culex* (*Melanoconion*) (Diptera: Culicidae). *Journal of the american mosquito control association* 12: 517-600.
- Sandland, G. J. e Minchella, D.J. 2003. Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends in Parasitology* 19: 571-574.
- Santos, S.A.; Stoll, M.N.; Pinheiro, M.S.; Campos, Z.; Magnusson, W.E.; Mourão, G. 1996. Diets of *Caiman crocodilus yacare* from different habitats in Brazilian Pantanal. *Herpetological Journal* 6: 111-117.
- Schall, J.J. 1986. Prevalence and virulence of a haemogregarinidae parasite of the aruban whiptail lizard, *Cnemidophorus arubensis*. *Journal of Herpetology* 20: 318-324.
- Schall, J.J. 2000. Transmission success of the malaria parasite *Plasmodium mexicanum* into its vector: role of gametocyte density and sex ratio. *Parasitology* 121:575-80.

- Serrão, M.L.; Labarthe, N.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2001. Vectorial competence of *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) Rio de Janeiro strain, to *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 96: 593-598.
- Shaw, D.J.; Grenfell, B.T.; Dobson, A.P. 1998. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. Parasitology 117: 597-610.
- Silveira, R. da e Magnusson W.E. 1999. Diets of spectacled and black caiman in the Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. Journal of Herpetology 33: 181-192.
- Sirivanakarn, S. 1982. A Review of the systematics and a proposed scheme of internal classification of the new world subgenus *Melanoconion*, of *Culex* (Diptera, Culicidae). Mosquito Systematics 14: 265-333.
- Široký, 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? Journal of Parasitology 90: 1391-1393.
- Široký, P.; Kamler, M.; Modrý, D. 2005. Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the genus *Testudo* in the east mediterranean regions. Folia Parasitologica 52: 359-361.
- Sloboda, M.; Kamler, M.; Bulantová, J.; Votýpka, J.; Modrý, D. 2008. Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*? Folia Parasitologica 55: 13–16.
- Smith, T.G. 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). Journal of Parasitology 82: 565-585.
- Smith, T.G. e Desser, S.S. 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina). Systematic Parasitology 36: 213-221.
- Smith, T.G.; Desser, S.S.; Martin, D.S. 1994. The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp. (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*). Parasitology Research 80: 559-568.

Smith, T.G.; Kim, B.; Desser, S.S. 1999. Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontário, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. International Journal for Parasitology 29: 293-304.

Thoisy, B. de; Michel, J.C.; Vogel, I.; Vié, J.C. 2000. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. Journal of Parasitology 86: 1035-1040.

Uetanabaro, M. 1989. Hábito alimentar de *C. c. yacare* (Crocodilia, Alligatoridae) no Pantanal Sul Mato-grossense. Dissertação de Mestrado. UNESP, Rio Claro. 79 p.

Ujvari, B.; Madsen, T.; Olsson, M. 2004. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. Journal of Parasitology 90: 670-672.

Viana, L.A. e Marques, E.J. 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, L.A.; Paiva, F.; Coutinho, M.E.; 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, L.A.; Soares, P.; Paiva, F.; Lourenço-de-Oliveira, R. 2010b. Caiman biting mosquitoes and the natural vector of *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae). Journal of Medical Entomology (In press).

Zuk, M. e McKean, K.A. 1996. Sex differences in parasitic infections: Patterns and processes. International Journal for Parasitology 26: 1009-1024.

ANEXOS



Figura 1. Metodologia de captura, registro de dados biométricos e marcação dos jacarés *Caiman yacare* durante os trabalhos de campo no Pantanal.



Figura 2. Captura de culicídeos utilizando-se um jacaré *Caiman yacare* como isca. **A-B.** Coletas realizadas com capturador de Castro. **C.** Mosquitos realizando repasto sanguíneo na ponta do focinho do jacaré. **D.** Diveros mosquitos em repasto junto ao olho do jacaré.

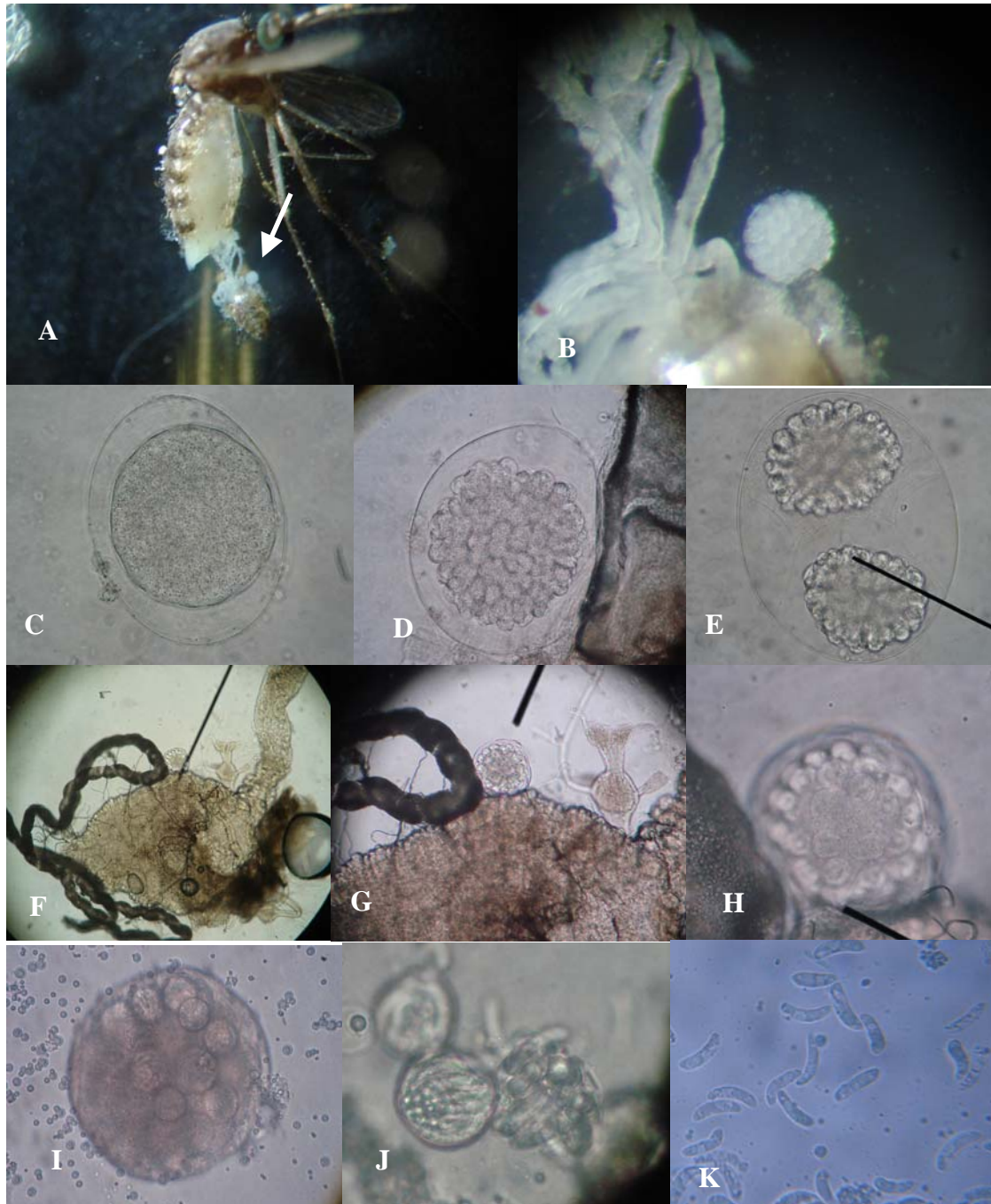


Figura 3. Formas parasitárias do *Hepatozoon caimani* durante esporogonia no mosquito *Cx. (Mel.) theobaldi*. **A-B.** Oocistos esporulados em mosquito dissecado (seta). **C-E.** Oocistos jovens com esporoblasto, notar esporoblasto duplo em **E**. **F-H.** Oocistos sobre o estômago do mosquito, já em fase adiantada na formação de esporocistos. **I.** Oocisto esporulado, com esporocistos e esporozoítos formados. **J.** Esporocisto com esporozoítos. **K.** Esporozoítos. As figuras não se encontram em escala.

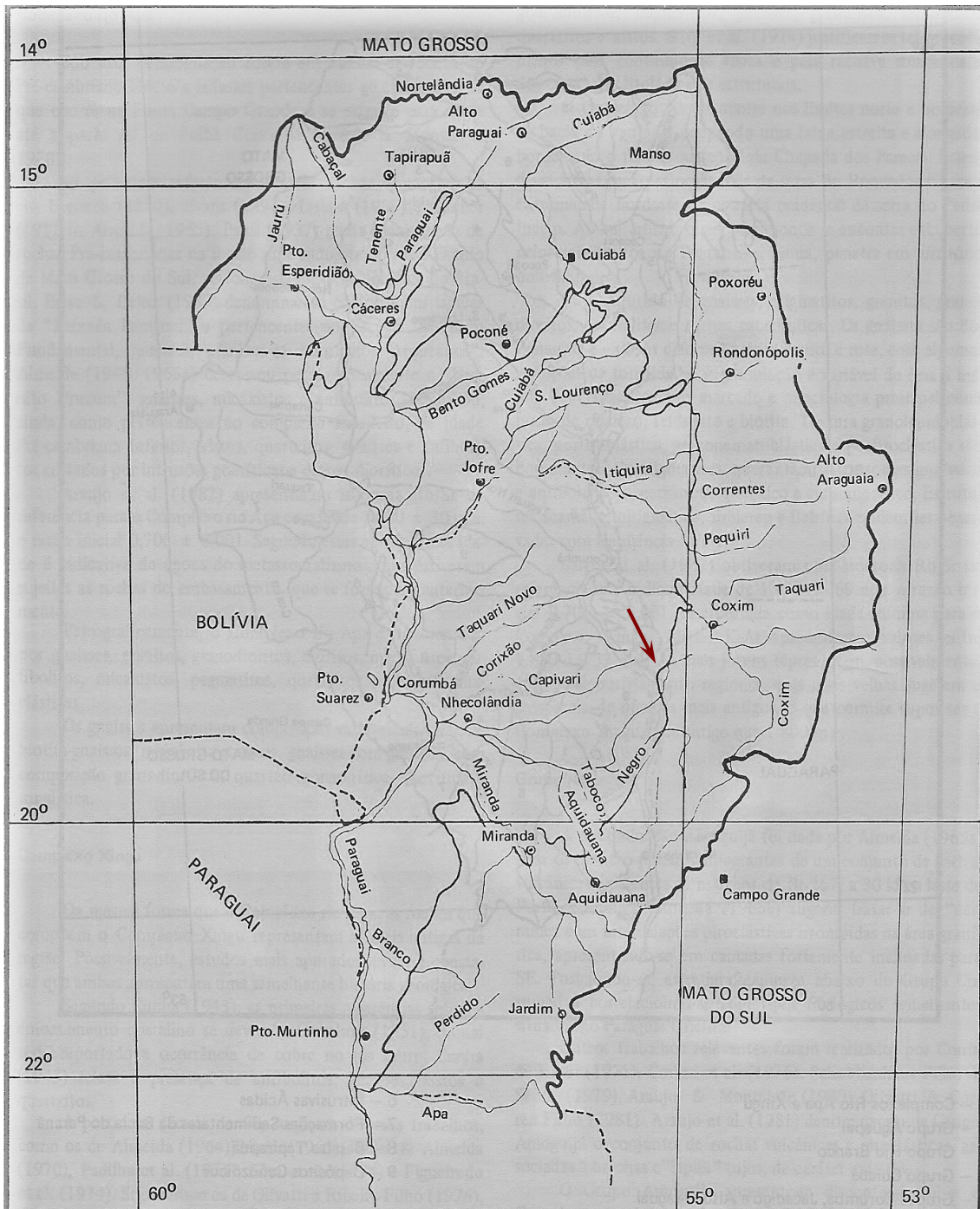


Figura 5. Mapa do limite fisiográfico do Pantanal e sua área de influência. A região onde se realizou o estudo pertence à bacia do Rio Negro (seta), subregião de Aquidauana. Fonte: Anais do Iº Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá. 265p.

Tabela 1. Dados biométricos, marcação, exame dos jacarés *Caiman yacare* e parasitemia do *Hepatozoon caimani*.

MÊS	MARCAÇÃO	SEXO	CLASSE	CRC (cm)	PESO (Kg)	EXAME	PARASITEMIA
jul/06	47	Fêmea	adulto jovem	61,0	4,9	positivo	9
jul/06	48	Fêmea	adulto jovem	56,8	3,9	positivo	10
jul/06	49	Fêmea	adulto	81,5	14,0	positivo	5
jul/06	61	Macho	adulto	101,5	26,0	positivo	33
jul/06	64	Macho	adulto	87,0	15,0	positivo	30
jul/06	65	Macho	adulto	105,4	23,0	positivo	20
jul/06	66	Macho	adulto	90,5	15,0	positivo	8
jul/06	67	Macho	adulto	86,2	15,0	positivo	21
jul/06	68	Macho	adulto	94,7	17,0	positivo	4
jul/06	69	Macho	adulto	97,0	18,0	positivo	18
jul/06	70	Macho	adulto jovem	56,0	3,8	positivo	22
jul/06	73	Macho	adulto jovem	51,0	3,2	positivo	19
jul/06	74	Macho	adulto jovem	74,0	8,5	positivo	10
jul/06	75	Macho	adulto jovem	75,0	7,5	positivo	16
jul/06	77	Macho	adulto jovem	61,4	5,5	positivo	32
jul/06	filhote 1	Indeterminado	filhote	18,0	0,1	negativo	0
jul/06	filhote 2	Indeterminado	filhote	17,5	0,1	negativo	0
jul/06	filhote 3	Indeterminado	filhote	18,1	0,2	negativo	0
jul/06	filhote 4	Indeterminado	filhote	18,4	0,2	negativo	0
jul/06	filhote 5	Indeterminado	filhote	17,7	0,1	negativo	0
jul/06	juvenil 1	Indeterminado	juvenil	27,4	0,4	negativo	0
jul/06	juvenil 2	Indeterminado	juvenil	27,5	0,5	negativo	0
jul/06	juvenil 3	Indeterminado	juvenil	26,7	0,4	negativo	0
jul/06	juvenil 4	Indeterminado	juvenil	37,0	Dados ausentes	positivo	2
jul/06	juvenil 5	Indeterminado	juvenil	38,0	1,5	positivo	1
jul/06	juvenil 6	Indeterminado	juvenil	39,7	2,0	positivo	6
set/06	53	Fêmea	juvenil	50,0	3,0	positivo	18
set/06	54	Fêmea	adulto jovem	75,0	10,0	positivo	6
set/06	79	Macho	juvenil	48,0	3,0	positivo	4
set/06	80	Macho	adulto	83,0	12,0	positivo	10
set/06	81	Macho	adulto	102,0	13,5	positivo	10
set/06	82	Macho	adulto jovem	65,5	6,5	positivo	59
set/06	83	Macho	adulto	99,0	19,0	positivo	13
set/06	84	Macho	adulto	98,0	16,0	positivo	7
set/06	s/ marc	Indeterminado	juvenil	35,0	1,5	positivo	2
set/06	s/ marc	Indeterminado	juvenil	41,3	2,0	positivo	33
set/06	s/ marc	Indeterminado	juvenil	50,0	2,7	positivo	9
nov/06	56	Fêmea	adulto jovem	75,0	11,0	positivo	7
nov/06	58	Fêmea	adulto jovem	66,0	6,3	positivo	10
nov/06	59	Fêmea	adulto jovem	73,0	9,0	positivo	4
nov/06	60	Fêmea	adulto jovem	77,0	8,0	positivo	7
nov/06	61	Fêmea	adulto jovem	52,0	4,0	positivo	16
nov/06	62	Fêmea	adulto jovem	64,0	8,0	positivo	3
nov/06	63	Fêmea	adulto jovem	77,0	10,0	positivo	5
nov/06	64	Fêmea	adulto jovem	77,5	9,0	positivo	34
nov/06	65	Fêmea	adulto jovem	79,4	15,0	positivo	44
nov/06	66	Fêmea	juvenil	Dados	Dados	positivo	29

				ausentes	ausentes		
nov/06	68	Fêmea	adulto jovem	58,5	6,0	positivo	7
nov/06	69	Fêmea	juvenil	Dados ausentes	Dados ausentes	positivo	4
nov/06	85	Macho	adulto	Dados ausentes	Dados ausentes	positivo	26
nov/06	86	Fêmea	adulto	86,6	6,5	Dados ausentes	Dados ausentes
nov/06	86	Macho	adulto jovem	80,0	11,0	positivo	7
nov/06	87	Macho	adulto jovem	79,5	12,0	positivo	2
nov/06	88	Macho	adulto	94,0	21,0	positivo	5
nov/06	89	Macho	adulto	94,0	29,0	positivo	32
nov/06	90	Macho	adulto	94,8	17,0	positivo	27
nov/06	91	Macho	adulto jovem	78,3	14,0	positivo	13
nov/06	92	Macho	adulto jovem	72,0	10,0	positivo	21
nov/06	93	Macho	adulto	97,0	16,0	positivo	15
nov/06	94	Macho	adulto	97,0	21,0	positivo	37
nov/06	95	Macho	adulto	94,4	16,0	positivo	8
nov/06	96	Macho	adulto	83,4	16,0	positivo	3
nov/06	97	Macho	adulto jovem	74,3	24,0	positivo	17
nov/06	98	Macho	adulto jovem	51,0	3,0	positivo	4
nov/06	100	Macho	adulto jovem	75,5	9,0	negativo	0
nov/06	101	Macho	adulto	96,0	25,0	positivo	18
nov/06	102	Macho	adulto	86,0	21,0	positivo	2
nov/06	103	Macho	adulto	91,5	21,0	positivo	16
nov/06	104	Macho	juvenil	44,0	3,5	positivo	11
jan/07	70	Fêmea	adulto jovem	77,2	11,0	positivo	23
jan/07	71	Fêmea	adulto jovem	70,2	9,5	positivo	16
jan/07	72	Fêmea	juvenil	46,6	3,0	positivo	13
jan/07	74	Fêmea	adulto jovem	76,0	11,5	positivo	7
jan/07	75	Fêmea	adulto jovem	79,0	13,5	positivo	3
jan/07	105	Macho	adulto	91,1	13,5	positivo	6
jan/07	106	Macho	adulto	83,8	18,0	positivo	5
jan/07	107	Macho	adulto jovem	75,6	9,5	positivo	18
jan/07	108	Macho	adulto	85,4	15,5	positivo	7
jan/07	109	Macho	adulto	86,4	19,0	positivo	8
jan/07	110	Macho	adulto jovem	66,8	6,9	positivo	11
jan/07	111	Macho	adulto	91,0	Dados ausentes	positivo	15
jan/07	112	Macho	adulto	90,0	16,0	positivo	16
jan/07	113	Macho	juvenil	47,7	5,0	positivo	11
jan/07	114	macho	adulto	91,6	20,5	positivo	7
jan/07	filhote 1	Indeterminado	filhote	7,5	0,7	negativo	0
jan/07	juvenil 1	Indeterminado	juvenil	26,2	0,6	negativo	0
jan/07	juvenil 2	Indeterminado	juvenil	41,1	2,2	negativo	0
jan/07	juvenil 3	Indeterminado	juvenil	29,8	0,9	negativo	0
jan/07	juvenil 4	Indeterminado	juvenil	35,8	1,3	positivo	1
mar/07	32	fêmea	adulto jovem	74,1	9,5	positivo	13
mar/07	57	macho	adulto	93,5	23,0	positivo	13
mar/07	62	macho	adulto	98,3	23,0	positivo	13
mar/07	83	fêmea	juvenil	48,5	2,9	positivo	2
mar/07	84	fêmea	adulto jovem	74,8	10,0	positivo	42
mar/07	85	fêmea	adulto	85,2	14,0	positivo	8
mar/07	86	fêmea	adulto jovem	72,8	11,0	positivo	34

mar/07	87	fêmea	adulto jovem	71,7	14,2	positivo	2
mar/07	88	fêmea	adulto jovem	72,3	11,5	positivo	4
mar/07	89	fêmea	adulto jovem	63,3	6,5	positivo	8
mar/07	90	fêmea	adulto jovem	77,3	14,5	positivo	14
mar/07	91	fêmea	adulto jovem	76,4	12,5	positivo	2
mar/07	99	macho	adulto	92,3	18,5	positivo	12
mar/07	115	macho	adulto	94,0	17,5	positivo	17
mar/07	116	macho	adulto	98,7	20,5	positivo	10
mar/07	117	macho	adulto	90,5	16,0	positivo	3
mar/07	118	macho	adulto	91,5	20,0	Dados ausentes	Dados ausentes
mar/07	filhote 1	indeterminado	filhote	20,0	0,3	negativo	0
mar/07	filhote 2	indeterminado	filhote	22,5	0,9	negativo	0
mar/07	filhote 3	indeterminado	filhote	22,5	0,9	negativo	0
mar/07	filhote 4	indeterminado	filhote	23,0	0,6	negativo	0
mar/07	filhote 5	indeterminado	filhote	25,0	0,9	negativo	0
mar/07	filhote 6	indeterminado	filhote	22,7	0,7	negativo	0
mar/07	juvenil 1	indeterminado	juvenil	26,0	0,9	negativo	0
mar/07	juvenil 2	indeterminado	juvenil	26,0	1,0	negativo	0
mar/07	juvenil 3	fêmea	juvenil	44,0	2,3	positivo	5
mar/07	juvenil 4	indeterminado	juvenil	33,4	1,1	Dados ausentes	Dados ausentes
mar/07	juvenil 5	indeterminado	juvenil	38,4	1,9	positivo	1
jul/07	96	Fêmea	adulto	87,0	15,0	positivo	16
jul/07	97	Macho	adulto	87,0	24,0	positivo	22
jul/07	97	Fêmea	adulto jovem	65,0	11,0	positivo	14
jul/07	98	Fêmea	adulto jovem	75,8	12,0	positivo	20
jul/07	99	Fêmea	adulto jovem	55,0	4,5	positivo	10
jul/07	100	Fêmea	adulto jovem	62,5	6,8	positivo	10
jul/07	101	Fêmea	Juvenil	50,3	4,0	positivo	14
jul/07	102	Fêmea	Juvenil	46,2	3,0	positivo	10
jul/07	126	Macho	adulto	81,5	25,0	positivo	5
jul/07	127	Macho	adulto	106,0	21,5	positivo	10
jul/07	128	Macho	adulto	87,0	20,0	positivo	6
jul/07	129	Macho	adulto	85,0	23,5	positivo	31
jul/07	130	Macho	adulto jovem	58,0	6,0	positivo	3
jul/07	131	Macho	adulto jovem	65,0	9,0	positivo	5
jul/07	132	Macho	Juvenil	48,0	5,0	positivo	12
jul/07	133	Macho	adulto jovem	65,5	9,0	positivo	3
jul/07	134	Macho	adulto	94,0	20,0	positivo	22
jul/07	135	Macho	adulto	98,0	21,0	positivo	10
jul/07	136	Macho	adulto jovem	71,0	9,2	positivo	9
jul/07	137	Macho	adulto jovem	72,0	10,5	positivo	14
jul/07	138	Macho	adulto jovem	73,0	13,0	positivo	6
jul/07	139	Macho	adulto jovem	71,0	11,0	positivo	11
jul/07	141	Macho	adulto	98,0	24,5	positivo	11
jul/07	Alf	Macho	adulto jovem	56,5	6,0	negativo	0
jul/07	F1	indeterminado	filhote	14,0	0,9	negativo	0
jul/07	F10	indeterminado	filhote	17,4	1,1	negativo	0
jul/07	F11	indeterminado	filhote	17,4	1,2	negativo	0
jul/07	F2	indeterminado	filhote	14,0	1,1	negativo	0
jul/07	F3	indeterminado	filhote	13,0	0,8	negativo	0
jul/07	F4	indeterminado	filhote	14,5	0,5	negativo	0

jul/07	F5	indeterminado	filhote	16,5	0,8	negativo	0
jul/07	F6	indeterminado	filhote	15,0	0,7	negativo	0
jul/07	F7	indeterminado	filhote	16,0	0,6	negativo	0
jul/07	F8	indeterminado	filhote	14,2	0,7	negativo	0
jul/07	F9	indeterminado	filhote	15,4	0,8	negativo	0
jul/07	Nic	Fêmea	adulto jovem	56,0	6,5	positivo	9
jul/07	s/ marc	Macho	adulto	88,0	17,0	positivo	21
jul/07	Valentina	Fêmea	Juvenil	47,5	3,5	positivo	3
set/07	17	Macho	adulto	98,2	18,1	positivo	11
set/07	28	Fêmea	adulto jovem	79,0	13,5	positivo	41
set/07	103	fêmea	adulto jovem	68,0	65,0	positivo	8
set/07	104	Fêmea	adulto jovem	51,9	4,5	positivo	3
set/07	105	fêmea	adulto	86,5	13,5	positivo	5
set/07	106	fêmea	adulto jovem	60,0	5,0	positivo	10
set/07	107	Fêmea	juvenil	50,0	3,2	positivo	25
set/07	108	Fêmea	juvenil	46,0	3,0	positivo	1
set/07	109	fêmea	adulto jovem	75,8	11,5	positivo	16
set/07	110	fêmea	adulto jovem	65,4	8,1	positivo	17
set/07	111	Fêmea	adulto jovem	76,6	11,2	positivo	4
set/07	142	macho	adulto jovem	61,0	6,0	positivo	2
set/07	143	Macho	juvenil	47,8	3,0	positivo	27
set/07	144	Macho	adulto jovem	76,0	11,0	positivo	2
set/07	145	Macho	adulto jovem	62,0	5,0	positivo	11
set/07	146	Macho	adulto jovem	78,3	14,5	positivo	1
set/07	147	Macho	juvenil	50,0	3,5	positivo	28
set/07	148	Macho	adulto jovem	74,6	11,5	positivo	2
set/07	149	Macho	juvenil	47,3	3,2	positivo	4
set/07	150	Macho	adulto jovem	71,4	9,0	positivo	2
set/07	151	Macho	adulto	85,0	21,0	positivo	12
set/07	152	Macho	adulto jovem	76,0	11,5	positivo	30
set/07	153	Macho	adulto	87,8	14,5	positivo	4
set/07	154	Macho	adulto	94,5	17,0	positivo	6
set/07	F1	Indeterminado	filhote	20,2	0,2	negativo	0
set/07	F2	Indeterminado	filhote	19,6	0,2	negativo	0
set/07	juv 1	Indeterminado	juvenil	40,4	2,1	negativo	0
set/07	juv 2	Indeterminado	juvenil	48,5	3,1	negativo	0
set/07	R	Indeterminado	juvenil	36,4	1,6	negativo	0
set/07	R2	Indeterminado	juvenil	31,0	0,1	negativo	0
set/07	R3	Indeterminado	juvenil	38,0	2,0	positivo	61
fev/08	114	Fêmea	adulto jovem	75,0	13,5	positivo	16
fev/08	115	Fêmea	adulto jovem	75,4	10,5	positivo	5
fev/08	116	Fêmea	adulto jovem	72,0	10,1	positivo	13
fev/08	117	Fêmea	adulto jovem	77,7	12,7	positivo	3
fev/08	118	Fêmea	adulto jovem	66,0	9,1	positivo	11
fev/08	158	Macho	adulto	103,0	20,5	positivo	11
fev/08	159	Macho	adulto jovem	72,0	12,2	positivo	1
fev/08	160	Macho	adulto	88,0	22,5	positivo	4
fev/08	161	Macho	adulto	90,1	17,5	positivo	20
fev/08	162	Macho	adulto	89,0	20,0	positivo	5
fev/08	163	Macho	adulto	86,5	17,0	positivo	22
fev/08	164	Macho	adulto	96,0	19,5	positivo	11
fev/08	F1	Indeterminado	filhote	17,8	0,2	negativo	0
fev/08	F2	Indeterminado	filhote	21,3	0,2	negativo	0

fev/08	J1	Indeterminado	juvenil	36,5	1,4	positivo	63
fev/08	J2	Indeterminado	juvenil	36	1,5	positivo	6
fev/08	J3	Indeterminado	juvenil	30,3	1,0	negativo	0
fev/08	J4	Indeterminado	juvenil	32,3	1,1	positivo	1
fev/08	J5	Indeterminado	juvenil	38,5	1,5	negativo	0
fev/08	J6	Indeterminado	juvenil	40,7	1,7	negativo	0
fev/08	J7	Indeterminado	juvenil	39,6	1,7	positivo	1
mai-jun/07	92	Fêmea	adulto jovem	64,2	7,0	positivo	27
mai-jun/07	93	Fêmea	adulto jovem	68,5	10,3	positivo	1
mai-jun/07	94	Fêmea	adulto	83,7	14,0	positivo	5
mai-jun/07	95	Fêmea	adulto jovem	62,5	6,3	positivo	20
mai-jun/07	119	Macho	adulto jovem	61,4	5,5	positivo	20
mai-jun/07	120	Macho	adulto	97,7	19,5	positivo	6
mai-jun/07	121	Macho	adulto	81,4	14,0	positivo	96
mai-jun/07	122	Macho	adulto jovem	73,0	11,5	positivo	26
mai-jun/07	123	Macho	adulto	98,5	19,5	positivo	18
mai-jun/07	124	Macho	adulto	88,4	17,3	positivo	12
mai-jun/07	125	Macho	adulto	86,0	17,0	positivo	16
mai-jun/07	F1	Indeterminado	filhote	23,8	0,4	negativo	0
mai-jun/07	F2	Indeterminado	filhote	14,4	0,7	negativo	0
mai-jun/07	F3	Indeterminado	filhote	13,4	0,6	negativo	0
mai-jun/07	F4	Indeterminado	filhote	12,2	0,6	negativo	0
mai-jun/07	F5	Indeterminado	filhote	14,7	0,7	negativo	0
mai-jun/07	F6	Indeterminado	filhote	14,3	0,7	negativo	0
mai-jun/07	J1	Indeterminado	juvenil	37,5	1,5	positivo	6
mai-jun/07	J2	Indeterminado	juvenil	43,7	2,7	positivo	1
mai-jun/07	J3	Indeterminado	juvenil	25,8	0,5	negativo	0
mai-jun/07	J4	Indeterminado	juvenil	34,3	1,5	negativo	0
mai-jun/07	J5	Indeterminado	juvenil	30,1	1,1	negativo	0
mai-jun/07	J6	Indeterminado	juvenil	39,3	2,1	negativo	0
mai-jun/07	J7	Indeterminado	juvenil	32,5	0,9	positivo	21
mai-jun/07	J8	Indeterminado	juvenil	35,7	1,9	negativo	0



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19348-1	Data da Emissão: 14/04/2009 16:43	Data de Validade: 14/04/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2145110	Nome: LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS	CPF: 528.742.651-87
Título do Projeto: HEPATOZOON CAIMANI (APICOMPLEXA: HEPATOZOIDAE) NO JACARÉ CAIMAN CROCODILUS YACARE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE: ESTUDOS SOBRE AS VIAS DE TRANSMISSÃO		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jhonatan Eber Silva	Estagiário	362.715.858-09	461550581 ssp-SP	Brasileira
2	Gudryan Jackson Barônio	Estagiário	062.477.199-73	98581090 ssp-PR	Brasileira
3	MARCOS EDUARDO COUTINHO	Pesquisador	541.126.486-34	M759844 SSP-MG	
4	Luiz Eduardo Roland Tavares	Pesquisador	874.300.296-04	M6208080 SSP-MG-MG	Brasileira
5	Priscilla Soares dos Santos	Estagiária	026.647.671-60	001603772 ssp-MS	Brasileira
6	Fernando Paiva	Pesquisador	106.291.221-72	0276 crmv-MS	Brasileira
7	Olivia Tavares Dias	Estagiária	331.331.218-71	35.038.471-x ssp-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORUMBA	MS	PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL	Fora de UC
2	SEROPEDICA	RJ	CETAS/RJ	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Glossiphoniidae, Ranidae, Leptodactylidae, Hylidae, Hoplias malabaricus, Caiman crocodilus yacare, Culicidae, Astianax
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Caiman crocodilus yacare
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Caiman crocodilus yacare (*Qtde: 20), Ranidae (*Qtde: 20), Leptodactylidae (*Qtde: 20), Hylidae (*Qtde: 20), Culicidae (*Qtde: 1000), Glossiphoniidae (*Qtde: 50), Astianax (*Qtde: 30), Hoplias malabaricus (*Qtde: 30)

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 37247575





Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 19348-1	Data da Emissão: 14/04/2009 16:43	Data de Validade: 14/04/2010
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2145110	Nome: LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS	CPF: 528.742.651-87
Título do Projeto: HEPATOZOON CAIMANI (APICOMPLEXA: HEPATIZOZOIDAE) NO JACARÉ CAIMAN CROCODILUS YACARE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE: ESTUDOS SOBRE AS VIAS DE TRANSMISSÃO		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Astianax, Caiman crocodilus yacare, Ranidae, Leptodactylidae, Hoplias malabaricus, Hylidae
---	---	--

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Armadilha de queda "pit fall"
3	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa
4	Método de captura/coleta (Peixes)	Tarrafa, Anzol e linha (op.manual):linha de mão,de corso,carretilha,molinete,corrico,vara e isca viva
5	Método de captura/coleta (Répteis)	Captura manual, Laço com cabo de aço

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFMS	As carcaça dos animais serão oferecidas para o Lab. de Zoologia/UFMS para fins didáticos

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 37247575



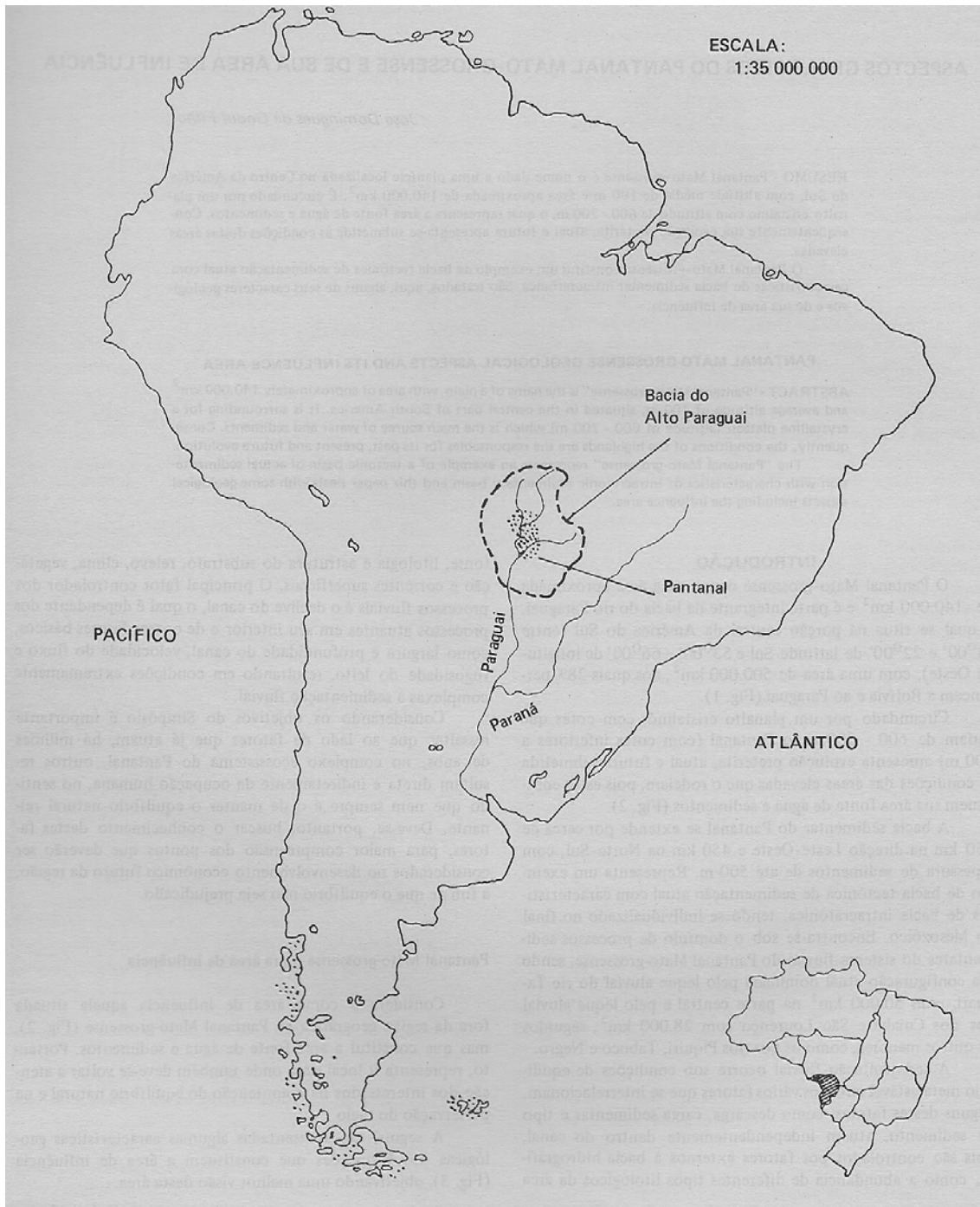


Figura 4. Mapa da América do Sul com detalhamento da região do Pantanal.

Fonte: Anais do Iº Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal.

Embrapa Pantanal, Corumbá. 265p.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13152-1	Data da Emissão: 30/01/2008 08:33	Data de Validade: 29/01/2009
-----------------	-----------------------------------	------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2145110	Nome: LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS	CPF: 528.742.651-87
Título do Projeto: HEPATOZON CAIMANI (APICOMPLEXA: HEPATOSOIDAE) NO JACARÉ CAIMAN CROCODYLUS YACARE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE: PREVALÊNCIA E TRANSMISSÃO NATURAL		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exige o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Fernando Paiva	Pesquisador	106.291.221-72	0276 crmv-MS	Brasileira
2	KARLA MAGALHÃES CAMPIÃO	Pesquisadora	014.904.771-10	01368292 SSP-MS	Brasileira
3	Olivia Tavares Dias	Pesquisadora	331.331.218-71	35.038.471-x ssp-SP	Brasileira
4	MARCOS EDUARDO COUTINHO	Pesquisador	541.126.486-34	M759844 SSP-MG	

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CORUMBA	MS	Base de estudos da UFMS	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Palaeosuchus palpebrosus, Caiman yacare, Caiman crocodylus, Culicidae, Anura, Characidae, Erythrinidae
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Anura, Characidae, Culicidae, Erythrinidae, Palaeosuchus palpebrosus, Caiman yacare, Caiman crocodylus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Characidae (*Qtde: 20), Erythrinidae (*Qtde: 20), Anura (*Qtde: 30), Culicidae (*Qtde: 2), Caiman crocodylus (*Qtde: 40), Caiman latirostris (*Qtde: 20), Palaeosuchus palpebrosus (*Qtde: 20), Caiman yacare (*Qtde: 20)
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Anura, Erythrinidae, Characidae
5	Marcação de animais silvestres in situ	Palaeosuchus palpebrosus, Caiman yacare, Caiman crocodylus

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 15671252



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13152-1	Data da Emissão: 30/01/2008 08:33	Data de Validade: 29/01/2009
------------------------	--	-------------------------------------

Dados do titular

Registro no Ibama: 2145110	Nome: LÚCIO ANDRÉ VIANA DIAS	CPF: 528.742.651-87
Título do Projeto: HEPATOZOOM CAIMANI (APICOMPLEXA: HEPATOSOIDAE) NO JACARÉ CAIMAN CROCODILUS YACARE NO PANTANAL SUL MATO-GROSSENSE: PREVALÊNCIA E TRANSMISSÃO NATURAL		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Sangue
2	Amostras biológicas (Peixes)	Sangue
3	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Armadilha de queda "pit fall"
4	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Armadilha luminosa, Captura manual
5	Método de captura/coleta (Peixes)	Rede de arrasto de praia: cerco de praia (tração manual), Rede de emalhar (emalhe de deriva, de fundo, malhadeiras, caceio, feitiças, tresmalhos e caçoeira), Anzol e linha (op.manual):linha de mão,de corso,carretilha,molinete,corrico,vara e isca viva
6	Método de captura/coleta (Répteis)	Laço com cabo de aço, Captura manual
7	Método de marcação (Animais)	"Tags"

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 15671252

