

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Detección molecular de *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) en  
*Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Dipsadidae) de la región litoral de  
Uruguay**

**“por”**

Valentín BAZZANO BIANCHI

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Tecnología de los alimentos

MODALIDAD: ensayo experimental

**SALTO  
URUGUAY  
2017**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

\_\_\_\_\_  
María Teresa Armúa

Segundo miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
María Laura Félix

Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
María Soledad Valledor

Cuarto miembro:

\_\_\_\_\_  
Luis Andrés Carvalho

Fecha:

17 de marzo de 2017

Autor:

\_\_\_\_\_  
Valentin Bazzano Bianchi

## **Agradecimientos**

A mi familia que me brindó todo lo necesario para culminar esta carrera universitaria. Al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Transmitidas, al Laboratorio de Parasitología Veterinaria y a la Facultad de Veterinaria por permitirme desarrollar la Tesis de Grado. A la Dra. María Laura Félix (Tutora), Luis Carvalho (Co-Tutor), Dra. María Teresa Armúa y al Dr. José Manuel Venzal por la ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

## **Tabla de contenido**

---

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Sitio de muestreo y obtención de las muestras	18
Procedimiento	19
Detección molecular de ADN de <i>Hepatozoon</i> sp. por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
Análisis de las secuencias	21
Análisis filogenéticos	21
RESULTADOS	22
Muestras obtenidas	22
PCRs	24
Prevalencia de <i>Hepatozoon</i> sp.	25
Análisis de las secuencias	25
Análisis filogenéticos	25
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

---

## Lista de figuras

Título	Página
1. Ejemplar de <i>Philodryas patagoniensis</i>	11
2. Gamontes de <i>Hepatozoon</i> sp. en eritrocitos (indicados por flechas)	13
3. Gamontes de <i>Hepatozoon</i> sp. en leucocitos (indicados por flechas)	13
4. Ciclo biológico de <i>Hepatozoon canis</i>	14
5. Colecta de <i>P. patagoniensis</i> atropellada en la ruta	18
6. Ejemplar atropellado	18
7. Extracción de sangre en corazón	19
8. Mapa de colectas. Señalado con color rojo se encuentran los puntos de colecta de los ejemplares positivos a <i>Hepatozoon</i> sp. y en blanco los negativos	22
9. Geles de electroforesis. A) Bandas correspondientes a la amplificación con los primers-cebadores Hep1-mod/Hep4: C-: control negativo; C+: control positivo; Líneas: 1, 2: muestras positivas (V1, V2). Líneas 3, 4, 5: muestras negativas (V3, V4, V5); M: marcador de peso molecular. B) Bandas generadas con los primers-cebadores HEMO1/HEMO2. M: marcador de peso molecular; Líneas: 1, 2: muestras positivas (V1, V2). Líneas 3, 4: muestras negativas (V3, V4). C-: control negativo; C+: control positivo	24
10. Árbol filogenético del gen 18S rRNA. Números de acceso de cada una de las especies relacionadas fue agregado en cada rama. <i>Dactylosoma ranarum</i> fue incluido como grupo externo	27

## **RESUMEN**

La Hepatozoonosis es una parasitosis causada por protozoarios del género *Hepatozoon*. Se conocen más de 300 especies de *Hepatozoon* en anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Para Uruguay, se ha detectado la presencia de *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon* sp. en perros y zorros de monte (*Cerdocyon thous*), respectivamente. Sin embargo, no se han hecho estudios para su detección en reptiles. El objetivo de este estudio fue detectar la presencia de *Hepatozoon* en sangre y órganos de la culebra *Philodryas patagoniensis* halladas muertas en rutas de la región litoral de Uruguay mediante la utilización de técnicas de biología molecular como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De las muestras obtenidas se extrajo el ADN el cual se cuantificó utilizando un espectrofotómetro. La detección molecular de ADN de *Hepatozoon* por PCR se realizó utilizando primers/cebadores que amplifican una región del gen 18S rARN de *Hepatozoon*. Los productos obtenidos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon utilizando la búsqueda BLASTn con las de otras especies de *Hepatozoon* diagnosticadas en países de la región. Con estas secuencias se realizó un análisis filogenético para determinar el grado de evolución y parentesco con otras especies que se encuentran presentes en la región. Se obtuvieron un total de 19 muestras de *P. patagoniensis* provenientes de los departamentos de Artigas (n=6), Salto (n=3), Paysandú (n=3), Río Negro (n=3), Colonia (n=3) y Soriano (n=1). Mediante la técnica de PCR 14 de las 19 muestras resultaron positivas a *Hepatozoon*, por lo que la prevalencia fue del 73,7%. La búsqueda por medio de BLASTn evidenció que las secuencias obtenidas resultaron ser homólogas entre un 97 y 100% con secuencias de *Hepatozoon* sp. provenientes de reptiles y anfibios de Brasil. El análisis filogenético demostró que las secuencias obtenidas se agrupan en tres clados, uno que se corresponde con *Hepatozoon cuestensis* de *Crotalus durissus terrificus*, otro con *Hepatozoon musa* de *Philodryas nattereri* y un tercer taxón

relacionado a *Hepatozoon* sp. obtenido de *Hemidactylus mabouia*. Esta es la primera evidencia de *Hepatozoon* en reptiles en Uruguay.

## **SUMMARY**

Hepatozoonosis is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Hepatozoon*. More than 300 species of *Hepatozoon* have been described in amphibians, reptiles, birds and mammals. In Uruguay, *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon* sp. were detected in dogs and in crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*), respectively. However, until now, no study was carried out in reptiles. The aim of this study was to detect the presence of *Hepatozoon* in blood and organs of *Philodryas patagoniensis* found dead on routes along the coastal region of Uruguay using a molecular biology technique: the polymerase chain reaction (PCR). DNA was extracted from samples and quantified by spectrophotometry. PCRs were performed using primers targeting a region of the 18S rRNA gene. PCR products were purified and sent for sequencing. By BLASTn search, the sequences obtained were compared with those of other *Hepatozoon* spp. reported from neighbor countries. Phylogenetic analyses were carried out to determine the degree of evolution and relationship with closed-related species found in the region. A total of 19 samples of *P. patagoniensis* from Artigas (n = 6), Salto (n = 3), Paysandú (n = 3), Rio Negro (n = 3), Colonia (n = 3) and Soriano (n = 1) were collected. Using the PCR technique 14 out of 19 samples were positive for *Hepatozoon* sp., revealing a prevalence of 73.7%. The BLASTn search showed a 97 to 100% identity with *Hepatozoon* sp. sequences from Brazilian reptiles and amphibians. Phylogenetic analysis split the samples into three clades; one corresponding to *Hepatozoon cuestensis* found in *Crotalus durissus terrificus*, another one with *Hepatozoon musa* from *Philodryas nattereri* and a third taxon related to *Hepatozoon* sp. obtained from *Hemidactylus mabouia*. This is the first report of *Hepatozoon* spp. in reptiles in Uruguay.

## **INTRODUCCIÓN**

Debido al clima y a nuestra historia biogeográfica, la fauna de reptiles del Uruguay es algo pobre en especies, pero, paradójicamente, es bastante diversa en géneros. En la literatura se mencionan unas 71 especies distribuidas en 50 géneros, ubicados en 22 familias dispuestas en 3 órdenes (Carreira y col., 2005; Carreira y Maneyro, 2013).

Los reptiles se caracterizan por ser vertebrados gnatostomados, terrestres o acuáticos, de piel seca, casi desprovista de glándulas, cubierta de escamas epidérmicas queratinizadas, en algunos grupos dispuestas sobre osteodermos. Las patas son cortas (a veces ausentes, o más o menos atrofiadas), de tipo general pentadáctilo, insertadas a lo largo del cuerpo, causando locomoción reptante. El corazón consiste en un ventrículo parcialmente dividido, salvo en cocodrilos. Son animales ectotermos, con crecimiento ilimitado, aunque más lento en edad adulta. Son amniotas, la fecundación siempre es interna, y el embrión se desarrolla dentro de un huevo telolecito con anexos embrionarios (Meneghel, 2008).

Al igual que muchos otros organismos, los reptiles enfrentan diversos problemas de conservación y se estima que alrededor del 19% de las especies del mundo se encuentran amenazadas. Estas amenazas se explican en su mayor parte por las acciones humanas. En Uruguay, la gran mayoría de los reptiles se encuentran protegidos por la legislación vigente. En particular, cabe señalar el decreto 164/996 por medio del cual se prohíbe la caza, tenencia, transporte, comercialización, e industrialización de especies zoológicas silvestres y sus productos, así como la destrucción de refugios, madrigueras, nidos y hábitats en general (Carreira y Maneyro, 2013). Sin embargo, la realidad es bastante diferente a lo expuesto en la legislación. Para este grupo en particular se observa una ineficiente fiscalización sobre el comercio ilegal, que involucra desde la recolecta furtiva e incluso masiva de huevos y especímenes, hasta la venta en ferias locales y comercialización por diferentes

medios. Las creencias populares y la falta de educación dirigida al público en general hacen que en particular, los ofidios sean percibidos negativamente siendo perseguidos, sin importar si representan o no algún tipo de peligro para el hombre (Carreira y Maneyro, 2013). Debido a estos aspectos, es necesario reafirmar la importancia de la educación, ya que, la protección efectiva de estos y otros organismos sólo será posible si son percibidos por las comunidades como elementos que deben conservarse. Las especies silvestres conforman complejas tramas ecológicas y la extinción o disminución poblacional de una de ellas puede tener consecuencias directas sobre otras. Además del interés biomédico o productivo que algunas especies puedan tener, la fauna es parte de nuestra identidad y por lo tanto, merece conservarse por su valor patrimonial (Carreira y Maneyro, 2013).

Existen cuatro órdenes actuales de reptiles, los Rhynchocephalia (tuátaras), Testudines (tortugas), Squamata (serpientes, lagartijas y anfibenas) y Crocodylia (cocodrilos), estos tres últimos presentes en Uruguay (Carreira y Maneyro, 2013). Los escamosos (Squamata) presentan abertura cloacal transversal, muda regular y sincrónica en todo el cuerpo, implantación dental superficial, autotomía caudal (registrado en muchos saurios y anfisbénidos) y presencia de hemipenes pares, entre otras características. Dentro de Squamata se encuentra actualmente el mayor número de especies vivientes de reptiles (Carreira y Maneyro, 2013). Squamata se divide en tres subórdenes: Lacertilia (lagartos), Serpentes (serpientes) y Amphisbaenia (culebrillas ciegas).

Serpentes, tiene sus representantes en todos los continentes y casi todas las islas, desde latitudes subárticas hasta los 46° latitud sur aproximadamente (Carreira y col., 2005).

Las serpientes u ofidios presentan un cráneo y una articulación cráneo mandibular con una importante kinesis, claramente visible en ofidios que ingieren grandes presas. Se reconocen cuatro tipos de denticiones: aglifo, opistoglifo, proteoglifo y solenoglifo. Los aglifos no tienen colmillo especializado, mientras que los opistoglifos presentan colmillos ubicados posteriormente en el maxilar con un canal abierto por donde escurre la ponzoña. En los proteoglifos se observa un colmillo anterior fijo de mayor o menor desarrollo dependiendo del ofidio. En Uruguay, el único ejemplar es la

víbora de coral. El aparato inoculador más especializado lo exhiben los solenoglifos que presentan un colmillo hueco dispuesto de forma horizontal cuando la boca está cerrada, de posición anterior y sujeto a un maxilar reducido que es capaz de rotar. Su lengua es bífida y cumple una función muy importante al explorar el aire en busca de partículas que analiza en el órgano vomeronasal (órgano de Jacobson). En algunos casos se observan órganos muy especializados que complementan la información visual con la obtenida por las fosetas loreales (presentes en géneros *Bothrops* y *Crotalus*), que consisten en órganos termorreceptores cuya comunicación al exterior se hace conspicua por delante de los ojos (Meneghel, 2008; Carreira y Maneyro, 2013).

La cópula de los ofidios esta mediada por los hemipenes, estructuras pareadas, propias de los machos, que se introducen en la cloaca de la hembra durante la cópula. El desarrollo de los embriones tiene lugar dentro del cuerpo de la madre y la salida de los mismos puede realizarse a través de dos mecanismos: oviparidad o viviparidad. Las especies ovíparas generalmente depositan sus huevos bajo piedras, troncos u otro tipo de refugios (Carreira y Maneyro, 2013).

Los ofidios son carnívoros, desde especialistas en moluscos hasta generalistas que incluyen desde artrópodos a mamíferos en la dieta.

La familia Dipsadidae Bonaparte, 1838 es reconocida por Zaher y col. (2009) como una familia distinta de Colubridae Oppel, 1811. Más recientemente, las subfamilias Dipsadinae Bonaparte, 1838 y Xenodontinae Bonaparte, 1845 reconocidas como subdivisiones de Colubridae pasaron a ser parte de Dipsadidae y dentro de esta familia fue creada una nueva subfamilia, Carphophiinae (Zaher y col., 2009).

El género *Philodryas* Wagler, 1830 es un género de serpientes Neotropicales que se distribuye en prácticamente toda América del Sur, y reúne 20 especies, de las cuales solo 4 están presentes en nuestro país (Carreira y Maneyro, 2013; de Souza-Filho y Plombon, 2014). Presentan dentición de tipo opistoglifo con 9-15 dientes maxilares que crecen hacia atrás, y dos colmillos posteriores separados por diastema (Carreira y col., 2005). Son especies de hábitos diurnos, ocasionalmente arborícolas. Existen especies de carácter agresivo y otras dóciles. Algunos taxones pueden inocular toxinas

relativamente activas en el hombre, e incluso como el caso de *P. offersii* provocar accidentes de gravedad (Carreira y col., 2005).

*Philodryas patagoniensis* Girard, 1857, se conoce con el nombre vulgar “Parejera” debido a la creencia de que esta especie corre tanto como un caballo parejero (corredor) (de Lema, 2002). Los adultos pueden sobrepasar el metro y medio de longitud total. El cuerpo es relativamente robusto con una cola delgada, siendo la misma más larga en los machos que en las hembras. Tiene un hocico redondeado y la placa rostral es más ancha que larga. La escama loreal está presente y posee una escama preocular y dos postoculares. Presenta siete escamas supralabiales (tercera y cuarta en contacto con la órbita) y nueve infralabiales con 1-4 en contacto con el primer par de geneales.

El dimorfismo sexual es evidente en ejemplares juveniles, ya que, las hembras poseen mayor largo rostro-cloacal que los machos y también alcanzan en su madurez un largo rostro-cloacal mayor. La escama anal está dividida y el hemipene bilobado (Pontes, 2007; Carreira y Maneyro, 2013).

El color general del cuerpo en esta especie es muy variable, pudiendo ir desde tonos de verde hasta castaño o grisáceo. En los adultos la coloración general tiende a ser homogénea, la coloración ventral es clara, blanquecina con los bordes de las escamas algo más oscuros (Carreira y col., 2005; Carreira y Maneyro, 2013) (Figura 1).



Ejemplar de *Philodryas patagoniensis*

Es considerada una de las especies de mayor frecuencia en áreas abiertas de la región meridional cisandina del continente. Presenta una amplia dispersión que incluye Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay (de Lema, 2002).

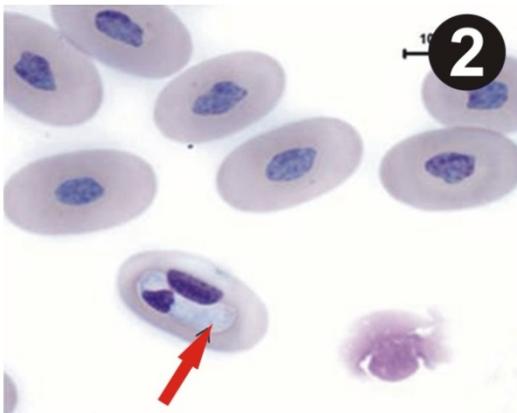
En Uruguay se encuentra en todo el territorio. Presente en todos los ambientes incluyendo campo abierto, zonas urbanas, suburbanas y ambientes alterados. Generalmente sobre el sustrato, aunque pueden trepar con agilidad en busca de alimento. De movimientos ágiles, temperamento agresivo y no duda en morder al sentirse amenazada (Carreira y Maneyro, 2013). La especie es exclusivamente diurna y constante durante todo el año, su actividad diaria es variable y se concentra en los períodos más calientes durante los meses más fríos y en los períodos de temperaturas más agradables en los días soleados de los meses más calientes (Pontes, 2007). Es considerada una serpiente marcadamente generalista alimentándose de artrópodos (arañas y hormigas), peces y anfibios. También de reptiles como saurios, anfisbenas, ofidios, roedores y aves, e incluso canibalismo. Para inmovilizar presas grandes esta especie emplea una combinación de constricción y envenenamiento (Pontes, 2007; Carreira y Maneyro, 2013).

En cuanto a su reproducción, según Pontes (2007) las hembras poseen un ciclo con una marcada estacionalidad. Los machos alcanzan la madurez sexual antes que las hembras y con un menor tamaño corporal. Las puestas son realizadas en hormigueros del género *Acromyrmex*, esta especie de hormiga es llamada cultivadora de hongo y en la región central del nido mantienen niveles de humedad y temperatura que favorecen el desarrollo de los huevos. La cantidad de huevos puede variar de 3 a 26. Los mismos son blancos de forma elipsoidal u ovoide (Carreira y Maneyro, 2013). Aunque son escasos los reportes de mordeduras en humanos por esta culebra, se sabe que la secreción de su glándula de Duvernoy posee una toxicidad suficiente como para producir daños locales severos, tales como: edema, hemorragia, mionecrosis y dermonecrosis (Peichoto y col., 2005). Desde el punto de vista de su conservación es clasificada como Preocupación Menor (LC) a escala global y local (Carreira y Maneyro, 2013).

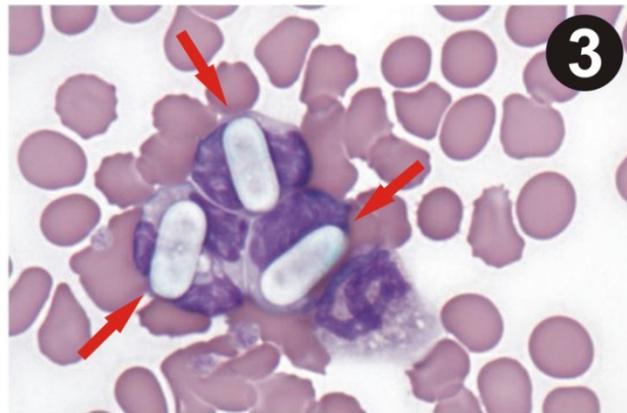
El phylum Apicomplexa es un grupo de protistas compuesto por diversos organismos que se caracterizan por ser parásitos obligatorios. Sin embargo, a pesar de su gran importancia sanitaria desde el punto de vista médico y veterinario se estima que únicamente el 0,1% de las especies de este phylum han sido descritas (Morrison, 2009).

La Hepatozoonosis es una parasitosis causada por protozoarios apicomplexos de la familia Hepatozoidae pertenecientes al género *Hepatozoon*. Las especies de *Hepatozoon* están entre los hemoparásitos más abundantes y ampliamente distribuidos. Se conocen más de 300 especies de *Hepatozoon* que han sido descritas en anfibios, reptiles, aves y mamíferos. De ellas, unas 120 han sido determinadas en ofidios (Smith y col., 1999).

La denominación de *Hepatozoon* proviene del desarrollo de la merogonia en el hígado, aunque no en todas las especies utilizan este tejido en forma principal. En el caso de las especies que tienen como hospedadores anfibios, reptiles y aves, los gamontes infectan eritrocitos (Figura 2) y en los mamíferos principalmente leucocitos (Figura 3).



**Gamontes de *Hepatozoon* sp. en eritrocitos (indicados por flechas)**  
Fuente: O'Dwyer y col., 2013.



**Gamontes de *Hepatozoon* sp. en leucocitos (indicados por flechas)**  
Fuente:

<https://www.studyblue.com/notes/note/n/leukocytealterations/deck/2127197>

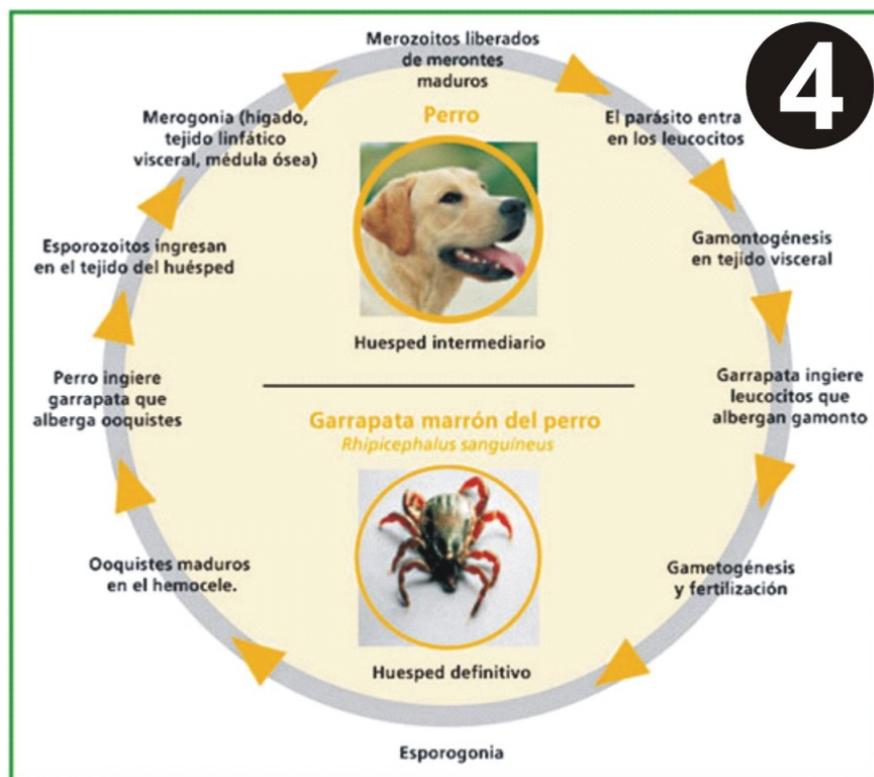
El desarrollo general del ciclo de *Hepatozoon* spp. incluye una forma de desarrollo asexual: merogonia seguido de gametogonia en el vertebrado intermediario que puede ser un mamífero, y un desarrollo sexual que lleva a la esporogonia en un invertebrado hematófago que es el hospedador definitivo

(Figura 4).

Los principales hospedadores definitivos invertebrados de *Hepatozoon* spp. son una amplia variedad de artrópodos hematófagos que incluyen garrapatas (Ixodidae e Argasidae), ácaros (Acari), mosquitos (Culicidae), flebótomos (Phlebotominae), moscas picadoras (Diptera), pulgas (Siphonaptera), piojos (Anoplura) y chinches (Hemiptera) (Smith, 1996).

A diferencia de muchos protozoos y bacterias, patógenos transmitidos por vectores que se transmiten a través de la saliva, en el caso de *Hepatozoon* la infección del hospedador intermediario se produce por la ingestión del hospedador definitivo que posee los ooquistes maduros.

Si bien hasta el año 1996 se conocían unas 120 especies de *Hepatozoon* parásitas de serpientes, todos los años se están describiendo nuevas especies infectando estos reptiles (Sloboda y col., 2007). En el caso de los reptiles, las especies de *Hepatozoon* se encuentran aparentemente adaptadas a sus hospedadores naturales de forma que causan poca o ninguna patología sobre los mismos.



Ciclo biológico de *Hepatozoon canis*

Fuente: [http://www.veterinaria.net/Bayer\\_News/newsletter\\_MAR2010.html](http://www.veterinaria.net/Bayer_News/newsletter_MAR2010.html)

En cambio, si la infección se produce en un hospedador no natural, esta puede causar inflamaciones significativas como hepatitis necrótica, pancreatitis y esplenitis (Pessoa y col., 1974; Wozniak y col., 1994). Otros relatos mencionan problemas neurológicos en *Crotalus durissus terrificus* mantenida en cautiverio (Wozniak y col., 1996) y cuadros de anemia hemolítica en infecciones con alta parasitemia (Campbell, 1996). Además, se han reportado problemas en el crecimiento en *Liasis fuscus* en la naturaleza (Ujvari y col., 2004) y disminución del rendimiento reproductivo en hembras. Se cree que la infección por *Hepatozoon* spp. en serpientes en la naturaleza puede tener mayor importancia en la ecología de la especie y no producir tantos casos clínicos aparentes. Es probable que el potencial patogénico de las especies de *Hepatozoon* sea mayor en condiciones de cautiverio, por lo que el control parasitológico en estas condiciones debe ser fundamental para evitar su diseminación en criaderos.

El diagnóstico se realiza mediante frotis de sangre periférica con tinción de Leishman o Giemsa (Campbell, 1996; Moço y col., 2002). Actualmente se incluye el diagnóstico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de sangre y órganos como bazo, hígado, etc. (Wozniak y col., 1994, Haklová y col., 2014).

La clasificación taxonómica para identificar las especies de *Hepatozoon* ha sido principalmente en base a la morfología de los gamontes en la sangre del hospedador vertebrado o estadios esporogónicos en el hospedador invertebrado. Uno de los principales problemas en esta forma de identificar especies es que existe una gran semejanza entre gamontes y ooquistes entre especies de *Hepatozoon*, por lo que la identificación utilizando únicamente esta técnica puede llevar a confusiones (Pessoa y col., 1973).

La gran mayoría de las descripciones de *Hepatozoon* spp. en ofidios se basan en la morfología y morfometría de los gamontes, aunque últimamente se están complementando con técnicas moleculares (Telford y col., 2004). Igualmente, a pesar de los avances, existen conflictos en la literatura debido a la interpretación entre técnicas antiguas y las utilizadas en las descripciones más recientes (Moço y col., 2002).

Otro problema puede ser la baja especificidad de las especies de

*Hepatozoon* tanto en los hospedadores vertebrados como invertebrados, pudiendo una misma especie parasitar más de una especie de serpiente (Smith, 1996).

En cuanto a la prevalencia de *Hepatozoon* spp. en serpientes, existen trabajos realizados en Brasil sobre diferentes especies. Por ejemplo, Pessoa y col. (1974) hallan una prevalencia del 62% para *Boa constrictor*, 24% para *Bothrops jararaca* y del 11% para *C. durissus terrificus*. Por otro lado, analizando animales recién capturados, O'Dwyer y col. (2003), refieren a altas prevalencias de infección por *Hepatozoon* spp. para *Boa constrictor amarali* (38,9%), *B. jararaca* (35,3%) y *C. durissus terrificus* (19,4%).

En cuanto a *Hepatozoon* en *Philodryas patagoniensis* únicamente se ha descrito una especie, *Hepatozoon philodryasi* en Brasil (Carini, 1910). Un estudio morfológico que incluye el análisis morfométrico de diferentes especies de *Hepatozoon* de culebras y víboras de Brasil, establece que únicamente con la morfología no se puede afirmar la validez de las especies. Como ejemplo mencionan que especies como *Hepatozoon philodryasi*, *Hepatozoon terzii* de *Boa constrictor* y *Hepatozoon* sp. de *Crotalus durissus* son una sola especie o son especies diferentes estrechamente relacionadas (Moço y col., 2002).

Moço y col., (2002) resaltan que con el uso de técnicas moleculares para la comparación de los respectivos ADN se podrían resolver estos problemas, lo cual ha sido demostrado para otras especies en los trabajos de Wozniak y col., (1994) y Smith y col. (1999).

En cambio, en Uruguay casi no existen estudios sobre *Hepatozoon*, salvo algunos casos clínicos y otros con confirmación molecular de *Hepatozoon canis* en perros y *Hepatozoon* sp. en zorros (Carvalho y col., 2015; Martino y col., 2015).

Esta tesis tuvo como cometido el uso de técnicas moleculares para la detección de *Hepatozoon* sp. en *Philodryas patagoniensis* halladas muertas en rutas y caminos vecinales del litoral del país. Adicionalmente, estimar la prevalencia y realizar la caracterización molecular y relacionamiento con las taxas encontradas en la región por medio de estudios filogenéticos.

## **HIPÓTESIS**

- La o las posibles especies de *Hepatozoon* presentes en *Philodryas patagoniensis* de la región litoral de Uruguay son las mismas o similares a las determinadas en culebras y víboras de los países vecinos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

- Detectar la presencia de *Hepatozoon* spp. en *Philodryas patagoniensis* de la región litoral de Uruguay.

### **Objetivos específicos:**

- Detectar la presencia de *Hepatozoon* sp. mediante técnicas de biología molecular en *P. patagoniensis* halladas muertas en rutas de la región litoral de Uruguay.
- Determinar la prevalencia de *Hepatozoon* sp. en *P. patagoniensis* de la región litoral de Uruguay.
- Comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas de *Hepatozoon* sp. en *P. patagoniensis* con las de otras especies diagnosticadas en países vecinos y que se encuentren disponibles en GenBank.
- Analizar a través de estudios filogenéticos la o las taxas de *Hepatozoon* en nuestro país y su relación con otras especies de la región.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sitios de muestreo y obtención de las muestras**

Entre julio de 2015 y octubre de 2016 se colectaron *P. patagoniensis* halladas muertas recientemente en rutas de los departamentos de la región litoral: Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Soriano, y Colonia (Figuras 5 y 6). Además de los ejemplares colectados durante este período, se procesaron culebras que fueron colectadas en años anteriores, y que se encontraban congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Vectores y Enfermedades Trasmitidas del CENUR Litoral Norte - Salto.



**Colecta de *P. patagoniensis* atropellada en la ruta**



**Ejemplar atropellado**

Al momento de la colecta, se registraron los siguientes datos: ruta, kilómetro, coordenadas, localidad más cercana y departamento. Se colocaron en bolsas plásticas individuales identificadas y se conservaron con refrigerantes hasta la llegada al Laboratorio de Vectores y Enfermedades Trasmitidas del CENUR Litoral Norte - Salto, donde fueron procesadas.

Para la clasificación de las culebras se siguieron las claves propuestas en la guía de Carreira y Maneyro (2013).

Teniendo en cuenta que las culebras ya se encuentran muertas al momento de ser obtenidas, para esta tesis no fue necesario contar con la aprobación previa de la Comisión de Bioética.

### **Procedimiento**

En el laboratorio, las culebras colectadas se procesaron inmediatamente o de lo contrario, fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Para la extracción de sangre se realizó una incisión ventro-medial y se extrajo la misma con una jeringa de insulina del corazón, aorta o vena cava (Figura 7).



**Extracción de sangre en corazón**

La sangre se depositó en un tubo con anticoagulante (EDTA) y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento por medio de biología molecular. En

los casos que no se logró obtener sangre, se extrajeron muestras de tejido: corazón, hígado y bazo los cuales también se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

### **Detección molecular de ADN de *Hepatozoon* sp. por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras de sangre y tejidos con el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN fue medida con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

PCR fue el método elegido para el diagnóstico molecular del género *Hepatozoon*. Se realizaron dos PCRs independientes diseñadas para amplificar dos diferentes fragmentos del gen 18S ARN ribosomal (rARN). Las secuencias de cada uno de los cebadores-primers y las referencias se detallan en la Tabla 1. Los cebadores-primers HEMO1/HEMO2 amplifican un fragmento de ~900 pb, mientras que Hep1-mod/Hep4 un fragmento de ~670 pb, las PCR se realizaron de acuerdo a Harris y col. (2011) y Spolidorio y col. (2009), respectivamente. Dichas PCRs fueron elegidas ya que los fragmentos obtenidos se solapan y, por lo tanto, pueden ensamblarse obteniendo un fragmento más largo (aproximadamente ~1300 pb).

Los productos resultantes de ambas PCRs se visualizaron utilizando un transiluminador UV inmediatamente luego de una corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, conteniendo un intercalante GoodView™ Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech Co., LTd). Los amplicones de tamaño esperado fueron purificados mediante el kit comercial PureLink™ Quick PCR Purification kit (Invitrogen, Alemania) y enviados a secuenciar a Macrogen, Corea. Los amplicones obtenidos con el par HEMO1/HEMO2 fueron secuenciados en ambos sentidos, mientras que los amplicones de Hep1-mod/Hep4 fueron solo secuenciados con Hep1-mod.

**Tabla 1. Cebadores-primers utilizados en este trabajo**

Cebador-primer	Secuencia	Referencia
<b>HEMO1</b>	TAT TGG TTT TAA GAA CTA ATT TTA TGA TTG	Perkins y Keller, 2001
<b>HEMO2</b>	CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG GTT CAC	
<b>Hep1-mod</b>	CGC GAA ATT ACC CAA TTC TA	Spolidorio y col. 2009
<b>Hep4</b>	TAA GGT GCT GAA GGA GTC GTT TAT	

### **Análisis de las secuencias**

Todos los alineamientos globales fueron realizados utilizando MUSCLE en el software MEGA 7 (Kumar y col., 2016). Las secuencias obtenidas de secuenciar cada muestra con HEMO1 y HEMO2 fueron alineadas entre sí. Cuando fue necesario, se realizaron correcciones manuales comparando los cromatogramas de ambas secuencias. Con el alineamiento de ambas secuencias se generó una secuencia consenso. Luego se procedió a ensamblar la secuencia consenso de cada una de las muestras (HEMO1/HEMO2) con la respectiva Hep1-mod.

Para el estudio de la identidad, las secuencias ensambladas y corregidas fueron comparadas con las disponibles en el GenBank mediante la búsqueda BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **Análisis filogenéticos**

Las secuencias de referencia de las especies relacionadas fueron bajadas de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y utilizadas para el alineamiento con las secuencias obtenidas.

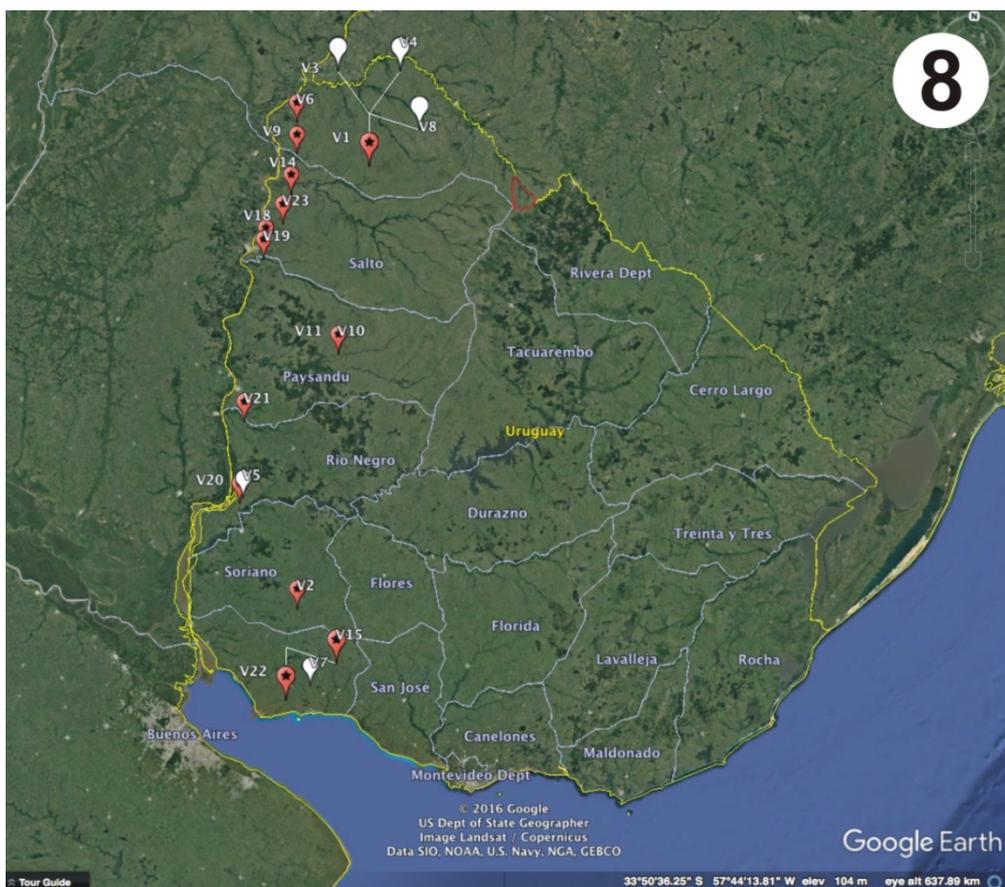
Las relaciones filogenéticas entre las muestras obtenidas y las especies relacionadas fueron estudiadas a través de la construcción de un árbol de máxima verosimilitud con el software PhyML (Guindon y col., 2005) que se encuentra disponible online (<http://www.phylogeny.fr/>). El árbol fue generado con el modelo GTR (general de tiempo reversible) usando una distribución gamma (+G) de 0.20. El soporte de los nodos fue determinado usando 100

réplicas de bootstrap. Se escogió como grupo externo *Dactylosoma ranarum* Labbe 1894, un apicomplejo que se encuentra en el anfibio *Rana esculenta*.

## RESULTADOS

### Muestras obtenidas

Se obtuvieron un total de 19 muestras de *P. patagoniensis* encontradas atropelladas en rutas y caminos vecinales del litoral de Uruguay, los detalles de cada ejemplar se muestran en la Tabla 2. Se obtuvieron muestras en todos los departamentos del litoral: Artigas (n=6) Río Negro (n=3), Colonia (n=3), Paysandú (n=3), Salto (n=3) y Soriano (n=1). La ubicación geográfica se detalla en la Figura 8.



Mapa de colectas

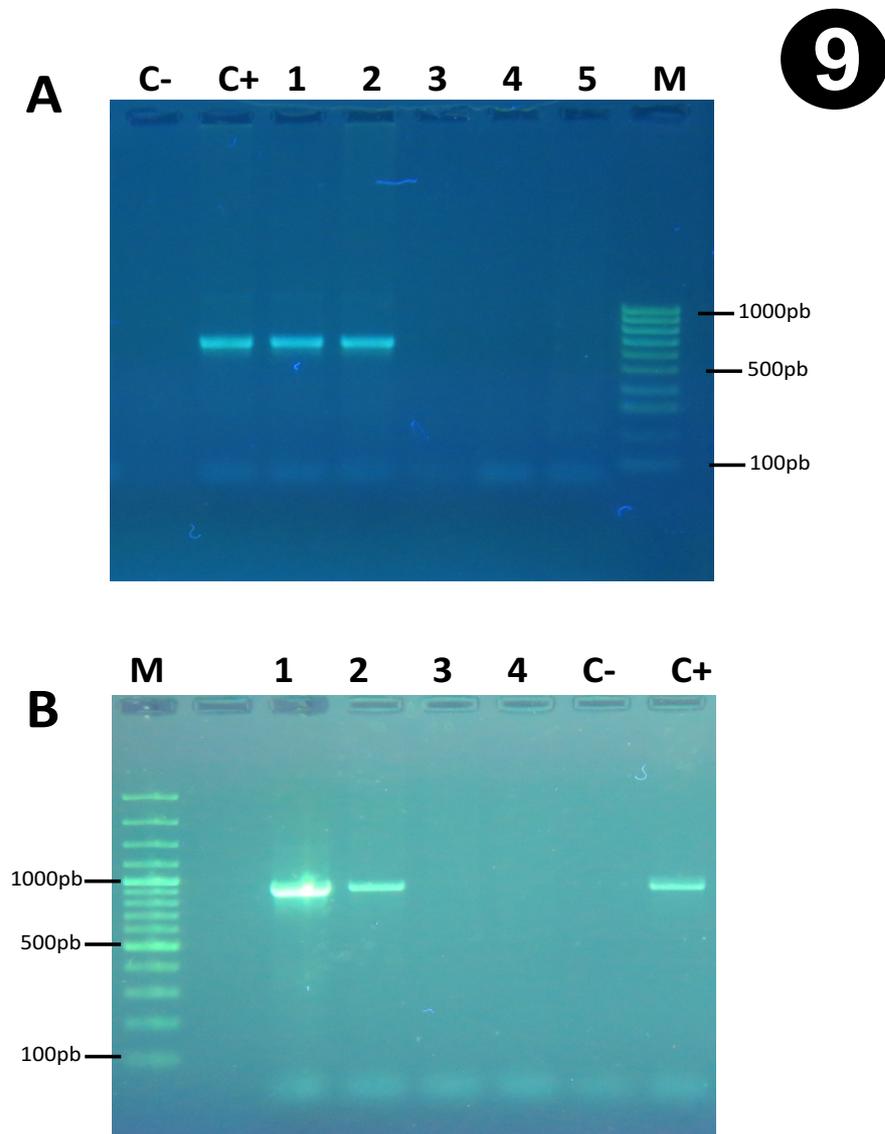
**Tabla 2. Datos de las muestras colectadas**

Código	Sexo	Localidad de colecta	Coordenadas	Colectores	Fecha de colecta	ADN extraído de sangre ( ng/ul)	PCR Hepatozoon
V01	H	Ruta 30, entrada a Colonia Artigas - Artigas	30°28'36"S, 57°7'31"O	VB	07/04/2012	51,6	Positivo
V02	H	Ruta 55, km 57,200, Puente A° San Martín - Soriano	33°45'28"S, 57°34'41"O	JMV, MLF	01/01/2013	88	Positivo
V03	H	Ruta 30, entrada a Colonia Artigas - Artigas	30°28'36"S, 57°7'31"O	VB	25/05/2014	110	Negativo
V04	H	Ruta 30, entrada a Colonia Artigas - Artigas	30°28'36"S, 57°7'31"O	VB	20/09/2013	112	Negativo
V05	M	Ruta 24, acceso a Nuevo Berfín - Río Negro	33°2'20"S, 58°1'10"O	JMV, MLF	01/01/2011	129	Negativo
V06	H	Ruta 3, km 589, A° Falso Mandiyú - Artigas	30°33'5"S, 57°40'7"O	VB	01/02/2015	16,9	Positivo
V07	H	Ruta 54, acceso a Barker - Colonia	34°15'55"S, 57°27'47"O	JMV, MLF	02/04/2014	53,2	Negativo
V08	H	Ruta 30, entrada a Colonia Artigas - Artigas	30°28'36"S, 57°7'31"O	VB	30/08/2015	726,4	Negativo
V09	H	Diego Lamas - Artigas	30°45'28"S, 57°3'18"O	MM	28/12/2014	42	Positivo
V10	H	Establecimiento "El Relincho" - Paysandú	32°44'1"S, 57°18'13"O	VB	11/07/2015	115	Positivo
V11	H	Establecimiento "El Relincho" - Paysandú	32°44'1"S, 57°18'13"O	VB	11/05/2015	151	Positivo
V14	M	Ruta 3, km 536.9, Puente Arroyo Palomas - Salto	31°08'7"S, 57°42'12"O	JMV, MLF	11/02/2016	333,7*	Positivo
V15	M	Miguelete - Colonia	34°0'43"S, 57°39'44"O	JMV, MLF	16/11/2015	52,7	Positivo
V18	H	Barrio Artigas, Salto- Salto	31°22'59"S, 57°53'15"O	JMV, MLF	17/10/2016	159,7*	Positivo
V19	H	Ruta 3, km 476, Puente Daymán - Paysandú	31°27'37"S, 57°54'8"O	JMV	30/09/2015	199,5	Positivo
V20	H	Ruta 24, km 17, cerca Estación La Víbora - Río Negro	33°4'22"S, 58°2'50"O	JMV, MLF	13/11/2015	181,1	Positivo
V21	M	Ruta 24, km 83.500, Puente Arroyo Negro - Río Negro	32°32'2"S, 58°12'1"O	JMV, MLF	27/03/2016	42,8	Positivo
V22	H	Miguelete - Colonia	34°0'43"S, 57°39'44"O	JMV, MLF	16/11/2015	1176,5	Positivo
V23	H	Ruta 3, km 512 - Salto	31°13'27"S, 57°45'37"O	JMV, MLF	11/02/2016	15,9*	Positivo

VB: Valentín Bazzano; MM: Martín Martincorena; JMV: José Manuel Venzaj; MLF: María Laura Félix  
\*se extrajo ADN de muestras de corazón.

## PCRs

Mediante la técnica de PCR 14 de las 19 muestras fueron positivas a *Hepatozoon* sp. Se lograron obtener muestras positivas a *Hepatozoon* de *P. patagoniensis* en todos los departamentos del litoral. De las 14 muestras positivas, 13 se amplificaron con ambos sets de cebadores-primers (HEMO1/HEMO2 y Hep1-mod/Hep4), mientras que la muestra V9 únicamente pudo ser amplificada con los cebadores-primers Hep1-mod/Hep4. En la Figura 9, se muestran 2 geles con las bandas obtenidas (de algunas de las muestras) con los cebadores-primers Hep1-mod/Hep4 (A) y HEMO1/HEMO2 (B).



Geles de electroforesis

## **Prevalencia de *Hepatozoon* sp.**

En este estudio la prevalencia de *Hepatozoon* sp. en *P. patagoniensis* utilizando PCR fue del 73,7% (14/19).

## **Análisis de las secuencias**

El largo de las secuencias varía desde 394 a 1232 pb. La secuencia más corta corresponde a V9, ya que sólo se pudo secuenciar con el cebador-primer Hep1-mod y la más larga fue obtenida de la muestra V21.

Los resultados al utilizar la herramienta BLASTn relevaron que todas las muestras tuvieron entre un 97 y un 100% de identidad con las secuencias registradas de *Hepatozoon* sp. del hospedero *Hemidactylus mabouia* procedente de Brasil. A su vez, V6 también mostró un 99% de identidad con *Phyllopezus periosus*, mientras que, V9 obtuvo un 100% con *Phyllopezus pollicaris* también procedente de Brasil. La muestra V18 fue la más inconclusa ya que presentó el mismo porcentaje de identidad (99%) con *Hepatozoon* spp. de 3 especies de reptiles (*Hemidactylus mabouia*, *Caiman crocodilus yacare*, *C. durissus terrificus*) y una de anfibio (*Leptodactylus* sp.)

Los detalles de las muestras, el largo de las secuencias y porcentajes de identidad son detallados en la Tabla 3.

## **Análisis filogenéticos**

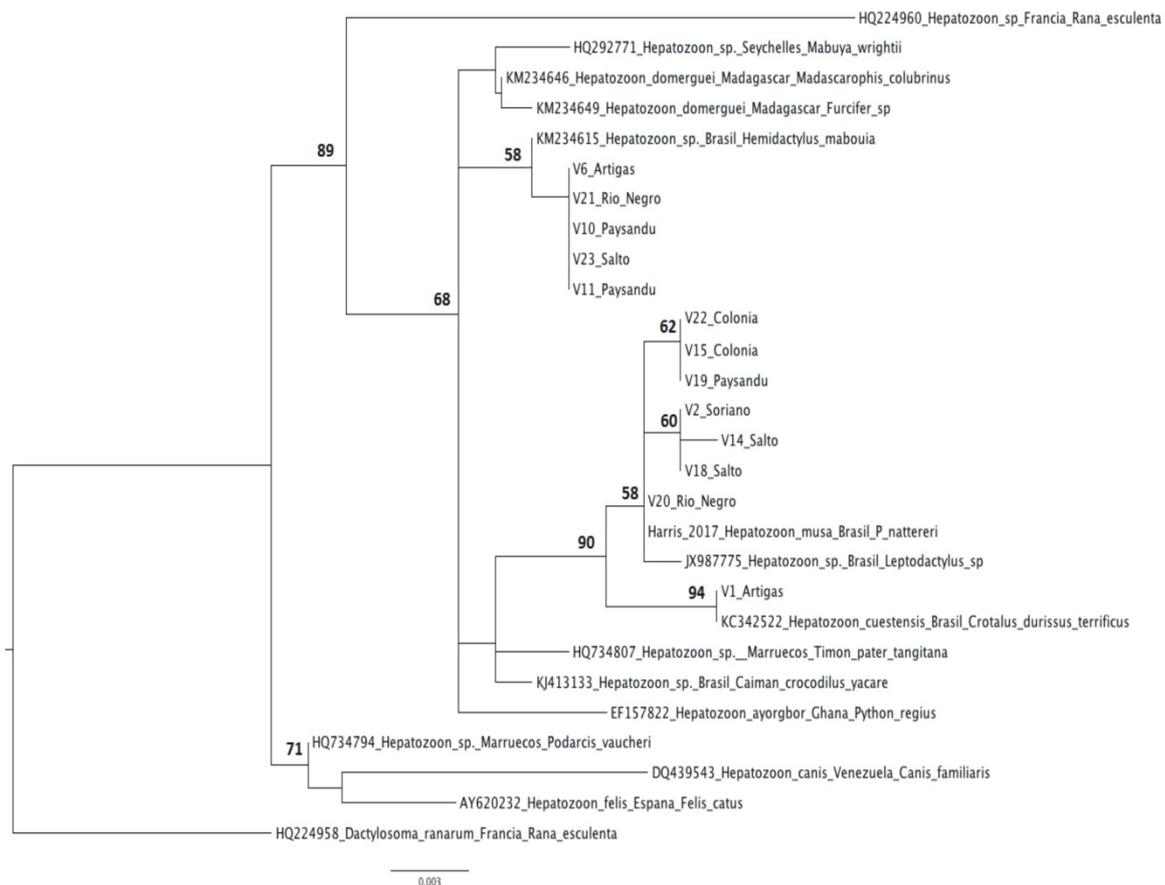
El árbol fue generado a partir de un alineamiento con las secuencias obtenidas en este estudio y las relacionadas que se encontraban disponibles en el GenBank. Adicionalmente, D.J. Harris, que realizó un trabajo con *Philodryas nattereri* en el noreste de Brasil, nos envió la secuencia que fue utilizada en su última publicación (Borges-Nojosa y col., 2017) ya que a la fecha no se encuentra disponible en el GenBank. A pesar de que la mayoría de los fragmentos obtenidos superaban los 1000 pb, sólo se utilizó un fragmento de 824pb. Con este largo de fragmento se pudo incluir secuencias disponibles en el GenBank que eran más cortas. De este modo, se pudieron comparar las muestras obtenidas con 15 taxas diferentes. Como se muestra en la Figura 10,

**Tabla 3. Comparativo de secuencias obtenidas en el trabajo con secuencias de reptiles y anfibios de la región depositadas en el Genbank**

<b>Código</b>	<b>Pb</b>	<b>% de identidad</b>	<b>Número de acceso en Genbank</b>	<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Hospedero</b>
<b>V01</b>	1126	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V02</b>	848	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V06</b>	1168	99	KM234614.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Phyllopezus periosus</i>
	1168	98	KM234617.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V09</b>	394	100	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
		100	KM234612.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Phyllopezus pollicaris</i>
<b>V10</b>	1216	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V11</b>	1213	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V14</b>	1215	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V15</b>	847	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V18</b>	822	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
		99	KJ413133.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Caiman crocodilus yacare</i>
		99	KC342522.1	<i>Hepatoozon cuestensis</i>	Brasil	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
		99	JX987775.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Leptodactylus</i> spp.
<b>V19</b>	1203	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V20</b>	1126	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V21</b>	1232	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V22</b>	848	99	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>
<b>V23</b>	1126	97	KM234615.1	<i>Hepatoozon</i> sp.	Brasil	<i>Hemidactylus mabouia</i>

las muestras obtenidas se separan en 3 clados diferentes. Por un lado, V6, V10, V11, V21 y V23 corresponderían a una sola especie y estarían fuertemente relacionadas a *Hepatozoon* sp. obtenido de *H. mabouia* de Brasil. Mientras que, un segundo grupo monofilético engloba las muestras V2, V14, V15, V18, V19, V20 y V22 con los *Hepatozoon* sp. y *Hepatozoon musa* de *Leptodactylus* sp. y *Philodryas nattereri*, respectivamente. Por último, un tercer clado estaría conformado por la muestra V1 y *H. cuestensis* de *C. durissus terrificus* de Brasil. La secuencia de V9 no pudo ser incluida en el análisis filogenético ya que el segmento obtenido fue muy corto (394pb) y quedó fuera de la zona de alineamiento que se utilizó para la confección del árbol.

10



Árbol filogenético del gen 18S rRNA

## DISCUSIÓN

A la fecha, existen escasos trabajos sobre *Hepatozoon* spp. en serpientes naturalmente infectadas. En este estudio, la prevalencia observada de *Hepatozoon* spp. en los ejemplares de *P. patagoniensis* colectadas en las rutas del litoral de Uruguay fue del 73,7%. Dicha prevalencia puede ser considerada alta teniendo en cuenta el trabajo de O'Dwyer y col, 2003, donde se analizaron 6 *P. patagoniensis* resultando una sola muestra positiva para *Hepatozoon* sp. En la tesis presentada por Moço (2008) se analizaron 9 *P. patagoniensis*, sin que se hallara *Hepatozoon* en ninguna de dichas muestras. Cabe destacar que en ambos estudios el diagnóstico fue realizado únicamente mediante frotis sanguíneos. Así mismo, otro estudio realizado en otra serpiente del mismo género, *P. nattereri* en el noreste de Brasil reportó una muy baja prevalencia del género *Hepatozoon* encontrándose un solo espécimen infectado de 7 analizados (Borges-Nojosa y col., 2017).

El trabajo realizado por Moço y col. (2002) se basó en el estudio morfológico y morfométrico de los gamontes encontrados en sangre de diferentes tipos de serpientes naturalmente infectadas con *Hepatozoon* spp. Si bien dicho estudio denota un arduo y detallado trabajo, los resultados no son lo suficientemente concluyentes para distinguir entre especies cercanas. Como plantean O'Dwyer y col. (2013), para realizar una correcta caracterización de las diferentes especies de *Hepatozoon*, sería necesaria la combinación de los hallazgos morfológicos con los marcadores moleculares. Sin embargo, cuando se utilizan ejemplares muertos, encontrados en el ambiente, la autólisis de los mismos, puede comprometer la integridad de los eritrocitos, dificultando así la visualización de los gamontes. Por lo tanto, las herramientas moleculares, en especial PCR/secuenciación, adquieren un rol fundamental en el diagnóstico y caracterización de las diferentes especies de *Hepatozoon*. En este estudio, 14 de las 19 muestras analizadas fueron positivas a PCR. En 3 de las 14 muestras positivas (V14, V18 y V23) el ADN fue obtenido de trozos de corazón, demostrando así que este órgano es una buena fuente para detectar el parásito. Debido a que el material fue extraído de especímenes encontrados muertos en las rutas y caminos, el estado de las mismas (aplastadas,

reseca y en muchas ocasiones en estado de descomposición) limitó en gran medida la cantidad y calidad del material a analizar. En particular, la sangre extraída fue, en la mayoría de los casos, muy escasa alcanzando solo para la extracción de ADN, sin la posibilidad de realizar frotis de las mismas.

Del total de las muestras analizadas, 13 fueron positivas para ambos PCRs. Sin embargo, V9 fue la única muestra que no se logró amplificar con los cebadores-primers HEMO1/HEMO2. Esto podría deberse a una degradación de dicha muestra. Por otro lado, el largo obtenido de las secuencias que fueron ensambladas con los amplicones de ambos PCRs varió de 822 a 1232 pb. Esta diferencia en el largo fue debido a que las secuencias obtenidas con el cebador-primer Hep1-mod, variaron en la calidad de las mismas. Si bien se realizaron arreglos manuales de las secuencias, en ciertos casos fue imposible debido a información faltante o inconclusa (pares de bases faltantes, sobrantes o indeterminados). Si bien esto podría haberse enmendado con la secuenciación de los mismos amplicones con el cebador-primer Hep4, esto no fue posible debido a falta de recursos.

Los resultados del análisis de identidad sugieren que todas las muestras estarían fuertemente relacionadas con el *Hepatozoon* sp. obtenido de *H. mabouia* de Brasil. Sin embargo, el análisis filogenético demuestra la existencia de tres taxones de *Hepatozoon*, dos de los cuales coinciden con especies ya descritas (*H. cuestensis* y *H. musa*) además de *Hepatozoon* sp. de *H. mabouia* antes mencionado. Es importante enfatizar que los estudios de identidad hechos con la herramienta BLASTn, si bien son ampliamente utilizados, no deben ser tomados como determinantes ya que la información obtenida no es lo suficientemente precisa. Por otro lado, los estudios filogenéticos han demostrado ser más certeros ya que utilizan modelos que toman en cuenta las variantes biológicas como por ejemplo deleciones e inserciones que ocurren naturalmente en los procesos evolutivos (Whelan y col., 2001).

El árbol filogenético indica que la muestra V1 colectada en Artigas correspondería a la especie *H. cuestensis* descrita para *C. durissus terrificus*. Esta especie de serpiente también se encuentra presente en nuestro país. A su vez, un segundo clado compuesto por 7 de las muestras correspondería a otra

especie, *H. musa*, descrita recientemente para *Philodryas nattereri* habitante natural del nordeste de Brasil. Por último, el tercer clado formado por las 5 muestras restantes representaría una especie hermana del *Hepatozoon* sp. obtenido de *H. mabouia* de Brasil. Cabe destacar que, existe un trabajo realizado por Carini (1910) que describe morfológicamente un *Hepatozoon* encontrado en los eritrocitos de *P. patagoniensis* (ex. *P. schottii*). En dicho trabajo, esta especie es denominada como *Hepatozoon philodryasi*. Esta especie es morfológicamente diferente a las otras dos especies de *Hepatozoon* antes mencionadas. Lamentablemente, a la fecha, no existen secuencias registradas en el GenBank para *H. philodryasi*. Por lo tanto, es posible que las 5 muestras del tercer clado puedan tratarse de esta especie. Aunque, al no haber sido posible realizar la identificación morfológica por frotis sanguíneos es imposible determinar si se trata de *H. philodryasi* o incluso de otra especie.

Por lo que se desprende del árbol, no existe una distribución clara de cada uno de los clados encontrados en relación a las zonas geográficas donde las *P. patagoniensis* fueron colectadas. De hecho, los 3 clados se distribuyen homogéneamente a lo largo del litoral.

El hallazgo de más de una especie de *Hepatozoon* en una misma especie de serpiente ha sido reportado en varias ocasiones, y como ejemplo podemos citar el reciente trabajo de O'Dwyer y col. (2013) quienes reportan tres especies de *Hepatozoon* estudiando únicamente cinco especímenes de *C. durissus terrificus* de Brasil.

Los resultados obtenidos mediante la utilización de biología molecular (PCR) demuestran que es una técnica muy sensible y que debería ser un complemento fundamental a la hora de realizar estudios para la determinación de especies de *Hepatozoon*, especialmente los de morfología y morfometría de gamontes.

De continuar este tipo de estudios seguramente se obtendrán nuevas evidencias de *Hepatozoon* en diferentes especies de vertebrados en nuestro país.

## CONCLUSIONES

- Se diagnostica por primera vez la presencia de *Hepatozoon* spp. en serpientes de Uruguay.
- La prevalencia de *Hepatozoon* spp. en *Philodryas patagoniensis* fue del 73.7%.
- Las especies o taxones de *Hepatozoon* obtenidos en este estudio son similares a las determinadas en serpientes y otros reptiles de países vecinos (Brasil).
- El análisis filogenético demuestra que *Hepatozoon cuestensis* y *H. musa* están presentes en *P. patagoniensis* del litoral de Uruguay y que hay evidencia de un tercer taxón relacionado a *Hepatozoon* sp. obtenido de *Hemidactylus mabouia* de Brasil.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Borges-Nojosa, D.M.; Borges-Leite, M.J.; Maia, J.P.; Zanchi-Silva, D.; da Rocha Braga, R.; Harris, D.J. (2017) A new species of Hepatozoon Miller, 1908 (Apicomplexa: Adelerina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. *Syst Parasitol*; 94(1):65-72.
- 2) Campbell, T.W. (1996) Hemoparasites. En: Mader D.R. *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia, Ed. W.B. Saunders, pp.379-381.
- 3) Carini, A. (1910) Sobre uma hemogregarina de *Philodryas schottii*. *Rev Med S Paulo*; 23:339-340.
- 4) Carreira, S.; Meneghel, M.; Achaval, F. (2005) *Reptiles del Uruguay*. Montevideo, Ed. DI.R.A.C., Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 639 p.
- 5) Carreira, S.; Maneyro, R. (2013) *Guía de Reptiles del Uruguay*. Montevideo, Ed. Ediciones de la Fuga, 285 p.
- 6) Carvalho, L.; Sosa, N.; Menoni, A.; Armúa, M.T.; Félix, M.L.; Venzal, J.M. (2015) Diagnóstico molecular de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) en carnívoros domésticos y silvestres de Uruguay. Resúmenes 9<sup>as</sup> Jornadas Técnicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, pp 162-163.
- 7) de Lema, T. (2002) *Os Répteis Do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografía – ofidismo*. Porto Alegre, Ed. EDIPUCRS, 264 p.
- 8) de Souza-Filho, G.A.; Plombon, L.L. (2014) Rediscovery and geographic distribution of *Philodryas agassizii* (Jan, 1863) (Squamata: Dipsadidae) in the state of Paraná, Southern Brazil. *Biotemas*; 27(1):155-158.
- 9) Guindon, S.; Lethiec, F.; Duroux, P.; Gascuel, O. (2005) PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res*; 33(2):W557-W559.
- 10) Haklová, B.; Majláthová, V.; Majláth, I.; Harris, D.J.; Petrilla, V.; Litschka-Koen, T.; Oros, M.; Peťko, B. (2014) Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* blood parasites found in snakes from Africa, America and Asia. *Parasitology*; 141(3):389-398.

- 11) Harris, D.J.; Maia, J.P.; Perera, A. (2011) Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *J Parasitol*; 97(1):106-110.
- 12) Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*; msw054.
- 13) Martino, P.; Cuns, M.C.; Bentancor, L.; Borgno, S. (2015) Diagnóstico de Hepatozoonosis en un canino en Montevideo. Resúmenes 9<sup>as</sup> Jornadas Técnicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, pp 160-161.
- 14) Meneghel, M. (2008) Práctico 12: REPTILIA. Curso de biología animal. Facultad de Ciencias, UdelaR. Disponible en: <http://zoologia.fcien.edu.uy/practico/05%20Reptiles%20REPARTIDO.pdf>  
Fecha de consulta: 6 de febrero de 2017.
- 15) Moço, T.C.; O'dwyer, L.H.; Vilela, F.C.; Barrella, T.H.; Silva, R.J. (2002) Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 97(8):1169-1176.
- 16) Moço, T.C. (2008) Prevalência de *Hepatozoon* spp. em serpentes e caracterização morfológica, morfométrica e molecular de *Hepatozoon* spp.(Apicomplexa, Hepatozoidae) de *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae) naturalmente infectadas. Tesis de Maestría, Programa de PósGraduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 91 p.
- 17) Morrison, D.A. (2009) Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitol*; 25(8):375-382.
- 18) 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. *Arq Bras Med Vet Zootec*; 55(3):309-314.
- 19) O'Dwyer, L.H.; Moço, T.C.; dos Santos Paduan; K., Spenassatto, C.; da Silva, R.J.; Ribolla, P.E.M. (2013) Description of three new species of

- Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Exp Parasitol*; 135(2):200-207.
- 20) Peichoto, M.E.; Teibler, P.; Guaimás Moya, L.; Leiva, L.; Acosta, O. (2005) Daños pulmonar y renal causado por el veneno de *Philodryas patagoniensis* en ratas. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. UNNE, Corrientes, Argentina. Resumen: E-051. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/8-Exactas/E051.pdf>  
Fecha de consulta: 6 de febrero de 2017.
- 21) Perkins, S.L.; Keller, A.K. (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *J Parasitol*; 87:870-876.
- 22) Pessoa, S.B.; De Biasi, P.É.; Puerto, G. (1973) Nota taxonômica sobre cistos esporogônicos de algumas espécies de *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. *Mem Inst Butantan*; 37:299-307.
- 23) Pessoa, S.B.; De Biasi, P.; Puerto, G. (1974) Nota sobre a frecuencia de hemoparasitas em serpentes do Brasil. *Mem Inst Butantan*; 38:69-118.
- 24) Pontes, G.M.F. (2007) História natural de *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae) no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil. Tesis de Doctorado, Programa de Pós-Graduação em Biociências – Zoologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 83 p.
- 25) Smith, T.G. (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J Parasitol*; 82:565-585.
- 26) Smith, T.G.; Kim, B.; Desser, S.S. (1999) Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs, and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. *Int J Parasitol*; 29:293-304.
- 27) Sloboda, M.; Kamler, M.; Bulantová, J.; Votýpka, J.; Modrý, D. (2007) A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python*

- regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *J Parasitol*; 93(5):1189-1198.
- 28) Spolidorio, M.G.; Labruna, M.B.; Zago, A.M.; Donatele, D.M.; Caliarì, K.M.; Yoshinari, N.H. (2009) *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Vet Parasitol*; 163:357-361.
- 29) Telford, Jr. S.R.; Ernst, J.A.; Clarck, A.M.; Butler, J.F. (2004) *Hepatozoon sauritus*: A polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome analysis. *J Parasitol*; 90(2):352-358.
- 30) Ujvari, B.; Madsen, T.; Olsson, M. (2004) High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. *J Parasitol*; 90:670-672.
- 31) Whelan, S.; Liò, P.; Goldman, N. (2001) Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends Genet*; 17(5):262-272.
- 32) Wozniak, E.J.; Telford Jr, S.R.; McLaughlin, G.L. (1994) Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventative zoological medicine. *J Zoo Wild Med*; 23(4):538-547.
- 33) Wozniak, E.J.; Kazacos, K.R.; Telford, S.R.; McLaughlin, G.L. (1996) Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *Int J Parasitol*; 26(2):141-146.
- 34) Zaher, H.; Graziotin, F.G.; Cadle, J.E.; Murphy, R.W.; de Moura-Leite, J.C.; Bonatto, S.L. (2009) Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: a revised classification and descriptions of new taxa. *Pap Avulsos Zool*; 49(11):115-153.