



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPROTOZOÁRIOS EM LAGARTOS NO
CERRADO BRASILEIRO**

IZABELLE THAYNÁ SOARES CARVALHO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA – DF
SETEMBRO DE 2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPROTOZOÁRIOS EM LAGARTOS
NO CERRADO BRASILEIRO

ALUNA: IZABELLE THAYNÁ SOARES CARVALHO
ORIENTADORA: PROF.DRA.GIANE REGINA PALUDO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO 258D/22

BRASÍLIA – DF
SETEMBRO – 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPROTOZOÁRIOS EM LAGARTOS NO
CERRADO BRASILEIRO

IZABELLE THAYNÁ SOARES CARVALHO

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADA POR:

DRA. GIANE REGINA PALUDO, Universidade de Brasília

DR. MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO, Universidade de Brasília

DR. RICHARD DE CAMPOS PACHECO, Universidade Federal de Mato
Grosso

DRA. HELCILEIA DIAS SANTOS, Universidade Federal do Norte do
Tocantins

BRASÍLIA-DF, 30 de setembro de 2022

Carvalho, I. T.S. **Estudo da Infecção por Hemoprotozoários em lagartos no Cerrado Brasileiro**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 94 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pela autora à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora e sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

CARVALHO, Izabelle Thayná Soares. **Estudo da Infecção por Hemoprotozoários em lagartos no Cerrado Brasileiro**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2022, 94 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Carmem Lúcia e Francisco de Assis, pelo amor e apoio incondicional durante todos os momentos e escolhas que fiz e por todos os ensinamentos éticos da vida dentro de uma sociedade. A minha irmã Tereza Francesca e cunhado Marcelo Grangeiro, pela irmandade e estímulo de sempre. Família é a base que nos sustenta.

Aos meus avós (in memoriam) por todo amor, colo e pela vibração nas pequenas ou grandes conquistas, sei que continuam a olhar por nós, provando que para o amor não existem barreiras.

A minha orientadora Profa. Giane Regina Paludo, pela confiança em mim depositada, por todos os ensinamentos, orientação e pela acolhida desde a época do estágio final, passando pela residência e atualmente no doutorado, o que possibilitou o meu crescimento científico e profissional. Sou imensamente grata!

Aos meus amigos, George, Ana Paula, Thaís Fernandes, Thaís Sermoud, Matheus, Marcela, Luma e a toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica da UnB, que foi minha segunda casa durante esses anos, pelo acolhimento e aprendizado diário que pude adquirir com cada um.

A minha amiga e parceira de pesquisa, Adriana, pela incrível jornada de descoberta que pudemos vivenciar durante a trajetória do estudo e dias de campo.

Ao Prof. Guarino Colli e toda a equipe do Laboratório de Herpetologia da UnB, por todo ensinamento e colaboração que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa e por me apresentarem a diversa e rica herpetofauna do Cerrado.

Aos queridos Rafael Dias, Juliana, Rosane, Ana Mércia, Cecília, Teresa Luisa, André, Eduardo e Karine, pelo amor, apoio, carinho e parceria. Segurando minha mão sempre que precisei.

À querida Universidade de Brasília e a todos os seus professores, funcionários e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de apoio financeiro e de incentivo à pesquisa.

A todos os meus familiares e amigos que conquistei ao longo da vida, o meu eterno agradecimento. Cada um em sua particularidade faz parte dessa trajetória.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Gerais.....	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Bioma Cerrado.....	18
3.2 Hemoparasitos em Répteis	19
3.3 Hemosporídeos	20
3.4 Hemogregarinas.....	25
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2	35
1. Introdução.....	37
2. Materiais e Métodos	38
2.1 Captura dos animais e locais de amostragem	38
2.2 Análise Microscópica	39
2.3 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	40
2.4 Purificação dos produtos das PCRs, sequenciamento e análise molecular	42
3. Resultados.....	44
4. Discussão	56
5. Conclusão	61
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 3	67
1. Introdução.....	68
2. Material e Métodos.....	69
2.1 Captura dos animais e locais de amostragem	69
2.2 Análise Microscópica	70

2.3 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	70
2.4 Purificação de produtos das PCRs, sequenciamento e análise genética...	71
3. Resultados e Discussão.....	72
4. Conclusão	85
REFERÊNCIAS	86
CAPÍTULO 4	90
Considerações finais	90
CAPÍTULO 5	91
Perspectivas futuras	91
ANEXO	92

RESUMO

O Cerrado apresenta-se como a maior savana do mundo em biodiversidade, com uma herpetofauna abundante e rica em endemismo, porém carente de informações sobre microorganismos que parasitam sua fauna. O filo Apicomplexa, alberga as principais famílias de hemoparasitos que realizam infecção em répteis, dentre elas destacam-se os grupos das hemogregarinas e dos hemosporídeos. Com o objetivo de determinar a ocorrência de hemoprotozoários em lagartos de vida livre do Cerrado brasileiro, por meio da abordagem taxonômica integrativa, o presente estudo analisou por meio microscópico e análise molecular amostras de sangue de 302 lagartos oriundos do Distrito Federal e dos estados Piauí e Mato Grosso. O DNA extraído das amostras de sangue foi submetido à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) buscando amplificar um fragmento dos genes 18S rRNA e citochrome b para detecção de parasitos pertencentes às hemogregarinas e hemosporídeos, respectivamente. Foram identificadas 27 amostras positivas na PCR com 8 lâminas positivas na microscopia óptica para hemogregarinas e 61 amostras foram positivas na PCR, incluindo 18 com resultado concordante na microscopia para o grupo dos hemosporídeos. No total, 22 amostras foram sequenciadas, incluindo 6 amostras de hemogregarinas e 16 de hemosporídeos. As análises moleculares e filogenéticas demonstraram a detecção de pelo menos uma nova espécie de *Hepatozoon* sp. infectando *Tropidurus semitaeniatus*, com o primeiro relato nessa espécie. Novos isolados de *Hepatozoon ameivae* em *Ameiva ameiva* e a obtenção da primeira rede de haplótipos entre sequências de *Hepatozoon* spp. de roedores e répteis, apontam a possibilidade de fluxo gênico entre populações de diferentes unidades federativas e validam a existência de diferenciação genética entre essas ordens. Para o gênero *Plasmodium* foi observada uma notável diversidade de espécies infectando lagartos do Cerrado, com a identificação de novos isolados de *Plasmodium ouropretensis*, *Plasmodium tropiduri tropiduri*, *Plasmodium Kentropyxi*, *Plasmodium carmelinoi* e *Plasmodium azurophilum* com presença de marcada diversidade interespecífica também observada para algumas espécies. Inclui-se neste estudo a descrição de uma nova espécie de *Plasmodium* sp. a partir de uma análise robusta abrangendo seis isolados e duas espécies hospedeiras. Este estudo é o primeiro e o mais extenso levantamento de hemoprotozoários em lagartos realizado no bioma Cerrado. O trabalho documenta parte da diversidade de parasitos da região, novos dados sobre espécies, distribuição geográfica, fluxo gênico e hospedeiros, trazendo importantes contribuições para a sociedade científica e fomento para estudos futuros, no intuito de elucidar lacunas existentes e melhor entendimento deste bioma.

Palavras-chave: Cerrado, hemoparasitos, répteis, taxonomia integrativa.

ABSTRACT

The Cerrado presents itself as the largest savanna in the world in terms of biodiversity, with an abundant herpetofauna and rich in endemism, but with careful information on microorganisms that parasitize its fauna. The Apicomplexa phylum is home to the main hemoparasites that participate in reptiles, among them the hemogregarines and hemosporidia groups. With the objective of determining the occurrence of hemoprotozoa in free-living lizards of the Brazilian Cerrado, through an integrative taxonomic approach, the present study by means of microscopic and molecular analysis of samples of 302 lizards or bloodsuckers from the Federal District and the states Piauí and Mato Grosso do Sul. DNA extracted from blood samples was selected by Polymerase Chain Reaction (PCR) seeking to amplify one of the 18S genes and cytochrome b for parasite detection. We identified 27 positive proposals in the PCR with 8 positive optical slides in the blood microscopy and 61 positive proposals in the PCR, including 18 with a concordant result in the microscopy for the group of hemosporidia. In total, 22 samples were sequenced, including 6 samples of hemogregarines and 16 of hemosporidia. New molecular and phylogenetic research detecting at least one species of *Hepatozoon* sp. infecting *Tropidurus semitaeniatus*, with the first report in this species. New isolates of *Hepatozoon Ameivae* in *Ameiva Ameiva* and the reserve of the first haplotype network between sequences of *Hepatozoon* spp. of reptile rodents, point to a possibility of flow between different federative units and validate the existence of genetics between these orders. For the genus *Plasmodium*, a remarkable diversity of infecting Cerrado lizards was observed, with the identification of new isolates of *Plasmodium ouropretensis*, *Plasmodium tropiduri tropiduri*, *Plasmodium Kentropyxi*, *Plasmodium carmelinoi* and *Plasmodium azurophilum* with the presence of some marked interspecific diversity also observed for the species. Included in this study is the description of a new species of *Plasmodium* sp. from a robust analysis covering six isolates and two host species. This study is the first and most extensive survey of hemoprotozoa in lizards carried out in the Cerrado biome. The work documents part of the diversity of parasites in the region, on species, geographic distribution, genetics and hosts, contributing important data to the scientific society and flow for new future studies, in order to elucidate these existing gaps and understanding of the biome.

Keywords: Cerrado, Hemoparasites, integrative taxonomy, reptiles.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Ciclo biológico geral da ordem Haemosporida no hospedeiro vertebrado e invertebrado: 1 - esporozoítos em células endoteliais; 2, 3 - merontes exo-eritrocíticos primários; 4 - merozoítos em células endoteliais; 5, 6 - crescimento e megalomerontes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 - gametócitos maduros; 9 - merozoítos na célula retículo endotelial no baço; 10, 11 - crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 - merozoítos em eritrócitos; 13 - gametócitos maduros; 14 - macrogameta; 15 - exflagelação de microgametas; 16 - fertilização do macrogameta; 17 - oocineto penetrando na membrana peritrófica; 18 - oocisto jovem; 19, 20 - esporogonia; 21 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. (VALKIŪNAS, 2005)..... 23

Capítulo 2

Figura 1. Representação do gene 18S rRNA completo e as regiões de anelamento de cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados neste estudo para formação da sequência consenso. Ham1- Hpf2 (cor azul), Hemo1 – Hemo2 (cor vermelha), Hep300 – Hep900 (cor verde) e Hep-1mod – Hep4 (cor laranja). 41

Figura 2. Gametócitos de *Hepatozoon ameivae* em esfregaços sanguíneos de lagartos *Ameiva ameiva* do Cerrado, Brasil..... 46

Figura 3. Gametócitos de *Hepatozoon* sp. em esfregaço sanguíneo de lagarto *Tropidurus semitaeniatus*, Piauí, Brasil. (Isolado L173)..... 46

Figura 4. Gametócitos de *Hepatozoon* sp. em esfregaços sanguíneos de lagartos *Tropidurus semitaeniatus*, Piauí, Brasil. Isolados L174 (A e B), L175 (C e D) e L113 (E e F)..... 47

Figura 5. Árvore filogenética obtida por análise bayesiana de fragmentos parciais do gene rRNA 18S (536 nt) de 87 isolados de *Hepatozoon*. Probabilidades posteriores iguais a 0,90 ou mais são representadas por asteriscos. As sequências obtidas no presente estudo se encontram destacadas em vermelho. 50

Figura 6. Rede de haplótipos de isolados de *Hepatozoon* brasileiros com base nas unidades federativas onde foram coletados. 53

Figura 7. Rede de haplótipos de isolados de *Hepatozoon* brasileiros com base em três grupos de hospedeiros (lagartos, serpentes e roedores)..... 54

Figura 8. Análise bayesiana da estrutura populacional de isolados de *Hepatozoon* obtidos de lagartos, serpentes e roedores no Brasil com base no gene rRNA 18S. A análise indica quatro grupos genéticos distribuídos pelo país. 55

Capítulo 3

Figura. 1 Árvore filogenética obtida por análise bayesiana de fragmentos parciais do gene *cytb* (452 nt) de 48 isolados de *Plasmodium*. Probabilidades posteriores iguais a 0,90 ou mais são representadas por asteriscos. As sequências obtidas no presente estudo se encontram destacadas com círculos coloridos de acordo com a espécie hospedeira identificada. 81

Figura. 2 Parasitos hemosporídeos identificados nas amostras L180 (2A) e L181 (2B)..... 83

Anexos

Anexo 1. Parasitos hemosporídeos identificados em lagartos do Cerrado brasileiro. (A) Trofozoítos. (B) Meronte eritrocítico. (C e D) Gametócitos maduros. .. 92

Anexo 2. Parasitos hemprotozoários encontrados em lagartos de Cerrado brasileiro. (A) *Trypanosoma* spp. infecção em *Hoplocercus spinosus*. (B) Gametócito de *Hepatozoon* sp., infecção em *Tropidurus semitaeniatus*. 93

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	41
Tabela 2. Relação das espécies de lagartos coletados e positivos para Hemogregarinas na triagem molecular (PCR) de acordo com a região amostrada e sexo.	44
Tabela 3. Número de animais positivos para <i>Hepatozoon</i> na triagem molecular, segundo a espécie e local de captura.	45
Tabela 4. Número de espécies de lagartos positivas para <i>Hepatozoon</i> spp. por microscopia óptica e testes moleculares (PCR).....	46
Tabela 5. Valores de identidade apresentados através da análise BLASTn dos isolados testados.	48
Tabela 6. Matriz de distância genética p. Somente as sequências mais próximas filogeneticamente dos isolados obtidos no presente estudo e com no mínimo 1.250 nt foram incluídas.	49
Tabela 7. Índices de diversidade genética. Análise obtida com isolados de <i>Hepatozoon</i> obtidos de lagartos, serpentes e roedores no Brasil com base no gene 18S rRNA.	55
Tabela 8. Resultados do teste AMOVA com isolados de <i>Hepatozoon</i> brasileiros com base no gene 18S rRNA. Três populações foram consideradas com base no hospedeiro (lagartos, serpentes e roedores).	55

Capítulo 2

Tabela. 1 Relação das amostras por espécies de lagartos positivas para hemosporídeos na análise molecular (PCR) e microscópica, de acordo com a região de colheita e sexo.	73
Tabela. 2 Espécies e número de animais testados na triagem molecular através dos oligonucleotídeos cytb 3760F e 4292R (533pb).	74
Tabela. 3 Valores de identidade apresentados através da análise BLASTn dos isolados testados (E-value = 0.0).	82
Tabela. 4 - Matriz de distância genética p.	84

Material Suplementar

Tabela Suplementar 1. Relação de espécies amostradas neste estudo de acordo com a região de coleta e sexo.	94
--	----

“Escondido tu estás, no verde das florestas, nas aves em festa, no sol a brilhar, na sombra que abriga, a brisa amiga, na fonte que corre, ligeira a cantar...”

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o bioma brasileiro considerado como a maior savana do mundo em biodiversidade, perdendo em extensão apenas para a Amazônia. Esta região foi por muitos anos considerada pobre em riqueza faunística, em função de grandes parcelas de sua área serem pouco estudadas. O crescimento significativo de estudos nesta região, demonstraram abundância em sua diversidade de répteis, com uma riqueza de endemismo alcançando 45% para essas espécies (Colli et al., 2002; Nogueira et al., 2010; Nogueira et al., 2011; Colli et al., 2020). Contudo, o desmatamento provocado pela crescente expansão agrícola da região e ações antrópicas como queimadas, ameaçam a diversidade de sua flora e fauna, tornando o Cerrado um hotspot de biodiversidade global, sendo iminente ações de conservação de suas áreas e espécies (Norman, 2003; Colli et al., 2020).

Os hemoparasitos predominantes em répteis estão relacionados, principalmente ao filo Apicomplexa, podendo se apresentar apenas como um achado acidental na rotina laboratorial, sem alteração clínica do animal, bem como, são capazes de apresentar com grande potencial patogênico. Este último está relacionado a espécie do agente envolvido e fatores predisponentes, como impactos ambientais provocados de forma natural ou antrópica, coinfeções, estresse e condições de cativeiro, que podem atenuar direta e/ou indiretamente a suscetibilidade desses animais para o surgimento ou agravamento de doenças que geralmente ocorrem de forma assintomática (Telford Jr, 1984; O'dwyer et al., 2003; Jacobson, 2007; Campbell, 2015). Para as espécies mais comumente encontradas em reptilianos, destacam-se os grupos dos hemosporídeos, seguidos por hemogregarinas (Campbell, 2015; Picelli et al., 2020a). Muitas espécies desses grupos possuem grande interesse científico por causarem doenças importantes em humanos e animais, como a malária.

A escassez de estudos sobre hemoparasitos em lagartos no Brasil e no mundo, mesmo nos dias atuais, é realmente surpreendente (Maia et al. 2016; Ferreira et al., 2020; Picelli et al., 2020a; Picelli et al., 2020b). No Cerrado, os poucos estudos que contemplam a região, são bastante pontuais e muitos apresentam apenas dados morfológicos. A maior parte das informações de classificação de espécies obtidas até o presente são baseadas apenas em elementos morfológicos. Esses dados são fundamentais ainda na atualidade,

mas a utilização restrita dessas informações, geram classificações taxonômicas conflitantes (Pineda-Catalan et al., 2013; Van As et al., 2016).

A instituição da biologia molecular na ciência, trouxe a oportunidade de novas descobertas e o preenchimento de muitas lacunas ainda incertas. Sua utilização em conjunto com informações morfológicas, filogenéticas e ecológicas trazem elementos substanciais para o esclarecimento de suas classificações, possivelmente subestimadas, tendo a taxonomia integrativa, papel relevante na elucidação da história evolutiva desses agentes (Maia et al., 2016; González et al., 2019).

Este estudo é o primeiro e o mais extenso levantamento de hemoprotozoários em lagartos realizado no bioma Cerrado brasileiro. Por meio da utilização da taxonomia integrativa, o trabalho documenta parte da diversidade de parasitos da região, novos dados sobre hospedeiros e impactos ecológicos, gerando inclinações de suscetibilidade ao parasitismo. Assim, nosso estudo traz importantes contribuições sobre biodiversidade de parasitos e hospedeiros para a sociedade científica de modo que sirva de incentivo para estudos futuros, principalmente voltados para vetores e ciclos de vida para melhor entendimento deste bioma.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Determinar a ocorrência de hemoprotozoários em lagartos de vida livre do Cerrado brasileiro, por meio da abordagem taxonômica integrativa.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar molecularmente os principais hemoprotozoários dos grupos hemosporídeos e hemogregarinas de lagartos do bioma Cerrado;
- Identificar por meio da microscopia óptica amostras positivas para hemoparasitos, com posterior análise morfológica dos agentes detectados;
- Unir dados moleculares e morfológicos, direcionados a determinação de espécies com base na taxonomia integrativa.
- Comparar as sequências obtidas com dados de hemoprotozoários já depositados no GenBank, possibilitando a expansão de informações sobre as relações filogenéticas entre esses agentes em hospedeiros brasileiros da ordem Squamata e sua distribuição geográfica conhecida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bioma Cerrado

O Brasil em sua vasta expansão e ecossistemas tem seu território ocupado por seis tipos de biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa e Pantanal. O bioma Cerrado possui uma paisagem altamente heterogênea, com um mosaico fisionômico que varia de campos gramados sem árvores a matas de galeria relativamente densas, com predominância de fisionomias de vegetação aberta. Apresenta acentuada sazonalidade, com períodos bem definidos de seca e chuva, sendo essa sua forte característica. Perde em extensão apenas para as florestas amazônicas quando relacionadas aos biomas da América do Sul (Colli et al., 2002; Colli et al., 2020).

A herpetofauna do Cerrado foi por muitos anos considerada pobre em riqueza faunística e em número de espécies endêmicas (Colli et al., 2002; Nogueira et al., 2010; Ledo, 2010). Essa teoria inicial estava intimamente associada a pequenas localidades estudadas e dentro dessas, uma amostragem insuficiente de animais coletados, com grandes parcelas do Cerrado ainda inventariadas, contrastando com resultados obtidos nas faunas da Caatinga e Amazônia (Colli et al., 2002; Nogueira et al., 2010).

Novos estudos foram implementados, obtendo principalmente nos últimos anos, um crescimento exponencial em quantidade e qualidade de dados sobre diversidade de répteis no Cerrado (Nogueira et al., 2010; Colli et al., 2020). Esses estudos demonstram que o bioma foi por muito tempo mal amostrado e que na realidade, ele apresenta grande riqueza e endemismo de anfíbios e répteis, comparável à riqueza da Amazônia. Os níveis de endemismo alcançam 45 % em lagartos, sendo 74 espécies atualmente conhecidas e 33 endêmicas (Ribeiro, 2011; Nogueira et al., 2011).

O alto grau de espécies endêmicas no grupo dos répteis Squamata conseguem ultrapassar a soma de endemismos de aves e mamíferos, estes dois últimos grupos citados, são apontados como os grupos taxonômicos mais bem estudados na fauna do Cerrado (Nogueira et al., 2010). O grupo de reptilianos endêmicos, também são os mais ameaçados de extinção. Essa conclusão está intimamente relacionada a perda de habitat dessas espécies, em decorrência da rápida expansão da agricultura e da pecuária e a intensa colheita florestal local, associada a falta de locais alternativos para a sobrevivência destas espécies (Nogueira et al., 2010; Colli et al., 2020; Nogueira et al., 2011).

A elevada riqueza natural e biodiversidade do Cerrado, atuando como lar para inúmeras espécies endêmicas e sob constante ameaça da expansão agrícola, torna-o um *hotspot* de biodiversidade global (Norman, 2003; Colli et al., 2020). Estes fatos demonstram a urgência da necessidade de implementação de ações de conservação para a região do Cerrado e suas espécies em vulnerabilidade.

A crescente marcha para a compreensão da situação atual da herpetofauna no Cerrado, gerou um acúmulo de inventários com a contribuição de novos dados tocante a distribuição e taxonomia. No entanto, ainda existem grandes localidades do Cerrado que se apresentam sem amostragem adequada para vertebrados, incluindo-se o grupo Squamata (Silva & Bates, 2002). Observa-se uma falta de homogeneidade na distribuição de áreas amostradas para répteis no Cerrado, com uma concentração maior de inventários nas regiões sul-sudeste da extensão do bioma (Nogueira et al., 2010).

3.2 Hemoparasitos em Répteis

Os répteis, assim como os anfíbios, pertencem coletivamente a herpetofauna, um grupo extremamente variado de animais com características anatômicas e fisiológicas diferentes (Colville, 2011), onde o Brasil ocupa posição de destaque mundial quanto à essa diversidade (Ribeiro, 2011). Destacam-se entre essas variações, suas hemácias, distintas dos mamíferos em sua forma e tamanho, bem como a presença de núcleo. Os eritrócitos maduros são maiores do que de aves e mamíferos, com formato oval e margens nucleares irregulares. Os imaturos se apresentam com um tamanho reduzido, arredondados, citoplasma mais basofílico e cromatina menos densa (Thrall, 2007; Colville, 2011).

O estudo voltado ao conhecimento de parasitos é relevante não apenas para a compreensão de sua diversidade biológica, mas também para investigar respostas para questões mais complexas relacionadas à especificidade do hospedeiro e coevolução (Maia et al., 2012). A maioria dos estudos seguem a tendência na concentração de pesquisas para parasitos considerados de grande importância veterinária, médica e saúde pública. Dessa forma, o maior número de dados obtidos no meio científico está relacionado a parasitos que atingem os animais domésticos e o homem (Maia et al., 2012; González et al., 2019). Referências para animais selvagens, incluindo os répteis, ainda são escassas e pouco se sabe sobre o potencial patogênico desses agentes (Maia et al., 2012; Matta et al., 2018; Úngari et al., 2018a; Úngari et al., 2018b; González et al., 2019; Picelli et al., 2020b; Ferreira et al., 2020; Úngari et al., 2021; Úngari et al., 2022).

A presença de hemoparasitos é um achado comum em répteis, sua detecção é frequentemente observada de forma acidental e sem relação com patologias. Contudo, alguns hemoparasitos possuem um grande potencial de causar doenças, levando na maioria dos casos, ao desenvolvimento de anemias hemolíticas. Alguns fatores predisponentes, como estresse, erros de manejo, condições de cativeiro e a presença de outros patógenos podem eventualmente aumentar seu potencial patogênico (O'dwyer et al., 2003; Jacobson, 2007; Campbell, 2015).

Os répteis de vida livre do Cerrado estão sujeitos a impactos ecológicos, sejam eles consequentes de atividades antrópicas ou até mesmo naturais. Esses efeitos, levam a uma perturbação ambiental, gerando uma queda significativa em abundância dessas espécies (Fiedler et al., 2004; Brandão; Araújo, 2008; Ribeiro, 2011) e possivelmente deixando-os susceptíveis ao surgimento ou agravamento de enfermidades antes presente de forma assintomática, como na maioria dos casos de infecções por hemoprotozoários.

Parasitos unicelulares pertencentes ao reino Protista, sub-reino Protozoa, os hemoprotozoários são organismos que possuem um ciclo de vida elaborado, alternam seu desenvolvimento infectando células sanguíneas e tecidos dos hospedeiros vertebrados, como também o intestino e tecidos de uma gama de vetores invertebrados hematófagos (O'Donoghue, 2017). O filo Apicomplexa, alberga as principais famílias de hemoparasitos que realizam infecção em répteis, em que geralmente são necessários vetores invertebrados para a sua transmissão, como artrópodes e anelídeos (Telford Jr, 1984; Fortes, 2004). Os hemoprotozoários já listados na classe reptilia incluem as hemogregarinas, os *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Saurocytozoon*, *Haemoproteus* e *Schellakia*, listados assim em ordem de frequência (Campbell, 2015).

Segundo Pineda-Catalan et al. 2013, a descoberta e identificação de espécies de parasitos é urgente, diante do seu potencial de causar zoonoses, especialmente em espécies ameaçadas de extinção e animais selvagens que apresentam um declínio rápido em ecossistemas altamente perturbados. Em recente estudo sobre biodiversidade e conservação do Cerrado, Colli et al. (2020), abordam a persistência de alguns antigos desafios para esse bioma, como a escassa ocorrência de áreas protegidas no Cerrado e a escassez de estudos envolvendo micro-organismos, fungos e invertebrados. Evidenciando anseio por mais informações sobre parasitos, em especial no bioma Cerrado.

3.3 Hemosporídeos

A ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885) é compreendida por quatro famílias: Garniidae, Haemoproteidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae (Valkiūnas, 2005; Maia et

al., 2016). Características do Filo Apicomplexa são observadas, apresentando-se como parasitos intracelulares obrigatórios, unicelulares, eucarióticos, sem organelas locomotoras e com um complexo apical, cuja função é a penetração na célula hospedeira. Esses hematozoários possuem distribuição cosmopolita, tendo sido descritos em todos os continentes, exceto Antártida, e, embora sejam frequentemente relatados em aves, também parasitam mamíferos, répteis e anfíbios, (Kreier, 1993; Valkiunas, 2005; Sehgal, 2010; Matoso, 2017). Nos répteis, possuem relatos de infecção em lagartos, quelônios e serpentes (Thrall, 2007). No entanto, as espécies mais frequentemente descritas nessa ordem pertencem às famílias Haemoproteidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae (Valkiūnas, 2005; Maia et al., 2016).

O ciclo de vida dos hemosporídeos é heteroxeno e complexo (Figura 1). Até os dias atuais, o ciclo mais bem estudado em animais é oriundo de hospedeiros aviários e seus vetores dípteros. De forma geral o ciclo possui dois tipos de hospedeiros, os hospedeiros intermediários (vertebrados), onde ocorre a fase assexuada e os hospedeiros definitivos (Insecta: Diptera), ocorrendo a formação sexual de esporozoítos. Durante o repasto sanguíneo, os vetores inoculam os esporozoítos nos hospedeiros vertebrados, onde iniciam-se os estágios agâmicos, realizando divisão assexuada nos tecidos (merogonia) dos animais infectados, com a obtenção de merontes exoeritrocíticos. Esses merontes são constituídos por uma gama de merozoítos unicelulares. Com o rompimento dos merontes, os merozoítos se distribuem pelo organismo animal, esses podem gerar o desenvolvimento de novos merontes teciduais e/ou induzir o desenvolvimento de estágios sexuais nas células sanguíneas (gametócitos). Os gametócitos possuem potencial sexual, pois realizam a produção dos gametas e são divididos em dois tipos, os macrogametócitos, que produzem os macrogametas e os microgametócitos, produzindo os microgametas. Sendo os gametócitos a fase infectante para os hospedeiros invertebrados (vetores) (Valkiūnas, 2005). Nos répteis pouco se sabe sobre ciclos evolutivos e seus possíveis vetores.

Em aves são observadas geralmente cinco fases de infecção: Pré-patente – com a invasão do agente no organismo e sua divisão tecidual. Aguda – se caracteriza pelo aparecimento dos parasitos no sangue e um aumento acentuado nas parasitemias. Crítica – quando é alcançado o pico de parasitemia. Crônica e Latente – observa-se uma diminuição drástica da parasitemia com posterior eliminação dos parasitos pela resposta imune do hospedeiro. As aves se tornam persistentemente infectadas, mantendo os parasitos por muitos anos ou até por toda a vida, servindo como fonte de infecção para os vetores. Podem ocorrer recidivas de parasitemia principalmente no período de reprodução

dos hospedeiros vertebrados, facilitando e aumentando as taxas de infecção de vetores e posteriormente, da população de vertebrados (Valkiūnas, 2005).

Após a realização do repasto sanguíneo do vetor em um hospedeiro infectado, os gametócitos iniciam o processo de reprodução sexuada por gametogênese. Macrogametócitos produzem macrogametas arredondados e microgametócitos sofrem exflagelação, originando oito microgametas flagelares. Extracelularmente ocorre a fertilização do macrogameta pelo microgameta flagelar, originando o zigoto, este, diferencia-se em oocineto, uma forma móvel e alongada, que atravessa a membrana peritrófica e a camada epitelial do intestino médio, alojando-se na lâmina basal, onde se arredonda e desenvolve-se em oocisto no processo de esporogonia. Após a maturação do oocisto, os esporozoítos movimentam-se para a hemocele, penetrando posteriormente nas glândulas salivares do vetor. Os esporozoítos são a forma infectante para os hospedeiros vertebrados. Sendo estes, injetados pelo vetor, através da secreção das glândulas salivares durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. Existem ainda, particularidades entre e interespecies como, a ausência de merontes eritrocíticos na família Haemoproteidae, divisão da merogonia exoeritrocítica em primária e secundárias na família Plasmodidae e ausência de hemozoína em qualquer fase de desenvolvimento da família Garniidae (Lainson, Landau e Shaw, 1971; Valkiūnas, 2005).

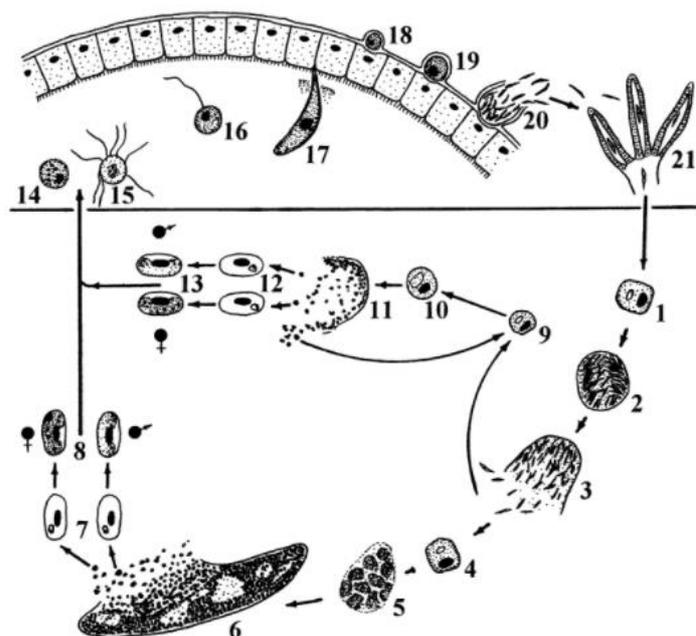


Figura 1. Ciclo biológico geral da ordem Haemosporida no hospedeiro vertebrado e invertebrado: 1 - esporozoítos em células endoteliais; 2, 3 - merontes exo-eritrocíticos primários; 4 - merozoítos em células endoteliais; 5, 6 - crescimento e megalomerontes maduros nos músculos esqueléticos, respectivamente; 7 - merozoítos em eritrócitos; 8 - gametócitos maduros; 9 - merozoítos na célula retículo endotelial no baço; 10, 11 - crescimento e merontes maduros no baço, respectivamente; 12 - merozoítos em eritrócitos; 13 - gametócitos maduros; 14 - macrogameta; 15 - exflagelação de microgametas; 16 - fertilização do macrogameta; 17 - oocineto penetrando na membrana peritrofica; 18 - oocisto jovem; 19, 20 - esporogonia; 21 - esporozoítos nas glândulas salivares do vetor. (Valkiūnas, 2005).

O gênero *Plasmodium* foi o primeiro a ser descrito dentro da ordem Haemosporida (Marchiafava & Celli, 1885). A família Plasmodiidae é sem dúvida o grupo mais estudado entre os membros que englobam os hemosporídeos em todo o mundo, uma vez que, podem gerar alerta epidemiológico e exercer grandes custos econômicos para a saúde animal e pública, diante de seu envolvimento como agente causador da malária, implicando em sérios problemas de saúde, podendo levar o hospedeiro a óbito (Valkiūnas, 2005; Matoso, 2017). A ameaça vai além da saúde humana uma vez que esses parasitos também são preocupantes para conservação, pois podem levar à extinção de espécies ameaçadas (Maia et al., 2016).

As primeiras espécies de *Plasmodium* Sauria foram descritas em lagartos *Agama agama* e *Trachylepis quinquetaeniata*, identificadas como *Plasmodium agamae* e *P. mabuiae*, respectivamente por Weynon (1909), na África. Em um parâmetro mundial, as

descrições desse agente permaneceram escassas até a década de 1960, onde teve um aumento significativo (Van As et al., 2016).

No início dos estudos, todas as classificações taxonômicas eram feitas principalmente com base em achados morfológicos do parasito, visualizados por microscopia óptica. As espécies eram nomeadas de acordo com novos registros de infecção, observando alterações de hospedeiros, vetores, regiões, características na história de vida, como a existência ou não da hemozoína e a presença ou ausência de merogonia. Esses critérios até hoje ainda são úteis, porém, causaram e geram até os dias atuais, muitos dados subestimados de espécies e classificações conflitantes (Pineda-Catalan et al., 2013; Van As et al., 2016; Matoso, 2017;). Essa realidade, também é encontrada na maioria dos parasitos sanguíneos do filo Apicomplexa (Van As et al., 2016).

Com advento da biologia molecular, questões de filogenia e classificação dentro da ordem Haemosporida começaram a ser esclarecidas. Os dados obtidos são de extrema relevância para compreensão de muitas lacunas, como nas espécies crípticas e/ou quando não é possível observar todos os estágios do ciclo de vida do parasito. Além disso, o uso da taxonomia integrativa, com a união de informações morfológicas, moleculares, filogenéticas e ecológicas possuem grande importância para melhoria dos parâmetros utilizados para definição de espécies, agregando melhoria ao estudo taxonômico do grupo e sua classificação, lançando uma nova luz a história evolutiva dos hemosporídeos (Perkins et al., 2014; Maia et al., 2016; Matoso, 2017; González et al., 2019).

Mesmo em casos em que são observadas pela análise morfológica duas espécies potencialmente distintas, é importante realizar a análise molecular, pois de acordo com Perkins et al. (2000), as condições de processamento das lâminas podem acabar gerando alterações na morfologia dos parasitos, independente da plasticidade potencial das características tradicionais usadas para diferenciar esses organismos. Características morfométricas do parasito também já mostraram-se variar de acordo com o hospedeiro. No entanto, estudos que utilizam apenas ferramentas moleculares acabam perdendo valiosas informações como achados falso positivos e caracteres morfológicos (González et al., 2019), evidenciando que a integração de todas essas informações produzirá resultados essenciais para descrição e classificação das espécies.

O gene mitocondrial do citocromo b (*cyt b*) é o mais amplamente utilizado para fins taxonômicos e análise da história evolutiva da ordem Haemosporida (Maia et al., 2016). As informações obtidas através de estudos comparativos entre caracteres morfológicos, genes mitocondriais e nucleares, estima que a diversidade encontrada no

cyt b é representativa a nível de diferencial em todo o genoma (Bensch et al., 2004; Hellgren et al., 2007; Maia et al., 2016).

Nos últimos anos é perceptível o grande esforço dos pesquisadores no intuito de gerar informações relacionadas a diversidade e distribuição dos hemosporídeos (Maia et al., 2016; González et al., 2019). Nota-se uma grande demanda de estudos voltados principalmente para essa diversidade, prevalência, intensidade e relações filogenéticas em hospedeiros aviários, em que já foi observado que era altamente subestimada somente pela classificação morfológica (González et al., 2019). No entanto, estudos sobre Haemosporida em répteis ainda são escassos e quando falamos de lagartos da América do Sul, esses dados são ainda menores e sua taxonomia ainda é incerta (Maia et al., 2016; Ferreira et al., 2020). Estudos baseados no gene *cyt b* propõem o ressurgimento do gênero *Haemocystidium* para espécies de *Haemoproteus* de répteis (Pineda-Catalan et al., 2013; Maia et al., 2016; González et al., 2019), evidências moleculares demonstram a existência de um grupo monofilético que corresponde ao gênero *Haemocystidium* (Pineda-Catalan et al., 2013; Maia et al., 2016; González et al., 2019); propondo ainda, a classificação subgenérica de *Haemocystidium* (Simondi) para parasitos de quelônios e *Haemocystidium* para isolados de Squamata (Pineda-Catalan et al., 2013).

É particularmente surpreendente que com todos os avanços da ciência, tenhamos em nossos bancos de dados moleculares pouco mais de 22 sequências geradas de *Plasmodium* em lagartos, onde globalmente existem mais de 100 espécies morfológicamente descritas infectando répteis (Matta et al., 2018; Ferreira et al., 2020). A escassez de dados demonstra que é urgente a utilização da taxonomia clássica associada a biologia molecular para o estudo e compreensão da malária em lagartos.

3.4 Hemogregarinas

As hemogregarinas estão incluídas dentro da estrutura taxonômica: Filo Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida, subordem Adeleina (Levine et al., 1980), constituídas por três famílias atualmente conhecidas Haemogregarinidae, Hepatozoidae e Karyolysidae, cada família é morfológicamente diferenciada de acordo com as distinções de desenvolvimento que ocorrem no hospedeiro invertebrado durante a esporogonia (Telford, 2009). Possuem ciclo de vida heteroxeno, com uma vasta quantidade de hospedeiros vertebrados (fase assexuada), que vão desde mamíferos, répteis a peixes, infectando nesses animais suas células sanguíneas.

Para vetores invertebrados (fase sexuada) a infecção ocorre na hemocele, epitélio intestinal e trato reprodutivo, que incluem sanguessugas, ácaros, carrapatos, pulgas e mosquitos, podendo ocorrer também hospedeiros paratênicos que auxiliam na disseminação do agente (Kreier, 1993), resultando em uma variedade complexa de ciclos de vida e para muitas espécies descritas, ainda pouco se sabe sobre os ciclos evolutivos, vetores ou meios de transmissão (Kreier, 1993; Desser et al., 1995).

É o caso de hospedeiros reptilianos, com poucos ciclos elucidados, e os que já foram descritos apresentam geralmente sua transmissão através da ingestão do vetor ou por predação de hospedeiros vertebrados paratênicos, como anuros, lagartos e roedores (Telford, 2009; Picelli et al., 2020b). Através da detecção de oocistos esporulados na glândula salivar de mosquitos que realizaram repasto sanguíneo em serpentes infectadas por *Hepatozoon*, Telford et al., (2008), sugerem a presença de transmissão salivar direta desse agente para serpentes, sem a presença de hospedeiros intermediários no ciclo de vida para as espécies estudadas.

As espécies de hemogregarinas foram por muitos anos erroneamente identificadas com base apenas nas características morfológicas de seus gamontes, encontrados nas células sanguíneas dos hospedeiros vertebrados (Telford, 2009). A vasta quantidade de hospedeiros vertebrados, está intimamente relacionada à similaridade morfológica de gamontes identificadas nas diferentes espécies. A presença de um novo hospedeiro muitas vezes justificou a descrição de uma nova espécie de parasito (Kreier, 1993; Desser et al., 1995). Para uma identificação unicamente morfológica aceitável, é necessário incluir dados sobre esporogonia do hospedeiro invertebrado competente, pois os gamontes encontrados nas células sanguíneas dos hospedeiros vertebrados possuem um altíssimo grau de similaridade entre todas as espécies desse grupo (Telford, 2009).

Os parasitos pertencentes ao grupo das hemogregarinas, são os hemoparasitos mais comuns e amplamente distribuídos que infectam os répteis (Telford, 2009; Maia et al., 2012), estudos experimentais no Sul da França, mostraram que seu parasitismo em lagartos pode causar danos como, diminuição da concentração de hemoglobina, queda na velocidade de locomoção e até redução da taxa de regeneração da cauda (Oppliger; Celerier e Clobert, 1996; Oppliger; Clobert, 1997).

A inclusão da biologia molecular trouxe novos horizontes para a classificação questionável dos agentes inclusos no grupo das hemogregarinas. No entanto, dados moleculares encontrados em base de dados de sequências publicamente disponíveis para as hemogregarinas são mais abundantes para mamíferos domésticos e selvagens, possuindo dados escassos para os hospedeiros reptilianos (Maia et al., 2012). Tendo como

exemplo, das cinquenta espécies de *Hepatozoon* descritas em répteis no Brasil, apenas 10% possuem dados moleculares inclusos (Picelli et al., 2020b). Dados mais espantosos são encontrados para as espécies de lagartos. Das seis espécies de *Hepatozoon* atualmente descritas: *Hepatozoon tupinambis* (Laveran e Salimbeni, 1909), *Hepatozoon missoni* (Carini, 1909), *Hepatozoon ameivae* (Carini e Rudolph, 1912), *Hepatozoon goianense* (Carini, 1941), *Hepatozoon cnemidophori* (Carini, 1941) e *Hepatozoon sinimbui* (Carini, 1942), somente *H. ameivae* apresenta dados moleculares, identificado por Picelli et al. em (2020b) na Amazônia. Outras sequências de *Hepatozoon* sp. em lagartos depositadas no banco de dados moleculares não estão identificadas a nível de espécie, como descrito em geckos (Harris et al., 2015) e em *Pogona vitticeps* (Mendoza-Roldan et al., 2021).

REFERÊNCIAS

BRANDÃO, Reuber A.; ARAÚJO, Alexandre FB. Changes in anuran species richness and abundance resulting from hydroelectric dam flooding in Central Brazil. **Biotropica**, v. 40, n. 2, p. 263-266, 2008.

BENSCH, Staffan et al. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation?. **Evolution**, v. 58, n. 7, p. 1617-1621, 2004.

CAMPBELL, T. **Exotic animal hematology and cytology**. John Wiley & Sons, 2015. ISBN 1118611160.

CARINI, A. Sobre duas hemogregarines do *Tupinambis teguixin*. **Rev Soc Scient São Paulo**, v. 4, p. 1-3, 1909.

CARINI, A.; RUDOLPH, M. Sur quelques hématozoaires de lézards au Brésil. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 5, p. 592-595, 1912.

CARINI, A. Sobre uma hemogregarina dos globulos vermelhos do lagarto *Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus*. **Arq Biol**, v. 25, p. 293-294, 1941.

CARINI, A. Sobre uma haemogregarina e um *Plasmodium da Iguana iguana*. **Arq Biol São Paulo**, v. 26, p. 6-7, 1942.

COLLI, Guarino R.; BASTOS, Rogério P.; ARAUJO, Alexandre FB. The character and dynamics of the Cerrado herpetofauna. **The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical savanna**, p. 223-241, 2002.

COLLI, Guarino R.; VIEIRA, Cecília R.; DIANESE, José Carmine. Biodiversity and conservation of the Cerrado: recent advances and old challenges. 2020.

COLVILLE, T. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. Elsevier Health Sciences, 2011. ISBN 8535254722.

DESSER, S. S.; HONG, H.; MARTIN, D. S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbiana* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. **The Journal of parasitology**, p. 212-222, 1995. ISSN 0022-3395.

FERREIRA, Francisco C. et al. Molecular and pathological investigations of *Plasmodium* parasites infecting striped forest whiptail lizards (*Kentropyx calcarata*) in Brazil. **Parasitology Research**, v. 119, n. 8, p. 2631-2640, 2020.

FIEDLER, Nilton Cezar et al. Incêndios florestais no Parque Nacional da Serra da Canastra: desafios para a conservação da biodiversidade. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, 2004.

FORTES, E. Parasitologia veterinária. In: (Ed.). **Parasitologia veterinária: ícone**, 2004.

GONZÁLEZ, Leydy P. et al. *Haemocystidium* spp., a species complex infecting ancient aquatic turtles of the family Podocnemididae: First report of these parasites in *Podocnemis vogli* from the Orinoquia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 10, p. 299-309, 2019.

HELLGREN, Olof et al. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 889-896, 2007.

HARRIS, David James; BORGES-NOJOSA, Diva Maria; MAIA, João Pedro. Prevalence and diversity of *Hepatozoon* in native and exotic geckos from Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 80-85, 2015.

JACOBSON, E. R. **Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text**. CRC Press, 2007. ISBN 1420004034.

KREIER, J. **Parasitic Protozoa, vol. 4, Gregarines, Haemogregarines, Coccidia, Plasmodia, and Haemoproteids**: Academic Press, New York, San Francisco, and London 1993.

LAINSON, R.; LANDAU, Irène; SHAW, J. J. On a new family of non-pigmented parasites in the blood of reptiles: Garniidae fam. nov.,(Coccidiida: Haemosporidiidea). Some species of the new genus *Garnia*. **International Journal for Parasitology**, v. 1, n. 3-4, p. 241-250, 1971.

LAVERAN A, Salimbeni AT (1909) Sur une hémogrégarin de *Tupinambis teguixin*. C R Acad Sci 148:132

LEDO, Roger Maia Dias. Estrutura de comunidades e biogeografia de lagartos em matas de galeria do cerrado. 2010.

LEVINE, N. et al. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980. ISSN 1550-7408.

MAIA, João PMC; PERERA, Ana; HARRIS, D. James. Molecular survey and microscopic examination of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) in lacertid lizards from the western Mediterranean. **Folia Parasitologica**, v. 59, n. 4, p. 241, 2012.

MAIA, João P.; HARRIS, D. James; CARRANZA, Salvador. Reconstruction of the evolutionary history of Haemosporida (Apicomplexa) based on the cyt b gene with characterization of *Haemocystidium* in geckos (Squamata: Gekkota) from Oman. **Parasitology International**, v. 65, n. 1, p. 5-11, 2016.

MARCHIAFAVA, Ettore; CELLI, Angelo. **Weitere Untersuchungen über die Malaria infection**. Fischer's medicinischer Buchhandlung, H. Kornfeld, 1885.

MATOSO, R. V. **Caracterização morfológica e molecular de *Haemoproteus paramultipigmentatus* (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) em aves Columbiformes na Mata Atlântica, Brasil**. 2017. Tese de Doutorado. Dissertation, Universidade Federal de Juiz de Fora.

MATTA, Nubia E. et al. *Plasmodium* parasites in reptiles from the Colombia Orinoco-Amazon basin: a re-description of *Plasmodium kentropyxi* Lainson R, Landau I, Paperna I, 2001 and *Plasmodium carmelinoi* Lainson R, Franco CM, da Matta R, 2010. **Parasitology research**, v. 117, n. 5, p. 1357-1370, 2018.

MENDOZA-ROLDAN, Jairo Alfonso et al. Molecular detection of vector-borne agents in ectoparasites and reptiles from Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 12, n. 1, p. 101585, 2021.

NORMAN, Myers. Biodiversity hotspots revisited. **BioScience**, v. 53, n. 10, p. 916-917, 2003.

NOGUEIRA, Cristiano et al. Diversidade de répteis Squamata e evolução do conhecimento faunístico no Cerrado. **Cerrado: conhecimento científico quantitativo como subsídio para ações de conservação**, p. 333-375, 2010

NOGUEIRA, Cristiano et al. Vicariance and endemism in a Neotropical savanna hotspot: distribution patterns of Cerrado squamate reptiles. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 10, p. 1907-1922, 2011.

O'DONOGHUE, Peter. Haemoprotozoa: Making biological sense of molecular *phylogenies*. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 6, n. 3, p. 241-256, 2017.

O'DWYER, L. H. et al. Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) among recently captured Brazilian snakes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 309-314, 2003.

OPPLIGER, A.; CELERIER, M. L.; CLOBERT, J. Physiological and behaviour changes in common lizards parasitized by haemogregarines. **Parasitology**, v. 113, n. 5, p. 433-438, 1996.

OPPLIGER, A.; CLOBERT, J. Reduced tail regeneration in the common lizard, *Lacerta vivipara*, parasitized by blood parasites. **Functional Ecology**, v. 11, n. 5, p. 652-

655, 1997.

PICELLI, Amanda M. et al. Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscopy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 2, 2020a.

PICELLI, Amanda Maria et al. Redescription of *Hepatozoon ameivae* (Carini and Rudolph, 1912) from the lizard *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758). **Parasitology Research**, v. 119, n. 8, p. 2659-2666, 2020b.

PINEDA-CATALAN, Oscar et al. Revision of hemoproteid genera and description and redescription of two species of chelonian hemoproteid parasites. **The Journal of parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1089-1098, 2013.

PERKINS, Susan L. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1459, p. 2345-2350, 2000.

PERKINS, Susan L. Malaria's many mates: past, present, and future of the systematics of the order Haemosporida. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 11-25, 2014.

RIBEIRO, Mauro Lambert. Reserva ecológica do IBGE: biodiversidade terrestre. **Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE**, 2011.

SEHGAL, R. Deforestation and avian infectious diseases. **Journal of experimental biology**, v. 213, n. 6, p. 955-960, 2010. ISSN 0022-0949.

SILVA M, J.,; C.; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savannah Hotspot. **Bioscience**, v. 52, n. 3, p. 225-233, 2002.

TELFORD JR, S. R. Haemoparasites of reptiles. In: (Ed.). **Diseases of amphibians and reptiles**: Springer, 1984. p. 385-517.

TELFORD JR, Sam R.; MOLER, Paul E.; BUTLER, J. F. *Hepatozoon* species of the timber rattlesnake in northern Florida: Description of a new species, evidence of salivary gland oocysts, and a natural cross-familial transmission of an *Hepatozoon* species. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 2, p. 520-523, 2008.

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

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Editora Roca, 2007. ISBN 8572416684.

ÚNGARI, Leticia Pereira et al. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon species* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. **Parasitology research**, v. 117, n. 12, p. 3857-3865, 2018a.

ÚNGARI, Leticia Pereira et al. *Haemogregarina podocnemis* sp. nov.: description of a new species of *Haemogregarina Danilewsky* 1885 (Adeleina: Haemogregarinidae) in free-living and captive yellow-spotted river turtles *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) from Brazil. **Parasitology research**, v. 117, n. 5, p. 1535-1548, 2018b.

ÚNGARI, Leticia Pereira et al. Description of a new species *Hepatozoon quagliattus* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting the sleep snake, *Dipsas mikanii* (Squamata: Colubridae: Dipsadinae) from Goias State, Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 3, p. 871-880, 2021.

ÚNGARI, Leticia Pereira et al. Diversity of haemogregarine parasites infecting Brazilian snakes from the Midwest and Southeast regions with a description of two new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae). **Parasitology International**, v. 89, p. 102587, 2022.

VALKIUNAS, Gediminas. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. CRC press, 2005.

VAN AS, Johann et al. A new lizard malaria parasite *Plasmodium intabazwe* n. sp.(Apicomplexa: Haemospororida: Plasmodiidae) in the Afromontane *Pseudocordylus melanotus* (Sauria: Cordylidae) with a review of African saurian malaria parasites. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.

WENYON, C. M. Report of travelling pathologist and protozoologist. 3rd Bep. **Wellcome Trop. Bes. Lab. Khartoum**, p. 141, 1909.

CAPÍTULO 2

New specie and insights of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in lizards from the Brazilian Midwest.

Resumo

O bioma Cerrado é a maior savana do mundo quando se fala em biodiversidade, apresentando uma herpetofauna rica e com altos níveis de endemismo. No Brasil, os estudos envolvendo *Hepatozoon* de répteis são bastante escassos e, mesmo nos dias atuais, a maioria das espécies descritas apresentam somente dados morfológicos, trazendo classificações taxonômicas um tanto conflitantes. Esse estudo avaliou por meio de técnicas moleculares e de microscopia óptica, a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* spp. em lagartos de vida livre do Cerrado e sua diversidade genética incluindo sequências de répteis e roedores de todo território brasileiro. Foram coletadas 302 amostras de sangue, de 19 espécies de lagartos, em três locais do Cerrado, incluindo áreas de transição Cerrado-Caatinga e Cerrado-Amazônia. Vinte sete amostras apresentaram positividade na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e 8 tiveram resultado concordante na microscopia óptica, destas, seis amostras positivas na microscopia e PCR, foram selecionadas para sequenciamento. Foram realizadas PCRs com quatro conjuntos de oligonucleotídeos, visando diferentes regiões do gene *18S rRNA* de parasitos Apicomplexa para formação de sequências consenso de ~ 683 a 1.550 pb. Análises moleculares e filogenéticas demonstram a detecção de pelo menos uma nova espécie de *Hepatozoon* spp. infectando *Tropidurus semitaeniatus*, sendo o primeiro relato nessa espécie. Novos isolados de *Hepatozoon ameivae* em *Ameiva ameiva*, apontam possível fluxo gênico entre populações de diferentes unidades federativas. A rede de haplótipos entre as ordens Rodentia e Squamata associada com análises estatísticas mostrou separação entre grupos, gerando evidências significativas para a pouca expressividade de roedores na epidemiologia de transmissão de *Hepatozoon* spp. entre répteis no Brasil até o presente momento. Este é o primeiro e mais extenso levantamento de *Hepatozoon* spp. na região Cerrado brasileiro, fornecendo dados inéditos com relatos de novas espécies e rede de haplótipos, trazendo novas perspectivas sobre a diversidade e epidemiologia desse agente em lagartos do Brasil, que constata dados antes apenas hipotéticos para presença de diferenciação genética entre populações de roedores e répteis, ampliação da faixa de distribuição geográfica conhecida de espécies, identificação de fluxo gênico entre Unidades Federativas, indicativos de especificidade de hospedeiro, além de contribuir

substancialmente para estudos futuros na busca de taxonomias mais estruturadas e melhor entendimento da epidemiologia de *Hepatozoon* spp. em répteis, no intuito de superar as limitações atualmente existentes.

Palavras-chave: *Hepatozoon*, Lagartos, PCR, Cerrado, Brasil.

1. Introdução

Hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* são protozoários Apicomplexa (Adelina: Hepatozoidae), que possuem uma grande diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados, onde ocorre a reprodução assexuada e sexuada, respectivamente. Dotados de um ciclo de vida heteroxeno, necessitam de um ou mais hospedeiros intermediários até completar seu ciclo em um hospedeiro definitivo, também conhecidos como vetores invertebrados. A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre por meio da ingestão dos vetores invertebrados, como carrapatos, moscas, mosquitos, ácaros e sanguessugas (Kreier, 1993; Maia et al, 2016; Perlez et al, 2019; André et al, 2022).

Os ciclos de vida de *Hepatozoon* nos répteis ainda são pouco elucidados. A predação parece demonstrar uma rota significativa para essa classe, principalmente para as serpentes, que possuem como potenciais presas os lagartos, roedores e anuros (André et al, 2022; Zechmeisterová et al, 2021), podendo gerar uma sinonímia substancial de hemogregarinas entre, por exemplo, serpentes e lagartos (Zechmeisterová et al, 2021). Contudo, o conhecimento sobre os estágios de desenvolvimento do parasito nos hospedeiros finais (invertebrados) permanece escasso (Harris et al, 2015).

O gene 18S rRNA tem se mostrado marcador singular e amplamente utilizado para estudar a variação genética das hemogregarinas, sendo descobertos níveis inesperadamente altos de diversidade (Harris et al., 2015; Maia et al, 2016). No Brasil, das espécies de *Hepatozoon* descritas em lagartos, somente *H. ameivae* possuem dados moleculares, recentemente inclusos (Picelli et al., 2020). Além disso, estudos aspirando explorar a diversidade genética e a filogeografia de *Hepatozoon* em répteis do Brasil nunca foram analisados.

O lagarto Teiídeo *Ameiva ameiva* está distribuído por grande parte das áreas tropicais e subtropicais da América do Sul, a leste dos Andes, estendendo-se ao norte até o Panamá (Colli et al, 1991; Vitt et al, 2008). No Brasil, pode ser encontrado na maior parte do país. Em geral, apresenta-se abundante onde ocorre e aparentemente alcança densidades altas, tanto em áreas naturais quanto em regiões que passaram por alterações antrópicas (Munhoz Sanches et al, 2021). São heliotérmicos, de micro-habitat terrestre e bastante ágeis, uma das poucas espécies que ocorrem tanto em áreas de mata como de vegetação aberta, em áreas antropizadas e cidades (Vitt et al, 2008). Possuem comportamento alimentar classificado como forrageador ativo e generalista, o que propicia uma dieta diversificada incluindo uma variedade de invertebrados e vertebrados que dependerá, todavia, do que estará disponível na região, indicando um consumo maior de gafanhotos, baratas, besouros, aranhas e larvas de insetos (Vitt e Colli, 1994; Vitt et

al, 2008). Em áreas de savana, como o bioma Cerrado, sua dieta consiste principalmente de cupins (Vitt et al 2008). Por apresentarem porte médio podem consumir eventualmente vertebrados, sendo os anuros as presas mais identificadas. O tamanho da presa geralmente está associado ao tamanho do lagarto (McBrayer, 2007; Vitt et al, 2008).

Nos estudos sobre *Hepatozoon* em répteis, *A. ameiva* já foi identificada hospedando a espécie *H. ameivae* em algumas regiões do Brasil (Carini e Rudolph, 1912; Lainson, de Souza e Franco, 2003; Sabagh et al. 2015; Picelli et al, 2020) e parece ser o hospedeiro específico para esta espécie.

Os lagartos da espécie *Tropidurus semitaeniatus*, pertencem a família Tropiduridae, considerada como uma das famílias de lagartos com maior número de espécies neotropicais reconhecidas (Passos, Lima e Borges-Nojosa, 2011). Habitante da Caatinga nordestina, possuem hábitos saxícolas, sendo encontrados em afloramento rochosos, porém também podem ser observados em zonas de transição menos xéricas em direção à Mata Atlântica em zonas de transição ou remanescentes desta, e em altitudes de 1000 metros acima do nível do mar em campos rupestres (Ribeiro, 2010; Ribeiro e Freire, 2011; Carvalho, 2013; Maia-Carneiro e Rocha, 2021). São considerados forrageadores de espreita (Ribeiro e Freire, 2011), tendo como característica marcante, sua conformação morfológica, apresentando evidente achatamento dorsoventral do corpo, que lhes permite explorar com facilidade as fendas presentes nas rochas, importante para seu refúgio de predadores (Passos, Lima e Borges-Nojosa, 2011). Com relação a presença de hemogregarinas, até onde sabemos e até o momento deste estudo, não existem relatos anteriores sobre hemoparasitos nessa espécie.

O presente trabalho teve como objetivo investigar, por meio de técnicas moleculares e análise microscópica, a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* em lagartos de vida livre do Cerrado brasileiro, bem como a identificação das espécies encontradas. Adicionalmente, este trabalho também objetivou avaliar a diversidade genética desses parasitos assim como sua relação genética com isolados de *Hepatozoon* de roedores e de répteis de todo território brasileiro .

2. Materiais e Métodos

2.1 Captura dos animais e locais de amostragem

As capturas e punção venosa dos animais deste trabalho, foram realizadas nas áreas da Reserva Ecológica do IBGE (15°56'41''S e 47°53'07''W), Distrito Federal,

Parque Nacional Serra das Confusões (44°25'20.31"W, 9°28'1.11"S e 44°21'33.91"W, 9°25'20.17"S), Piauí e Parque Nacional Mário Viana (-14.706632°, -52.352665°), Mato Grosso. Regiões pertencentes ao bioma Cerrado do centro do Brasil e áreas de transição Cerrado-Caatinga e Cerrado-Amazônia, respectivamente. Foram analisadas amostras de sangue de trezentos e dois (302) lagartos de vida livre, capturados através de armadilhas de interceptação e queda (*pitfall traps*) (Cechin & Martins, 2000) e busca ativa, no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2020, identificados de acordo com Nogueira, Colli, Martins (2009) (Tabela Suplementar 1). A colheita de amostra sanguínea foi realizada pela veia caudal ventral ou jugular, respeitando o limite de até 10% da massa corporal, com a utilização de agulhas de calibre 25x7 ou 20x5, dependendo do tamanho do animal e seringas de 1ml previamente rinsadas com EDTA, evitando coagulação da amostra durante a colheita. As colheitas de sangue foram realizadas sempre no período da manhã. Esfregaços de sangue foram preparados em duplicata ainda no campo, em lâminas de vidro específicas para a microscopia, usando cerca de 5 µl da amostra de sangue inicial. Os esfregaços foram secos ao ar em temperatura ambiente e armazenados até a coloração.

As amostras foram armazenadas em caixa térmica refrigerada até o retorno ao laboratório de campo, onde foi centrifugado para a separação do plasma e concentrado de células e posteriormente congelados. O concentrado de células e as lâminas foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília para a realização dos testes moleculares e análise microscópica, respectivamente.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, sob o número 43/2019, assim como pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 62568-2.

2.2 Análise Microscópica

Os esfregaços sanguíneos foram fixados e corados pelo método de Rosenfeld e as lâminas foram montadas com Entelan e lamínulas para permitir o armazenamento a longo prazo.

Para a pesquisa de hemoparasitos, os esfregaços foram analisados em microscópio óptico Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) no aumento de 400x e 1000x por até 20 minutos (Bromwich & Schall, 1986). Todas as lâminas foram examinadas por dois patologistas clínicos veterinários sem conhecimento prévio dos resultados obtidos.

As lâminas parasitadas foram cuidadosamente examinadas e as imagens capturadas no aumento de 1000x por uma câmera digital Leica DM750 acoplada e processadas com LAS V4.8 (Leica Microsystems Suiza Limited 2015).

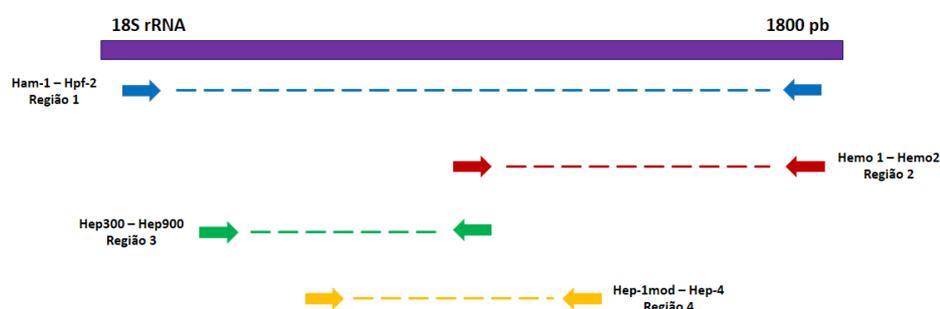
2.3 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das amostras foi extraído a partir de 10 µl de sangue, com auxílio de kits comerciais (Illustra Blood genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare®, Piscataway, NJ.), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. Para confirmar a presença de material genômico de répteis e assegurar a qualidade das amostras extraídas, todas as amostras de DNA foram testadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene Citocromo Oxidase, subunidade I (*COI*), específico para répteis (Nagy et al., 2012).

As amostras de DNA extraídas foram submetidas a uma PCR de triagem, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos Hemo1 e Hemo2 (Tabela 1), que amplifica a região 18S rRNA do grupo das hemogregarinas, obtendo um fragmento de aproximadamente 1000 pares de base (pb) (Perkins; Keller, 2001). Amostras positivas tanto na microscopia óptica, quanto na PCR de triagem, foram submetidas a caracterização molecular, utilizando outros três conjuntos de oligonucleotídeos visando amplificar por meio da PCR regiões diferentes do gene 18s rRNA de parasitos apicomplexa para a formação de uma sequência consenso (Tabela 1 e Figura 1). Para melhor compreensão, os conjuntos de oligonucleotídeos testados neste estudo, foram denominados por números de regiões. Região 1 - oligonucleotídeos Ham-1 e Hepf-2; Região 2 – oligonucleotídeos Hemo-1 e Hemo-2; Região 3 - oligonucleotídeos Hep300 e Hep900; Região 4 – oligonucleotídeos Hep1e Hep-4 (Figura 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados no estudo.

Oligonucleotídeos	Sequência 5'–3'	Espécie alvo	Região alvo	pb	Referência
Ham-1	GCCAGTAGTCATATGCTTGTC	Piroplasmídeos	18S rRNA	~ 1760	CRIADO-FORNELIO et al., 2006
Hpf-2	GACTTCTCCTTCGTCTAAG				
Hemo1	TATTGGTTTTAAGAATAATTTTATGATTG	Hemogregarinas	18S rRNA	~1000	PERKINS; KELLER, 2001.
Hemo2	CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC				
Hep-1mod	CGCGAAATTACCCAATTCTA	<i>Hepatozoon</i>	18S rRNA	~ 670	SPOLIDORIO et al., 2009.
Hep-4	TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT				
Hep300	GTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACG	<i>Hepatozoon</i>	18S rRNA	~ 660	UJVARI; MADSEN; OLSSON, 2004
Hep900	CAAATCTAAGAATTCACCTCTGAC				
COI-F	TNT TMT CAA CNA ACC ACA AAG A	Répteis	COI	664	NAGY et al., 2012
COI-R	ACT TCT GGR TGK CCA AAR AAT CA				

**Figura 1.** Representação do gene 18S rRNA completo e as regiões de anelamento de cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados neste estudo para formação da sequência consenso. Ham1- Hpf2 (cor azul), Hemo1 – Hemo2 (cor vermelha), Hep300 – Hep900 (cor verde) e Hep-1mod – Hep4 (cor laranja).

Na mistura da PCR para os oligonucleotídeos Ham-1 e Hpf-2 utilizou-se um volume final de 25µL na reação com solução tampão 10X, 1,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,2µL de TaqDNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 2µL de DNA, 1,0µL de cada oligonucleotídeo (10 mM). O protocolo de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 98°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 2 min, com um período de extensão adicional de 10 min a 72°C (CRIADO-FORNELIO et al., 2006) com alteração na temperatura de anelamento.

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

Para os oligonucleotídeos Hep-1mod e Hep4, foram utilizados 1µL das amostras de DNA na mistura da reação com volume final de 25µL contendo solução tampão a 10X, 0,75 mM de MgCl₂, 0,2mM de trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTP) a 25 mmol, 0,2µL de TaqDNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada primer (10 mM). O ensaio de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos por 53°C, e 40 segundos por 72°C, com extensão final a 72°C por 5 minutos (Spolidorio et al 2009).

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

Todas as amostras foram testadas em duplicata e no mesmo aparelho termociclador (Biorad® C1000TM Thermal Cycler, Hercules, CA.). Como controle negativo foi utilizada a água ultrapura *Milli-Q*® autoclavada e como controle positivo, amostras de DNA de animais naturalmente infectados por *Hepatozoon* spp., previamente confirmadas por sequenciamento. Posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados em banho de Brometo de etídio, e examinados sob luz transiluminadora UV (UV transiluminator®, UVP LLC, Upland,32 CA).

2.4 Purificação dos produtos das PCRs, sequenciamento e análise molecular

Os produtos da PCR com tamanho dos pares de bases esperados para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados, foram purificados utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®, Calsbad, CA)

conforme recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram mantidas a -20°C e encaminhadas para a realização do sequenciamento genético. As amostras foram sequenciadas no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP em Jaboticabal, por método de Sanger, em sequenciador automático com 96 capilares ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)), utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada PCR realizada.

As sequências foram trimadas e sua qualidade analisada com base no cromatograma e no "Phred quality score". Uma sequência consenso de cada isolado foi construída por meio do programa Geneious v. 9.0.5. As sequências foram submetidas à ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) utilizando o banco de dados "non-redundant" (nr). As sequências do presente estudo serão depositadas no banco de dados GenBank.

O filograma foi construído por análise bayesiana utilizando fragmentos parciais do gene 18S rRNA (cerca de 536 nt) de 90 isolados, sendo 87 destes, de *Hepatozoon* spp. oriundos de mamíferos, répteis e anfíbios do Brasil e de outros continentes. O alinhamento foi realizado usando o algoritmo Clustal Omega. A árvore foi construída com o software MrBayes v3.2 por meio do modelo "General Time Reversible" (GTR) com distribuição gama (+G) como matriz de substituição de acordo com o programa jModelTest v2.1.10. O algoritmo Monte Carlo Markov Chain (MCMC) foi realizado com 4 cadeias ao longo de 1.000.000 gerações amostradas a cada 100. Os primeiros 25% das gerações foram descartados como "burn-in". Três sequências do gênero *Adelina* sp. foram utilizados como grupo externo.

Duas redes de haplótipos foram construídas. Apenas isolados de *Hepatozoon* spp. de lagartos, serpentes e roedores do Brasil foram utilizados. Uma busca extensiva foi realizada para incluir todas as sequências brasileiras de *Hepatozoon* que tivessem sido identificadas em um desses hospedeiros. Uma rede foi obtida com base na localização dos isolados por unidade federativa e a outra, com base no grupo de hospedeiro (lagartos, serpentes e roedores). Foram utilizadas 55 sequências oriundas tanto do banco de dados GenBank (n=49) quanto do presente estudo (n=6). Somente as que possuíam tamanho adequado e que correspondessem à mesma região nucleotídica foram incluídas. O alinhamento final possuía cerca de 300 nucleotídeos (nt). A rede de haplótipos foi realizada no software PopART v.1.7 pelo método "Median Joining". O programa DnaSP v. 6 foi empregado para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Dh), número médio de diferenças de nucleotídeos (K) e número de sítios segregantes (S) entre os isolados.

A distância genética p para as quatro sequências obtidas no presente estudo foi calculada no programa MEGA X. Foram incluídas na matriz as sequências que mais se aproximavam filogeneticamente dos isolados, as que possuíam menor e -value no BLASTn. e as que possuíam no mínimo 1.200 nt. O modelo empregado foi “Kimura 2-parameter” (K2P). O parâmetro α foi estimado previamente.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada por meio do programa Arlequin v.3.11. As populações foram divididas em três com base nos grupos de hospedeiros: lagartos, serpentes e roedores. Foram utilizadas 10.000 permutações e a análise foi executada locus por locus.

3. Resultados

Foram analisadas 302 amostras de DNA de lagartos por meio da PCR e microscopia de luz. Das amostras analisadas, vinte e sete (8,9%) foram positivas para *Hepatozoon* sp. por meio da PCR (Tabela 2 e 3) e destas, houve visualização de gametócitos intra-eritrocitários em oito (8) esfregaços sanguíneos (Figura 2, 3 e 4). Seis destas amostras (6/8), demonstraram positividade nas quatro regiões 18S rRNA utilizadas neste estudo, produzindo sequências parciais de ~ 683 a 1.550 nucleotídeos, das sequências consenso geradas, representada pelas espécies *Ameiva ameiva* e *Tropidurus semitaeniatus*, das regiões do Distrito Federal e Piauí, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 2. Relação das espécies de lagartos coletados e positivos para Hemogregarinas na triagem molecular (PCR) de acordo com a região amostrada e sexo.

ID	ESPÉCIE	REGIÃO	SEXO	TRIAGEM (PCR)	ESFREGAÇO SANGUÍNEO
13	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	M	+	-
150	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	NI*	+	-
37	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	F	+	-
169	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	F	+	-
176	<i>Ameiva ameiva</i>	MT	F	+	-
189	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	F	+	-
190	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	J	+	-
192	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	J	+	-
193	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	F	+	-
291	<i>Ameiva ameiva</i>	MT	M	+	-

20	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	F	+	+
159	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	NI*	+	+
74	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	NI*	+	-
87	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	F	+	-
198	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-
252	<i>Hemidactylus brasilianus</i>	PI	NI*	+	-
157	<i>Salvator merianae</i>	PI	M	+	+
59	<i>Tropidurus itambere</i>	DF	M	+	-
60	<i>Tropidurus itambere</i>	DF	NI*	+	-
156	<i>Tropidurus itambere</i>	DF	F	+	-
111	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+
266	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	-
92	<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	F	+	-
113	<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	M	+	+
173	<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	F	+	+
174	<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	F	+	+
175	<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	F	+	+

Legenda: DF: Distrito Federal, PI: Piauí e MT: Mato Grosso. M: Macho, F: Fêmea, J: Jovem, *NI: (Não identificado).

Tabela 3. Número de animais positivos para Hepatozoon na triagem molecular, segundo a espécie e local de captura.

REGIÃO				
ESPÉCIE	DF	PI	MT	TOTAL
<i>Ameiva ameiva</i>	6	4	2	12
<i>Ameivula ocellifera</i>	0	3	0	3
<i>Hemidactylus brasilianus</i>	0	1	0	1
<i>Salvator merianae</i>	0	1	0	1
<i>Tropidurus itambere</i>	3	0	0	3
<i>Tropidurus oreadicus</i>	0	2	0	2
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	0	5	0	5
TOTAL				27

Legenda: DF: Distrito Federal, PI: Piauí e MT: Mato Grosso.

Tabela 4. Número de espécies de lagartos positivas para *Hepatozoon* spp. por microscopia óptica e testes moleculares (PCR).

Espécie	Região	Ham-1/ Hpf-2 (Região 1)	Hemo1/Hemo2 (Região 2/ TRIAGEM)	Hep300/Hep900 (Região 3)	Hep1/Hep4 (Região 4)
<i>Ameiva ameiva</i>	DF	+	+	+	+
<i>Ameiva ameiva</i>	DF	+	+	+	+
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	+	+	+	+
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	+	+	+	+
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	+	+	+	+
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	PI	+	+	+	+
<i>Salvator merianae</i>	PI	-	+	-	+
<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	-	+	-	+

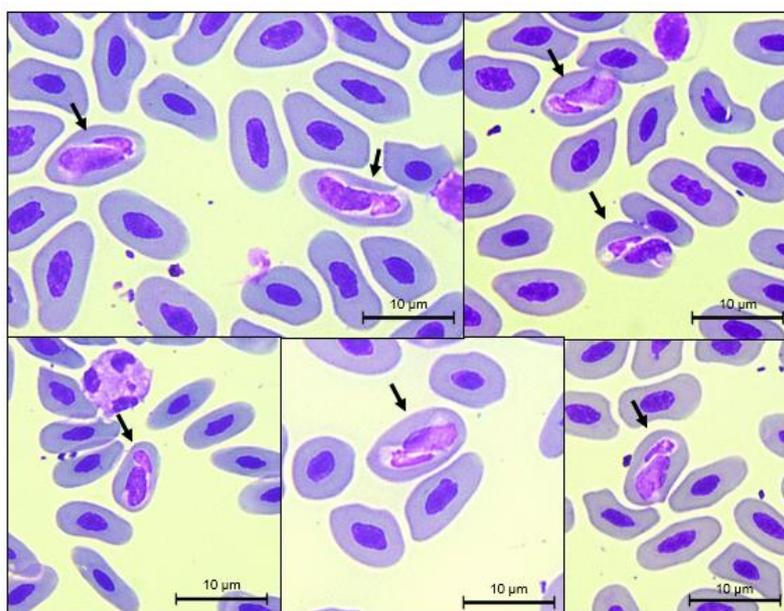


Figura 2. Gametócitos de *Hepatozoon ameivae* em esfregaços sanguíneos de lagartos *Ameiva ameiva* do Cerrado, Brasil.

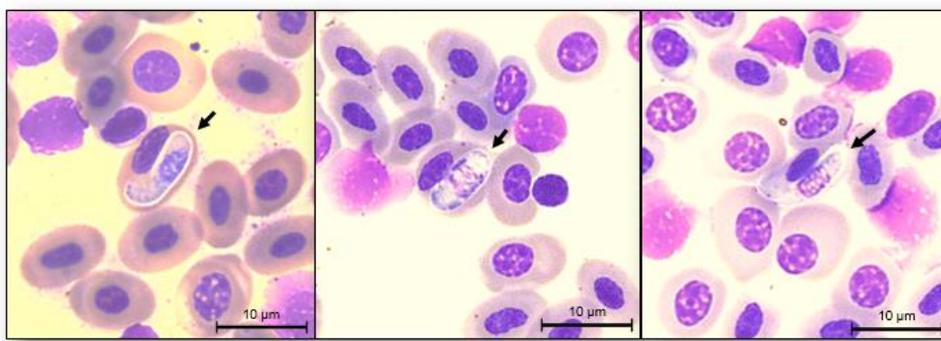


Figura 3. Gametócitos de *Hepatozoon* sp. em esfregaço sanguíneo de lagarto *Tropidurus semitaeniatus*, Piauí, Brasil. (Isolado L173).

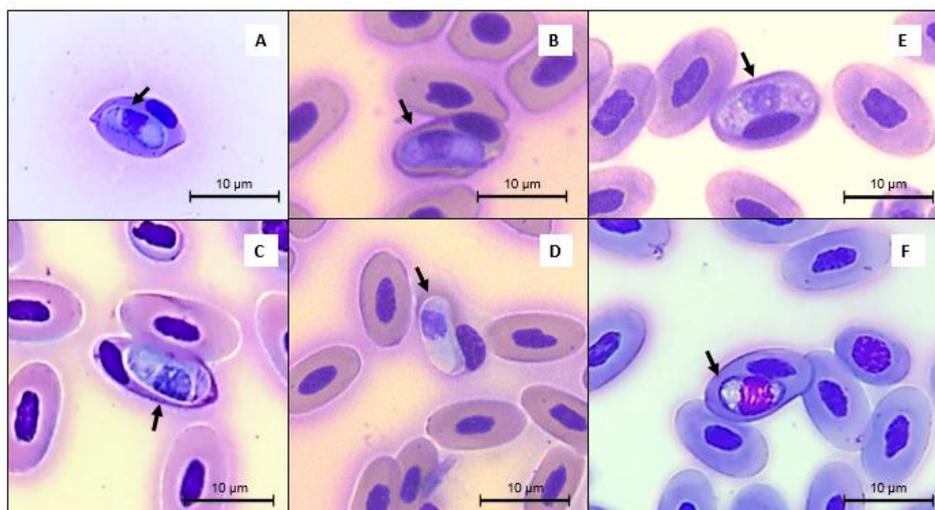


Figura 4. Gametócitos de *Hepatozoon* sp. em esfregaços sanguíneos de lagartos *Tropidurus semitaeniatus*, Piauí, Brasil. Isolados L174 (A e B), L175 (C e D) e L113 (E e F).

Na análise por BLASTn, o isolado de *Hepatozoon* L173, identificado no lagarto *Tropidurus semitaeniatus*, da região do Piauí, apresentou identidade de 98,86% com cobertura de 100% para *Hepatozoon* sp. (MH174343), sequência oriunda de carrapato *Ornithodoros atacamensis* do Chile (Muñoz-Leal et al, 2019) (Tabela 5). Os dados também evidenciam uma distância genética p de 1,09% entre elas (Tabela 6). No filograma, a sequência L173 deste estudo e a sequência *Hepatozoon* sp. (MH174343) formam um clado monofilético com bom suporte, porém nota-se, por meio dos tamanhos dos ramos, distância filogenética considerável entre os isolados, obtida por análise bayesiana (Figura 5).

As sequências L113, L174 e L175 apresentaram 100% de identidade entre si e, na análise por BLASTn, 99,24%, 99,10% e 99,05% respectivamente, com 100% de cobertura, para o isolado *Hepatozoon* sp. clone PS001 (OM033664) (Tabela 5). Na árvore filogenética, as três sequências formaram um clado com baixo suporte com as sequências *Hepatozoon* sp. clone PS001 (OM033664) e *Hepatozoon trigeminum* (ON262424). Contudo, pode-se observar também que os isolados L113, L174 e L175 formam um clado monofilético com bom suporte entre si, além de possuírem uma distância filogenética considerável em relação a esses dois isolados (*Hepatozoon* sp. clone PS001 e *Hepatozoon trigeminum*), identificada pela disparidade no tamanho dos ramos (Figura 5). A distância genética p apresentada entre os isolados anteriormente descritos e as sequências OM033664 e ON262424, visualizadas no filograma, foi de 0,78% e 1,01%, respectivamente (Tabela 6).

As sequências L159 e L20 geradas neste estudo apresentaram, na análise por BLASTn, identidade de 98,84% e 98%, com uma cobertura de 99% e 98,96%, respectivamente, com a sequência OM033664 (Tabela 5). A sequência L159 apresentou distância genética p de 1,25% (Tabela 6). Vale ressaltar, que ambas as sequências (L159 e L20), apresentaram identidade de 100% entre elas e que a sequência L20 não foi incluída na Tabela 6 pelo seu tamanho reduzido.

Na análise filogenética, as sequências L159 e L20 apresentam-se em um clado monofilético de bom suporte com sequências de *H. ameivae* (MN833642, MN833641 e MN833640) de lagartos da espécie *Ameiva ameiva* da Amazônia brasileira (Picelli et al., 2020) (Figura 5) que incluem todas as sequências disponíveis no GenBank dessa espécie. A identidade no alinhamento par a par entre as sequências, utilizando o algoritmo Smith-Waterman, foi de 100% entre elas. Através da microscopia óptica, também foi possível observar similaridade na morfologia entre os hemoparasitos encontrados em lagartos *A. ameiva* deste estudo com *H. ameivae* identificados em lagartos da Amazônia, visto que os gamontes dessa espécie em especial, possuem característica morfológica marcante, apresentando gametócitos alongados, grandes e largos, com núcleo excêntrico, extremidades arredondadas e com frequência sobrepondo-se aos núcleos dos eritrócitos parasitados, como descrito por Picelli et al. (2020) (Figura 2).

Tabela 5. Valores de identidade apresentados através da análise BLASTn dos isolados testados.

Sequências	Tamanho da sequência (bp)	Identidade (%)	Cobertura (%)	E-value	Sequências com maior identidade	Países	Hospedeiro
Seq_174	1550	99.10%	100%	0.0	Hepatozoon sp. clone PS001 (OM033664.1)	Brasil	<i>Monodelphis domestica</i>
Seq_175	1474	99.05%	100%	0.0	Hepatozoon sp. clone PS001 (OM033664.1)	Brasil	<i>Monodelphis domestica</i>
Seq_113	1320	99.24%	100%	0.0	Hepatozoon sp. clone PS001 (OM033664.1)	Brasil	<i>Monodelphis domestica</i>
Seq_173	1405	98.86%	100%	0.0	Hepatozoon sp. isolate HepOat4 (MH174343.1)	Chile	<i>Ornithodoros atacamensis</i>
Seq_159	1393	98.84%	99%	0.0	Hepatozoon sp. clone PS001 (OM033664.1)	Brasil	<i>Monodelphis domestica</i>
Seq_20	683	98.0%	98.96%	0.0	Hepatozoon sp. clone PS001 (OM033664.1)	Brasil	<i>Monodelphis domestica</i>

Tabela 6. Matriz de distância genética p. Somente as sequências mais próximas filogeneticamente dos isolados obtidos no presente estudo e com no mínimo 1.250 nt foram incluídas.

	L173	MH174343	ON262426	ON236891	ON237359	L159	L113	L174	ON262424	OM033664
L173										
MH174343	1,09%									
ON262426	1,80%	1,09%								
ON236891	2,03%	1,33%	1,02%							
ON237359	1,64%	0,94%	0,55%	0,47%						
L159	2,73%	2,18%	2,58%	1,88%	2,42%					
L113	2,65%	2,03%	2,42%	2,19%	2,26%	1,72%				
L174	2,65%	2,03%	2,42%	2,19%	2,26%	1,72%	0,00%			
ON262424	1,95%	1,33%	1,56%	1,95%	1,56%	1,48%	1,01%	1,01%		
OM033664	2,18%	1,56%	1,95%	1,72%	1,80%	1,25%	0,78%	0,78%	0,55%	

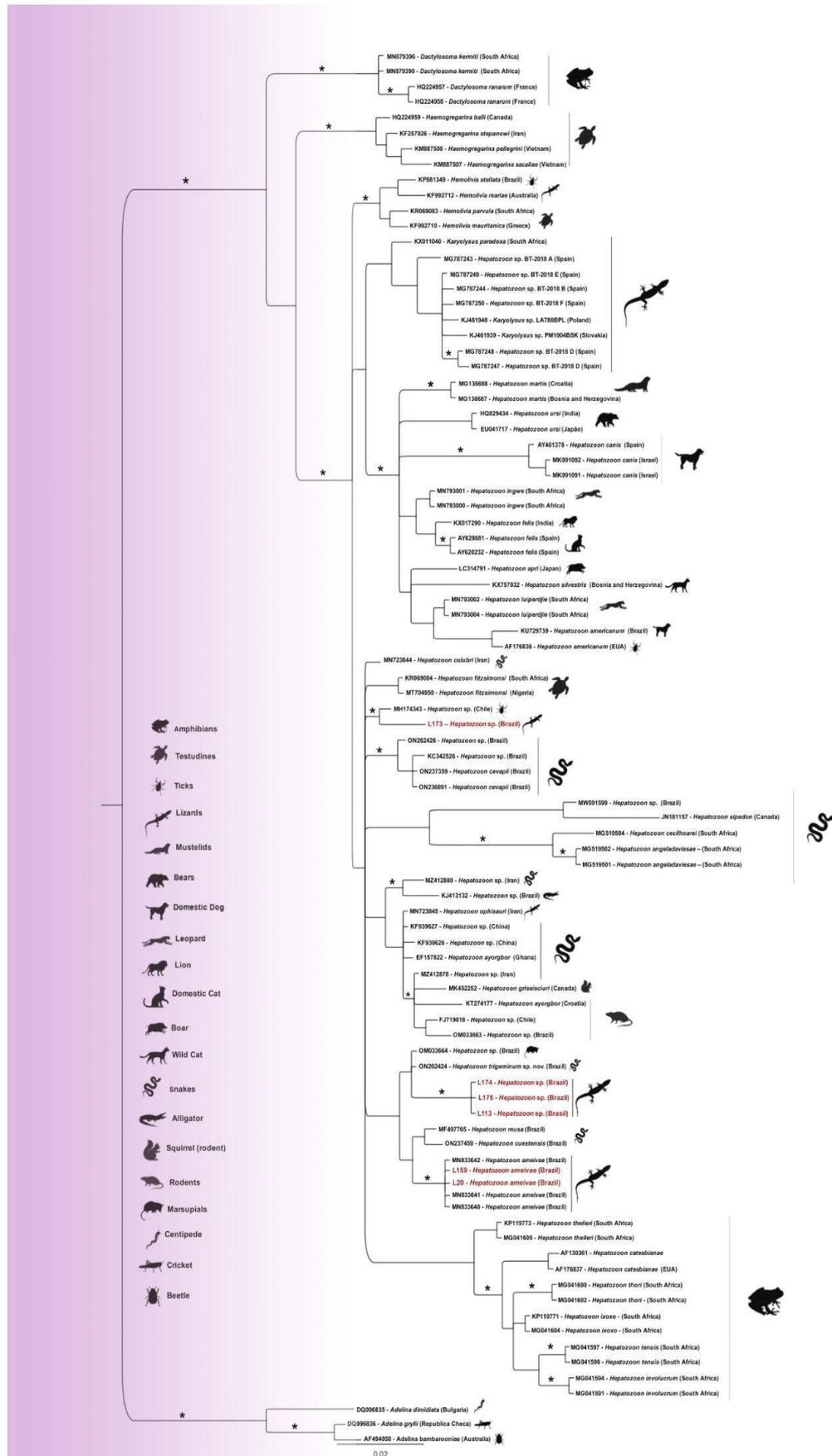


Figura 5. Árvore filogenética obtida por análise bayesiana de fragmentos parciais do gene rRNA 18S (536 nt) de 87 isolados de *Hepatozoon*. Probabilidades posteriores iguais a 0,90 ou mais são representadas por asteriscos. As sequências obtidas no presente estudo se encontram destacadas em vermelho.

Duas redes de haplótipos foram construídas, utilizando unicamente isolados de *Hepatozoon* sp. de lagartos, serpentes e roedores do Brasil. Uma rede foi obtida com base na localização dos isolados por estados (Figura 6) e a outra, com base em grupo de hospedeiros (lagartos, serpentes e roedores; Figura 7), utilizando o marcador 18S rRNA com fragmentos de aproximadamente 300 pb, em uma pesquisa extensa e rigorosa, com o intuito de incluir o máximo de sequências brasileiras possíveis depositadas no GenBank em conjunto com as sequências obtidas neste estudo.

As redes revelam a existência de 21 haplótipos distribuídos em 14 unidades federativas do Brasil. Na rede de estados, nossos isolados se organizaram em três haplótipos distintos, apresentando H10 como um haplótipo com um único isolado, a sequência L173, o haplótipo 13 (H13), incluindo as sequências L20 e L159 em lagartos *A. ameiva* de Brasília em conjunto com os isolados MN833642 e MN833641 de *H. ameivae* em lagartos da mesma espécie da Amazônia e o haplótipo 17 (H17), contendo as sequências L113, L174 e L175 deste estudo. Nota-se também que os diferentes isolados de *Hepatozoon* tanto em répteis quanto em roedores possuem ampla distribuição pelo território brasileiro, inclusive com isolados de uma mesma espécie distribuindo-se por regiões geograficamente distantes (Figura 6).

A rede de haplótipos baseada em hospedeiros, demonstra separação dos grupos de isolados de roedores e répteis. As sequências de roedores se agrupam nos haplótipos (H1, H2, H3 e H21) e são facilmente visualizadas no canto superior esquerdo da rede. Já as espécies de répteis, se apresentam distribuídas em toda região excedente da rede, como também, não se observa compartilhamento de hospedeiros (ex: roedores/répteis) no mesmo haplótipo (Figura 7). Devido ao escasso número de sequências adequadas depositadas no GenBank, não foi possível incluir o grupo de marsupiais nem crocodiliano neste estudo. Os resultados da análise dos índices de diversidade obtidos com isolados brasileiros de *Hepatozoon* de lagartos, serpentes e roedores, estão descritos na Tabela 7.

Por meio da análise bayesiana, foram identificados quatro grupos genéticos entre as populações de *Hepatozoon* em roedores, lagartos e serpentes. O grupo de isolados de roedores apresenta-se como um único grupo genético. O conjunto de lagartos demonstra três grupos genéticos, um dos quais é compartilhado por roedores (representado por duas sequências) e outro por serpentes. Por sua vez, o grupo das serpentes apresenta uma maior diversidade, possuindo os quatro grupos genéticos, porém com dois deles formado por menor número de isolados. Um desses isolados demonstrou compartilhar um ancestral comum em relação aos isolados do grupo genéticos dos roedores. Observa-se separação genética entre os grupos, com bom suporte ($P < 0,005$) entre si (Figura 8).

A análise de variância molecular (AMOVA) também demonstra a separação genética entre os grupos Squamata e Rodentia, apresentando $F_{ct} = 0,43$ (separação genética entre grupos) e $F_{st} = 0,51$ (diferenciação genética dentro das populações) ($p\text{-value} < 0,001$), confirmando estruturação genética moderada de bom suporte (Tabela 8).

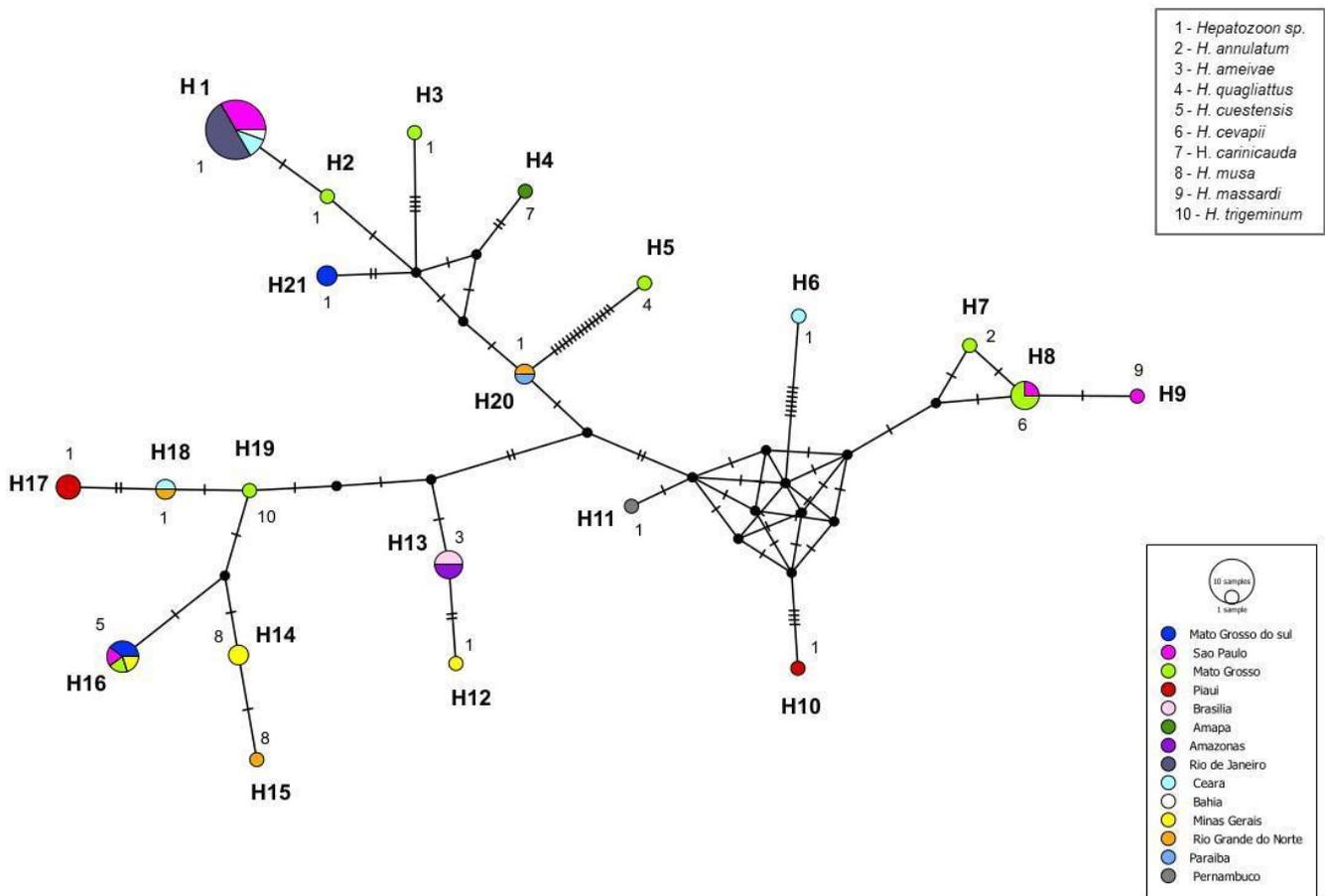


Figura 6. Rede de haplótipos de isolados de *Hepatozoon* brasileiros com base nas unidades federativas onde foram coletados.

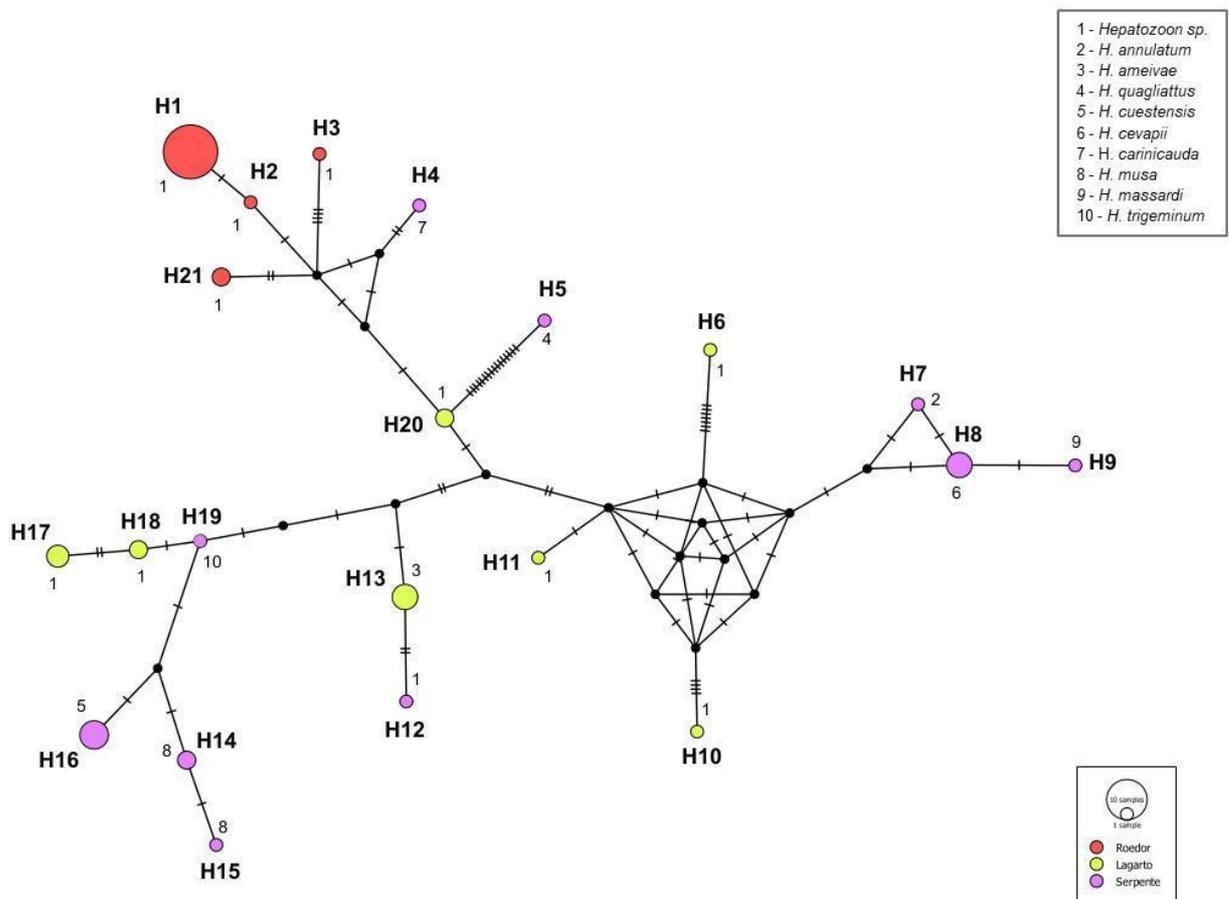


Figura 7. Rede de haplótipos de isolados de *Hepatozoon* brasileiros com base em três grupos de hospedeiros (lagartos, serpentes e roedores).

Tabela 7. Índices de diversidade genética. Análise obtida com isolados de *Hepatozoon* obtidos de lagartos, serpentes e roedores no Brasil com base no gene 18S rRNA.

Número de haplótipos (h)	Diversidade haplotípica (Hd)	Diversidade nucleotídica (Pi)	Número de sítios variáveis (S)	Número médio de diferenças nucleotídicas (k)
21	0,873	0,02429	45	6,65618

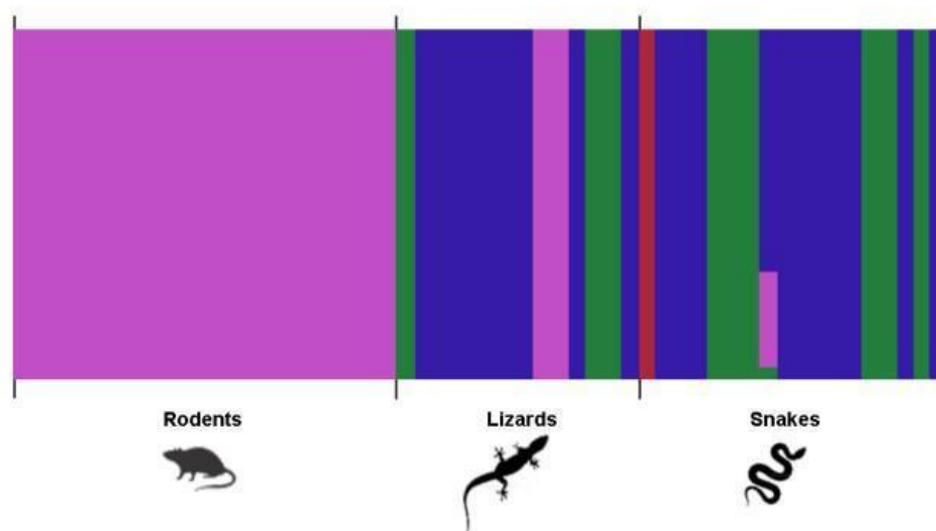


Figura 8. Análise bayesiana da estrutura populacional de isolados de *Hepatozoon* obtidos de lagartos, serpentes e roedores no Brasil com base no gene rRNA 18S. A análise indica quatro grupos genéticos distribuídos pelo país.

Tabela 8. Resultados do teste AMOVA com isolados de *Hepatozoon* brasileiros com base no gene 18S rRNA. Três populações foram consideradas com base no hospedeiro (lagartos, serpentes e roedores).

	Soma dos quadrados	Variância	Variância %	Índices de fixação
Nenhum grupo definido				
Entre populações	84,223	2,228	45,55	
Dentro das populações	135,851	2,663	54,45	Fst=0,45*
Total	220,074	4,892		
Dois grupos (Squamata + Rodentia)				
Entre grupos	74,125	2,385	43,20	Fct=0,43*
Entre populações dentro dos grupos	10,098	0,472	8,55	Fsc=0,15*
Dentro das populações	135,851	2,664	48,25	Fst=0,51*
Total	220,074	5,521		

*p-value<0,001

Legenda: Fst: Diferença genética dentro das populações, Fct: Diferença genética entre grupos; Fsc: Diferença genética entre populações dentro dos grupos.

4. Discussão

No presente trabalho foram analisadas 302 amostras de DNA de sangue de lagartos de 19 espécies por meio da PCR e microscopia de luz. Vinte e sete (27) amostras foram positivas para *Hepatozoon* sp. através da PCR, ocorrendo visualização de gametócitos intra-eritrocitários em oito (8) esfregaços sanguíneos. Seis das oito amostras positivas tanto na PCR quanto na microscopia (6/8), representada pelas espécies *A. ameiva* e *T. semitaeniatus*, das regiões do Distrito Federal e estado do Piauí, respectivamente apresentaram positividade nas quatro regiões 18S rRNA utilizadas neste estudo, produzindo sequências parciais de ~ 683 a 1.550 nucleotídeos, das sequências consenso geradas. A espécie *T. semitaeniatus* atuou com 50% (4/8) do total de espécies infectadas por *Hepatozoon* identificadas por microscopia óptica. Este é o primeiro relato deste agente utilizando *T. semitaeniatus* como hospedeiro. Até onde sabemos, essa também será a primeira identificação de hemoparasitos nessa espécie.

A árvore filogenética demonstra que o isolado L173 oriundo de lagarto *T. semitaeniatus* deste estudo, é filogeneticamente mais próximo da sequência de *Hepatozoon* sp. (MH174343), identificado em carrapato *O. atacamensis*. Segundo Muñoz-Leal et al, 2019, o carrapato infectado foi coletado no ambiente, sob rochas frequentadas por lagartos do gênero *Liolaemus* em Chañaral, Chile. A descrição da região especificada por Muñoz-Leal et al. (2019) apresenta algumas semelhanças com as encontradas na região de coleta do *T. semitaeniatus* infectado neste estudo, visto que essa espécie possui hábitos saxícolas (Ribeiro e Freire, 2011; Carvalho, 2013; Maia-Carneiro e Rocha, 2021), sendo coletado em região de lajedos do Parque Serra da Capivara no Piauí. Estas duas sequências formam um clado monofilético com bom suporte, no entanto, observa-se que o isolado L173 possui um ramo maior e mais independente quando comparado ao MH174343 e ao ancestral comum mais recente que compartilham, o que demonstra, associado à distância genética p acima de 1% que são espécies distintas.

O isolado L173 aponta informações relevantes nas análises moleculares realizadas neste trabalho considerando a utilização do marcador 18S rRNA, altamente conservado para a espécie (Maia et al, 2016), e dados de diferenciação entre espécies sugeridos pela literatura a partir de 1% de distância genética p (Barta et al, 2012; Cook et al, 2015; Borges-Nojosa et al, 2017; Picelli et al, 2020). A presença de identidade par a par de 98,86% e 1,09% de distância genética com a sequência de *Hepatozoon* sp. (MH174343), somada a indicação de distância filogenética e topologia observada no filograma,

concordam fortemente para a presença de uma nova espécie de *Hepatozoon* sp. identificada neste estudo.

A análise das sequências L113, L174 e L175, geraram resultados conflitantes. O conjunto de dados obtidos através das análises moleculares, trouxeram questionamentos importantes sobre a possibilidade de uma nova espécie ou uma maior diversidade com a presença de novos genótipos dentro da espécie *H. trigeminum*. O que trouxe indagação foi que, ao analisar as sequências OM033664 (Weck et al. 2022) e ON262424 (Úgari et al, 2022), a identidade para a par entre elas é de 100%, distância p de 0,55% e no filograma, se apresentam no mesmo clado monofilético, com ramos igualmente alinhados, demonstrando índices que corroboram se tratar da mesma espécie denominada por Úgari et al. (2022), de *H. trigeminum*. Contudo, ao se comparar os dados obtidos neste estudo (L113, L174 e L175) com as sequências anteriormente descritas, obtêm-se resultados que dificultam em um primeiro momento a classificação dos isolados a nível de espécie. Como apresentado na Tabela 5, índices de identidade de 99,24%, 99,10% e 99,03% respectivamente foram observados e distância p para sequência OM033664 (Weck et al. 2022) de 0,78%. Distância distinta foi observada para sequência de *H. trigeminum* ON262424 (Ugari et al, 2022), apresentando 1,01% (Tabela 6). Como já citado por outros autores (Barta et al, 2012 ; Cook et al, 2015 ; Borges-Nojosa et al, 2017; Picelli et al, 2020), *threshold* de 1% é considerável para distinção de espécies dentro do gênero *Hepatozoon*.

Ao incluirmos os dados da análise filogenética, observa-se que as sequências de *H. trigeminum* detectadas em marsupial *Monodelphis domestica* e em serpente *Oxyrhopus trigeminus* e as identificadas neste trabalho, se agrupam no mesmo clado, todavia, não apresentam bom suporte, o que, de acordo com a análise bayesiana, não é possível afirmar real estruturação do clado monofilético. Nossas sequências, no entanto, apresentam-se em um ramo maior, agrupando-se todas em um mesmo clado monofilético e de bom suporte, que somados a identidade par a par e a distância p, confirmam se tratar da mesma espécie de *Hepatozoon* sp.

É provável que essa relação esteja refletindo a atuação do lagarto *T. semitaeniatus* como primeiro hospedeiro intermediário ou paratênico para serpentes *O. trigeminus*, atuando como parte do ciclo de vida de *Hepatozoon*, para alcançar o segundo hospedeiro vertebrado. Apesar dos poucos dados elucidados sobre o ciclo de vida de *Hepatozoon* em répteis, sabe-se que é frequente sua transmissão pela ingestão do vetor invertebrado ou através de predação de hospedeiros vertebrados, como anuros, lagartos e roedores (Picelli et al, 2020; Úgari et al, 2022). Mikalauskas et al. (2017), relatam em seu estudo a presença

de predação de serpentes *O. trigeminus* em lagartos do gênero *Tropidurus*. Em estudo que contempla a herpetofauna da Serra das Confusões, Dal Vechio et. (2016), descrevem as espécies *O. trigeminus* e *T. semitaeniatus* como presentes na região. Figueiredo et al. (2007), também apontam os marsupiais da espécie *M. domestica* como integrantes da fauna da Serra das Confusões. Dados que corroboram com nossa hipótese presa-predador. Outra ação possível seria a atuação de vetores invertebrados que não possuem especificidade para hospedeiros ou até mesmo por parasitismo accidental, carregarem esse agente para outras espécies dentro daquele nicho ecológico, visto que todas as espécies agrupadas nesse clado encontram-se presentes na mesma região, podendo gerar adaptações gênicas entre espécies com a formação de novos genótipos/espécies de *Hepatozoon* sp. Corroborando com nossa hipótese de Castro Jacinavicius et al. (2021), identificou ácaros hematófagos da ordem Trombidiforme parasitando lagartos do gênero *Tropidurus*, bem como marsupiais *M. domestica* na Região do Parque Nacional Serra das Confusões. Dados morfológicos e morfométricos contribuem significativamente para a classificação das espécies dentro da perspectiva de taxonomia integrativa e, nesse caso, faz-se necessário para a definição desta possível nova espécie em lagartos.

Recursos de bioinformática utilizando algoritmos de análise bayesiana e de máxima verossimilhança com sequências maiores e menores foram recrutadas na tentativa de se obter um clado de bom suporte. Uma pesquisa extensa também foi realizada no intuito de inserir todas as sequências de répteis do Brasil, com fragmentos adequados, como também, sequências representativas de outros continentes, aumentando assim informações de sua diversidade. Diferentes marcadores, incluindo nucleares e mitocondriais, também poderiam auxiliar, no ponto de vista molecular, na elucidação ou da presença de mais uma espécie de *Hepatozoon* sp. em *T. semitaeniatus* ou de novos isolados de *H. trigeminum* presente no Cerrado brasileiro.

Uma das características presente em todas as espécies do gênero *Tropidurus* além do comportamento de forrageamento destinado a matéria vegetal e vários artrópodes, especialmente o insetívoro (Ribeiro e Freire, 2011), é a existência das “bolsas acarianos”, que são dobras ou pregas dérmicas muitas vezes profundas e com quantidade de escamas reduzidas, que oportunizam a agregação e colonização dos ácaros (Rodrigues, 1987; Delfino et al., 2011). Nelas, são frequentemente encontrados ácaros da Ordem Trombidiforme, apontada como a principal ordem parasitária de lagartos (Cunha-Barros et al., 2003 ; Carvalho et al., 2006; Mendoza-Roldan et al., 2020; Mendoza-Roldan et al., 2021), que em seu estágio larval possui hábito parasitário, podendo gerar dermatites, perda de sangue, como também atuar como vetores de agentes infecciosos (Delfino et al.,

2011; Chaisiri et al., 2019), enquanto os outros estágios apresentam-se de vida livre com hábito predatório (Chaisiri et al., 2019). Estes ácaros podem se apresentar na coloração amarela, vermelha ou branca, a depender de sua alimentação e sua localização é amplamente utilizada na diferenciação entre espécies do gênero *Tropiduros* (Rodrigues, 1987). Essa estreita relação parasito-hospedeiro associada a grande quantidade de animais infectados detectados nesse estudo, gera indicativos da possível atuação desses ácaros como vetores de *Hepatozoon* em lagartos, atuando de alguma forma na epidemiologia dessa infecção. Outros estudos também já levantaram a hipótese desses ácaros hematófagos atuarem como potenciais vetores de *Rickettsia* (Poinar, Poinar, 1998; Mendoza-Roldan et al., 2021), *Anaplasma* (Fernández-Soto, Pérez-Sánchez, Encinas-Grandes, 2001) e *Borrelia* (Literak et al, 2008). Em recente estudo, Mendoza-Roldan et al. (2021) identificaram isolados de *Hepatozoon* sp. em ácaros da Ordem Trombidiforme, um deles era oriundo de um lagarto gecko, corroborando com nossa suspeita. Estudos futuros de competência vetorial tornam-se necessários, no intuito de confirmar essa hipótese.

Os dados de L150 e L20 deste estudo obtidos da filogenia e da identidade de 100% no alinhamento par a par com as sequências de lagartos *A. ameiva* da Amazônia (Picelli et al, 2020), além das características de similaridade morfológica e espécie hospedeira, corroboram para afirmação de que ambas pertençam à mesma espécie *H. ameivae*. Ambas também se agruparam no mesmo haplótipo (H13), como observado na rede de haplótipos (Figura 6 e Figura 7). A sequência L150 é a primeira da espécie a apresentar tamanho de um fragmento do gene 18S rRNA superior a 1.000 pb, fornecendo uma melhor caracterização molecular de *H. ameivae*. Além disso, mesmo sendo de regiões geograficamente distantes, duas do Distrito Federal (presente estudo), e as outras do Amazonas, elas compartilham 100 % de identidade entre si. Mais estudos são necessários para avaliar se há fluxo gênico desse agente entre as populações dessas duas regiões. Se há fluxo gênico, tais achados lançam conjecturas de como esse fluxo pode ocorrer biologicamente? Atuação de dispersão dessas espécies por vários biomas, carreamento por vetores, migração acidental?

Dois redes de haplótipos foram construídas, utilizando somente isolados de *Hepatozoon* sp. de lagartos, serpentes e roedores do Brasil. Uma rede contendo os isolados por estados e a outra, com base em grupo de hospedeiros (lagartos, serpentes e roedores), sendo a primeira rede de haplótipos contendo isolados de répteis e roedores no Brasil.

Na rede de estados, os haplótipos com maior número de sequências, em sua maioria, possuem sequências de diferentes unidades federativas, como observado nos haplótipos H8, H13, H16 e H18 de répteis, apresentando distâncias geográficas consideráveis, como demonstrado pelo haplótipo H13, entre Distrito Federal e Amazonas. Além disso, observa-se que o grupo *Hepatozoon* em répteis e roedores possui alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica, o que significa a existência de um grande número de haplótipos que se distinguem por poucas mutações. Isso evidencia a diversidade genética desse grupo e a necessidade de detecção e caracterização molecular de mais isolados nesses hospedeiros (Tabela 7).

Outras localidades já identificaram a presença de *H. ameivae*, sendo descrita pela primeira vez em Minas Gerais (Carini e Rudolph, 1912), posteriormente no Pará (Lainson et al, 2003), Rio de Janeiro (Sabagh et al. 2015) e Amazonas (Picelli et al, 2020), tendo apenas o trabalho de Picelli et al. (2020) e o presente estudo dados moleculares e morfológicos associados. Outro fato importante é a presença do mesmo hospedeiro *A. ameiva*, em todos os relatos de identificação. A espécie *A. ameiva* se apresenta com uma vasta distribuição geográfica, amplamente distribuído na América do Sul e estados brasileiros, sendo considerado um lagarto ubíquo e generalista, com grande capacidade de adaptação, inclusive a áreas degradadas (Vitt e Colli, 1994, Picelli et al, 2020). Tal grau de difusão, parece favorecer a disseminação do agente através de vetores invertebrados infectados, corroborando com a possibilidade de fluxo gênico observado entre as regiões de Brasília e Amazonas. Devido ao número limitado de dados moleculares de *H. ameivae* disponíveis nos bancos de dados de sequências, tornaram as inferências limitadas, atribuindo apenas estas duas regiões do Brasil. No entanto, abrem-se perspectivas para a realização de mais estudos, utilizando a taxonomia integrativa. Nossos resultados, fortalecem a hipótese de *A. ameiva* atuar de forma específica como hospedeiro intermediário *H. ameivae*.

A proximidade de sequências de répteis a isolados de pequenos mamíferos é algo frequentemente visto na literatura. Em geral, um dos clados formados pelo gênero *Hepatozoon*, agrupa isolados de répteis e pequenos mamíferos, como os roedores (Hamšíková, Z. et al, 2016; De Sousa, et al, 2017; Perles et al, 2019; Zechmeisterová et al, 2021). Explorações sobre essas relações levantam suposições da importância dos roedores dentro da epidemiologia de *Hepatozoon* em répteis. Na tentativa de elucidar desses questionamentos, foram realizados ensaios moleculares/estatísticos para tal, trazendo resultados significativos. Dados obtidos através da rede de haplótipos por grupo de hospedeiros expõem que o conjunto de sequências de roedores demonstram-se

distantes e distintos dos isolados de répteis. Para confirmação de forma estatística, análises bayesiana de estruturação e de variância molecular foram implementadas, corroborando com bom suporte estatístico ($p < 0,05$) e $F_{ct} = 0,43 / F_{st} = 0,051$ ($p < 0,001$), respectivamente, com os resultados obtidos pela rede de haplótipos por grupos. Validando a presença de estruturação genética entre os isolados brasileiros de *Hepatozoon* de hospedeiros da ordem Squamata quando comparados à ordem Rodentia. Esta estruturação evidencia que os roedores provavelmente não são um componente importante na epidemiologia de transmissão de *Hepatozoon* entre répteis, embora ainda possam participar, como observado na análise bayesiana (Figura 8). Talvez, tais similaridades estejam mais relacionadas a uma transmissão acidental por compartilhamento de vetores invertebrados infectados, podendo gerar adaptações gênicas aos novos hospedeiros.

5. Conclusão

Os resultados obtidos através deste estudo demonstram a ocorrência de 8,9% de lagartos do Cerrado brasileiro infectados por *Hepatozoon* spp., identificados por meio de detecção molecular, sendo oito destes, positivos similarmente por microscopia óptica. Relata também, a presença de pelo menos uma nova espécie de *Hepatozoon* sp. em lagartos *T. semitaeniatus*, assim como, o primeiro relato da atuação dessa espécie como hospedeira. Apresenta novos isolados de *H. ameivae* em lagartos *A. ameiva*, dessa vez, presentes no Brasil Central. Nossa descrição amplia a faixa de distribuição geográfica conhecida de *H. ameivae*, e levanta a possibilidade de fluxo gênico entre populações de diferentes unidades federativas, como também aumenta os indicativos de especificidade de hospedeiro. Além disso, destaca-se a primeira rede de haplótipos entre sequências de roedores e répteis, validando a presença de diferenciação genética entre essas ordens. Por fim, nosso estudo abre perspectivas para realização de mais pesquisas que somarão com os dados até o momento obtidos, no intuito de elucidar lacunas existentes, para construção de taxonomias mais estruturadas e melhor entendimento da epidemiologia de *Hepatozoon* em répteis.

REFERÊNCIAS

ANDRÉ, Marcos Rogério et al. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 102022, 2022.

BARTA, John R. et al. Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171-180, 2012.

BORGES-NOJOSA, Diva M. et al. A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. **Systematic parasitology**, v. 94, n. 1, p. 65-72, 2017.

BROMWICH, Carl R.; SCHALL, Jos J. Infection dynamics of *Plasmodium mexicanum*, a malarial parasite of lizards. **Ecology**, v. 67, n. 5, p. 1227-1235, 1986.

CARINI, A.; RUDOLPH, M. Sur quelques hématozoaires de lézards au Brésil. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 5, p. 592-595, 1912.

CARVALHO, ALG de. On the distribution and conservation of the South American lizard genus *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 (Squamata: Tropiduridae). **Zootaxa**, v. 3640, n. 1, p. 42-56, 2013.

CARVALHO, André LG; DE ARAÚJO, Alexandre FB; SILVA, Hélio R. da. Patterns of parasitism by *Eutrombicula alfreddugesi* (Oudemans) (Acari, Trombiculidae) in three species of *Tropidurus* Wied (Squamata, Tropiduridae) from Cerrado habitat of central Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, p. 1010-1015, 2006.

CH AISIRI, Kittipong et al. Diversidade ecológica e microbiológica de ácaros, incluindo vetores do tifo, em pequenos mamíferos em habitats estratificados na Tailândia. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2019.

CECHIN, Sônia Zanini; MARTINS, Marcio. Eficiência de armadilhas de queda (pitfall traps) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. **Revista brasileira de zoologia**, v. 17, p. 729-740, 2000.

COLLI, Guarino R. Reproductive ecology of *Ameiva ameiva* (Sauria, Teiidae) in the Cerrado of central Brazil. **Copeia**, p. 1002-1012, 1991.

COOK, Courtney A.; NETHERLANDS, Edward C.; SMIT, Nico J. First *Hemolivia* from southern Africa: reassigning chelonian *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to *Hemolivia* (Adeleorina: Karyolysidae). **African Zoology**, v. 50, n. 2, p. 165-173, 2015.

CRIADO-FORNELIO, A. et al. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93-99, 2006.

CUNHA-BARROS, M. et al. Patterns of infestation by chigger mites in four diurnal lizard species from a restinga habitat (Jurubatiba) of Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 393-399, 2003.

DAL VECHIO, Francisco et al. The herpetofauna of Parque Nacional da Serra das Confusões, state of PiauÍ, Brazil, with a regional species list from an ecotonal area of Cerrado and Caatinga. **Biota Neotropica**, v. 16, 2016.

DELFINO, M. M. S. et al. Pterygosomatidae and Trombiculidae mites infesting *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) (Tropiduridae) lizards in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p. 549-555, 2011.

DE CASTRO JACINAVICIUS, Fernando et al. New species of chiggers (Trombidiformes: Trombiculidae and Leeuwenhoekidae) from the conservation unit Parque Nacional da Serra das Confusões, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n. 1, p. 286-297, 2021.

DE SOUSA, Keyla Carstens Marques et al. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary parasitology**, v. 237, p. 37-46, 2017.

FERNÁNDEZ-SOTO, Pedro; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; ENCINAS-GRANDES, A. Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) captured in Spain. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 6, p. 1482-1483, 2001.

FIGUEIREDO, F. J. et al. Estudo preliminar da diversidade de pequenos mamíferos do Parque Nacional Serra das Confusões, PiauÍ, Brasil. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. p. 2007. p. 1-2.

HAMŠÍKOVÁ, Zuzana et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Hepatozoon* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. **Parasitology research**, v. 115, n. 10, p. 3897-3904, 2016.

HARRIS, David James; BORGES-NOJOSA, Diva Maria; MAIA, João Pedro. Prevalence and diversity of *Hepatozoon* in native and exotic geckos from Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 80-85, 2015.

KREIER, Julius P. et al. **Parasitic protozoa. Vol. 4 Gregarines, haemogregarines, coccidia, plasmodia, and haemoproteids**: Academic Press, New York, San Francisco, and London 1993.

LAINSON, Ralph; DE SOUZA, Manoel C.; FRANCO, Constância M. Haematozoan parasites of the lizard *Ameiva ameiva* (Teiidae) from Amazonian Brazil: a preliminary note. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1067-1070, 2003.

LITERAK, Ivan et al. Larvae of chigger mites *Neotrombicula* spp.(Acari: Trombiculidae) exhibited *Borrelia* but no *Anaplasma* infections: a field study including birds from the Czech Carpathians as hosts of chiggers. **Experimental and Applied Acarology**, v. 44, n. 4, p. 307-314, 2008.

MAIA-CARNEIRO, Thiago; ROCHA, Carlos Frederico Duarte. Diverging temporal and thermal niche dimensions favor syntopy of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata: Tropiduridae). **Biologia**, v. 76, n. 1, p. 133-146, 2021.

MAIA, João P.; CARRANZA, Salvador; HARRIS, D. James. Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: are more data needed?. **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 5, p. 549-552, 2016.

MCBRAYER, Lance D. et al. **Lizard ecology**. Cambridge University Press, 2007.

MENDOZA-ROLDAN, Jairo et al. Mites and ticks of reptiles and amphibians in Brazil. **Acta Tropica**, v. 208, p. 105515, 2020.

MENDOZA-ROLDAN, Jairo Alfonso et al. Molecular detection of vector-borne agents in ectoparasites and reptiles from Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 12, n. 1, p. 101585, 2021.

MIKALOUSKAS, Jefferson Simanas; SANTANA, Daniel Oliveira; FERRARI, Stephen Francis. Lizard predation *Tropidurus hispidus* (Squamata, Tropiduridae) by false coral snake *Oxyrhopus trigeminus* (Squamata, Dipsadidae) in the Caatinga, in northeastern Brazil. **Pesquisa e Ensino em Ciências Exatas e da Natureza**, v. 1, n. 1, 2017.

MUNHOZ SANCHES, Sidney; LOURENÇO-DE-MORAES, Ricardo; BARTH, Adriane. Diet of the lizard *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758)(Teiidae: Squamata) from northwestern Mato Grosso, Brazil. **Cuadernos de Herpetología**, v. 35, n. 2, 2021.

MUÑOZ-LEAL, Sebastián et al. Anaplasmatidae, *Borrelia* and *Hepatozoon* agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. **Acta Tropica**, v. 192, p. 91-103, 2019.

NAGY, Zoltán T. et al. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. **Plos one**, v. 7, n. 3, p. e34506, 2012.

NOGUEIRA, Cristiano; COLLI, Guarino R.; MARTINS, Marcio. Local richness and distribution of the lizard fauna in natural habitat mosaics of the Brazilian Cerrado. **Austral Ecology**, v. 34, n. 1, p. 83-96, 2009.

PASSOS, Daniel Cunha; LIMA, Daniel Cassiano; BORGES-NOJOSA, Diva Maria. A new species of *Tropidurus* (Squamata, Tropiduridae) of the semitaeniatus group from a semiarid area in Northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 2930, n. 1, p. 60–68-60–68, 2011.

PERKINS, Susan L.; KELLER, Anne K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 870-876, 2001.

PERLES, L. et al. Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Brazil. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

PICELLI, Amanda Maria et al. Redescription of *Hepatozoon ameivae* (Carini and Rudolph, 1912) from the lizard *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758). **Parasitology Research**, v. 119, n. 8, p. 2659-2666, 2020.

POINAR JR, G.; POINAR, R. Parasites and pathogens of mites. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 449-469, 1998.

RIBEIRO, Leonardo Barros. Ecologia comportamental de *Tropidurus hispidus* e *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) em Simpatria, em área de caatinga do nordeste do Brasil. 2010.

RIBEIRO, Leonardo B.; FREIRE, Eliza MX. Trophic ecology and foraging behavior of *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) in a caatinga area of northeastern Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 101, p. 225-232, 2011.

RODRIGUES, Miguel Trefaut. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo torquatus ao sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 31, n. 3, p. 105-230, 1987.

SABAGH, Leandro Talione et al. Low prevalence of hemoparasites in a lizard assemblage from a coastal environment in southeastern Brazil. **Herpetology Notes**, v. 8, p. 413-416, 2015.

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

ÚNGARI, Letícia Pereira et al. Diversity of haemogregarine parasites infecting Brazilian snakes from the Midwest and Southeast regions with a description of two new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae). **Parasitology International**, v. 89, p. 102587, 2022.

UJVARI, Beata; MADSEN, Thomas; OLSSON, Mats. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. **Journal of parasitology**, v. 90, n. 3, p. 670-672, 2004.

VITT, Laurie J.; COLLI, Guarino R. Geographical ecology of a neotropical lizard: *Ameiva ameiva* (Teiidae) in Brazil. **Canadian journal of zoology**, v. 72, n. 11, p. 1986-2008, 1994.

VITT, Laurie et al. Guia de Lagartos da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central/Guide to the Lizards of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazônia. 2008.

WECK, Bárbara C. et al. Novel genotypes of *Hepatozoon* spp. in small mammals, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2022.

ZECHMEISTEROVÁ, Kristína et al. Against growing synonymy: Identification pitfalls of *Hepatozoon* and *Schellackia* demonstrated on North Iranian reptiles. **European Journal of Protistology**, v. 79, p. 125780, 2021.

CAPÍTULO 3

Notável diversidade de espécies de *Plasmodium* em lagartos do Cerrado brasileiro, incluindo o relato de uma nova espécie.

Resumo

Parasito causador da malária saúria o gênero *Plasmodium* é conhecido por sua grande distribuição geográfica e diversidade taxonômica. O advento da biologia molecular traz subsídios importantes para recuperação das relações evolutivas desse agente, que até os dias atuais apresentam dados obscuros e subestimados, demonstrando papel significativo no desenvolvimento da taxonomia integrativa. Este estudo investigou, por meio de técnicas moleculares e análise microscópica, a ocorrência da infecção por *Plasmodium* em lagartos de vida livre do Cerrado brasileiro e a diversidade das espécies encontradas. No total, 302 lagartos passaram por triagem molecular e microscópica, 61 (20,2%) amostras apresentaram-se positivas na triagem molecular, incluindo 18 com resultado concordante na microscopia. Dezesesseis amostras foram sequenciadas, visando o gene mitocondrial *cyt b* de *Plasmodium* spp., sendo o primeiro levantamento molecular dessa ordem neste bioma. Os resultados obtidos apresentam grande diversidade entre e interespecies até então desconhecidas para essa região. Aqui não só descrevemos novos isolados de *Plasmodium ouropretensis*, *Plasmodium tropiduri tropiduri*, *Plasmodium kentropyxi*, *Plasmodium carmelinoi* e *Plasmodium azurophilum*, como o relato de uma nova espécie de *Plasmodium* sp. A identificação inédita de *Plasmodium azurophilum* no Brasil amplia a faixa de distribuição mundial deste agente, bem como de seu hospedeiro *Hoplocercus spinosus*, apontando primeira descrição de infecção por organismos pertencentes ao Filo apicomplexa nesta espécie. Ademais, todas as informações contidas neste trabalho abrem um leque notável para grandes estudos em um território que por muitos anos permaneceu inexplorado.

Palavras-chave: *Plasmodium*, Lagartos, *Cytb*, Cerrado, Brasil.

1. Introdução

Parasitas plasmodídeos ou também conhecidos como parasitos da malária, são protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, família Plasmodiidae. Possuem uma vasta diversidade taxonômica, apresentando distribuição por todos os continentes quentes, estando entre os parasitos protozoários intracelulares mais difundidos, onde exploram uma grande quantidade de hospedeiros invertebrados e vertebrados, como mamíferos, répteis e anfíbios (Levine, 1988; Perkins e Schall, 2002; Ferreira et al., 2020).

Historicamente, antes da descoberta da biologia molecular, parasitólogos realizavam classificações taxonômicas através da microscopia óptica. As identificações eram relacionadas a mudanças de hospedeiros, características na história de vida, vetores, habitat. No entanto, após a inclusão dos teste moleculares, a precisão dessas classificações tem sido questionada (Perkins e Schall, 2002; Pineda-Catalan et al., 2013; Van As et al., 2016). Segundo Perkins e Schall, (2002), os traços morfológicos visualizados na microscopia de luz são muitas vezes distorcidos pela preservação, e os traços da história de vida podem evoluir de forma convergente com base nas pressões ecológicas experimentadas pelos parasitos. Estudos utilizando dados moleculares apresentam histórias evolutivas independentes para parasitos morfológicamente semelhantes (Perkins, 2000; Palinauskas et al., 2015; Córdoba et al., 2021), voltando-se à importância da taxonomia integrativa.

A conceituação para delimitação de espécies para hemosporídeos é uma questão que gera controvérsia no meio científico (González et al., 2019; Córdoba et al., 2021). Autores como Hellgren et al. (2007) e Valkiūnas et al. (2009) sugerem que linhagens *cytb* do gênero *Haemoproteus* com distância genética maior que 5% estão associadas a espécies diferentes. Apesar disso, no próprio estudo de Hellgren et al. (2007), duas morfoespécies diferiram em apenas 0,7%. Distância genética de 3% para o gênero *Plasmodium* em lagartos podem ser um indicador de espécies diferentes, mesmo com semelhança na morfologia (Perkins, 2000; González et al., 2019). No entanto, em recente estudo, *Plasmodium ouropretensis* foi descrito por Córdoba et al. (2021), que identificaram duas linhagens filogenéticas distintas de amostras com morfologia semelhantes a *Plasmodium tropiduri tropiduri*, e com distância genética média do gene *cytb* de 2,7%. Variações médias de 1,7% a 4, 8% de distância genética entre sequências *cytb* para espécies de *Plasmodium* em répteis têm sido encontradas (Córdoba et al., 2021),

demonstrando a importância do uso concomitante de ferramentas morfológicas, genéticas e ecológicas para uma classificação taxonômica acurada.

Investigações envolvendo *Plasmodium* em lagartos com dados moleculares associados são escassos no Brasil (Harris et al., 2019; Ferreira et al., 2020; Córdoba et al., 2021). Picelli et al. (2020), apresentam um levantamento morfológico de hemoparasitos em lagartos na região da Amazônia brasileira, onde a ordem Haemosporida apresentou maior prevalência de animais infectados, demonstrando aparente difusão desse agente neste bioma. No Cerrado, até onde sabemos, não se apresentam relatos com dados moleculares de *Plasmodium* em lagartos e os dados morfológicos dessa ordem são escassos e pontuais (Carini, 1941; Lainson et al., 1971).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo, investigar por meio de técnicas moleculares e análise microscópica, a ocorrência da infecção por *Plasmodium* em lagartos de vida livre do Cerrado brasileiro, bem como, a identificação e diversidade das espécies encontradas, sendo o primeiro levantamento molecular dessa ordem neste bioma.

2. Material e Métodos

2.1 Captura dos animais e locais de amostragem

As capturas e punção venosa dos animais foram realizadas em regiões pertencentes ao bioma Cerrado do Brasil: nas áreas da Reserva Ecológica do IBGE (15°56'41''S e 47°53'07''W), Distrito Federal; do Parque Nacional Serra das Confusões (44°25'20.31"W, 9°28'1.11"S, 44°21'33.91"W, 9°25'20.17"S, 44°19'56.14"W, 9°28'26.74"S, 44°18'27.14"W, 9°27'47.49"S), Piauí; e Parque Nacional Mário Viana (14.706632°, 52.352665°), Mato Grosso. Foram avaliados trezentos e dois (302) lagartos de vida livre, capturados através de armadilhas de interceptação e queda (Cechin & Martins, 2000), no período de janeiro de 2018 a janeiro de 2020, identificados de acordo com Nogueira, Colli, Martins (2009) (Tabela Suplementar 1). A colheita da amostra sanguínea foi realizada pela veia caudal ventral ou jugular, respeitando o limite de até 10% da massa corporal, com a utilização de agulhas de calibre 25x7 ou 20x5, dependendo do tamanho do animal e seringas de 1ml previamente rinsada com EDTA, evitando coagulação da amostra durante a colheita. As coletas de sangue foram realizadas sempre no período da manhã. Esfregaços de sangue foram preparados em duplicata ainda no campo, em lâminas de vidro específicas para a microscopia, usando cerca de 5 µl da

amostra de sangue inicial. Os esfregaços foram secos ao ar em temperatura ambiente e armazenados até a coloração.

As amostras foram armazenadas em caixa térmica refrigerada até o retorno ao laboratório de campo, onde foi centrifugado para a separação do plasma e concentrado de células e posteriormente congelados. O concentrado de células e os esfregaços foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília para a realização dos testes moleculares e análise microscópica, respectivamente.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, sob o número 43/2019, assim como pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número 62568-2.

2.2 Análise Microscópica

Os esfregaços foram corados pelo método de Rosenfeld e as lâminas foram montadas com Entelan e lamínulas para preservação da qualidade do material a longo prazo.

Para a pesquisa de hemoparasitos, os esfregaços foram analisados em microscópio óptico Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) no aumento de 400x e 1000x por até 20 minutos (Bromwich & Schall, 1986). As lâminas de amostras parasitadas foram cuidadosamente examinadas e as imagens capturadas por uma câmera digital Leica DM750 acoplada e processadas com LAS V4.8 (Leica Microsystems Suiza Limited 2015).

2.3 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA das amostras foi extraído a partir de 10 µl de sangue, com auxílio de kits comerciais (Illustra Blood genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare®, Piscataway, NJ.), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. O DNA foi testado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene citocromo oxidase subunidade I (*COI*), específico para répteis (Nagy et al., 2012), para confirmar a presença de material genômico de répteis e assegurando a qualidade das amostras extraídas.

As amostras de DNA foram submetidas a PCR para amplificação parcial do gene citocromo b (*cyt b*), com a utilização dos oligonucleotídeos 3760F (5'-GAGTGGATGGTGTTTTAGAT-3') e 4292R (5'-TGGAACAATATGTARAGGAGT-

3'), geralmente utilizados para a detecção de *Haemoproteus* e *Plasmodium*, amplificando um fragmento de 533pb (Beadell et al. 2004).

Amostras positivas foram submetidas a novos testes moleculares para parasitos hemosporídeos através da *Nested* PCR, com a utilização dos oligonucleotídeos descritos por Pacheco et al. (2020), que possuem como região alvo o gene mitocondrial citocromo b (cyt b, 1,131 pb). Nesta PCR foram utilizados os oligonucleotídeos externos AE298 (5'-TGTAATGCCTAGACGTATTCC-3') e AE299 (5'-GTCAAWCAAACATGAATATAGAC-3'), seguindo as mesmas condições descritas por Pacheco et al. (2020), e os oligonucleotídeos internos AE064 (5'-TCTATTAATTTAGYWAAAGCAC-3') e AE066 (5'-GCTTGGGAGCTGTAATCATAAT-3').

As condições da *Nested* PCR foram: volume final de 25µL na reação com solução tampão 10X, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,25µL de TaqDNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,µL de DNA, 1,0µL de cada oligonucleotídeo (10 mM). O protocolo de amplificação consistiu na desnaturação inicial a 94°C por 1 min, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 61°C por 1 minuto e 72°C por 2 min, com extensão final de 10 min a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (533 pb) e 1,0% (1,131 pb), corados em banho de brometo de etídio, e examinados sob luz transiluminadora UV (UV transiluminator®, UVP LLC, Upland,32 CA). Todas as amostras foram testadas em duplicata (Biorad® C1000TM Thermal Cycler, Hercules, CA.). Para controle negativo foi utilizada água ultrapura *Milli-Q*® autoclavada e controle positivo, amostras de DNA de animais naturalmente infectados por Hemosporídeos previamente sequenciados. As amostras que apresentaram melhores reações e concentrações de DNA foram selecionadas para sequenciamento.

2.4 Purificação de produtos das PCRs, sequenciamento e análise genética

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®, Calsbad, CA), conforme recomendações do fabricante, e suas sequências foram determinadas em sequenciador automático por método de Sanger, em sequenciador automático com 96 capilares ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA), utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada PCR realizada.

A trimagem e a análise da qualidade das sequências foram realizadas por meio do programa Geneious v. 9.0.5. Uma sequência consenso de cada isolado foi construída, e o cromatograma e o “Phred quality score” avaliados. A ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) foi empregada utilizando as sequências do presente estudo por meio do banco de dados “non-redundant” (nr). As sequências do presente estudo serão depositadas no banco de dados GenBank.

A árvore filogenética foi construída por análise bayesiana utilizando fragmentos parciais do gene citocromo b (cerca de 500 nt) de 48 isolados de *Plasmodium* oriundos de répteis do Brasil e de outros continentes. O alinhamento foi realizado usando o algoritmo Clustal Omega. A árvore com máxima credibilidade foi construída com o software BEAST v2.6.3 por meio do modelo "General Time Reversible" (GTR) com distribuição gama (+G) e sítios invariantes (I+) como matriz de substituição de acordo com o programa jModelTest v2.1.10. Foi utilizado o modelo de relógio molecular estrito assumindo tamanho populacional constante como modelo demográfico. O algoritmo Monte Carlo Markov Chain (MCMC) foi realizado ao longo de 10.000.000 gerações amostradas a cada 1.000. Os primeiros 25% das gerações foram descartados como "burn-in" por meio do programa TreeAnnotator v1.8.4. A convergência dos parâmetros foi avaliada pelo programa Tracer v1.7.1. Uma sequência da espécie *Hemoproteus columbae* foi utilizada como grupo externo.

A distância genética p para as sequências obtidas no presente estudo foi calculada no programa MEGA X. Foram incluídas na matriz as sequências que mais se aproximavam filogeneticamente dos isolados, as que possuíam menor e-value no BLASTn e as que possuíam no mínimo 500 nt. O modelo empregado foi “Kimura 2-parameter” (K2P). O parâmetro alpha foi estimado previamente.

3. Resultados e Discussão

No presente estudo foram coletadas 20 espécies de lagartos e analisadas 302 amostras de DNA por meio da PCR. Sessenta e uma (61/302) amostras de lagartos foram positivas para *Plasmodium* spp. (Tabela 1 e 2), destas, houve visualização de gametócitos intra-eritrocitários em dezoito (18) esfregaços sanguíneos. No intuito de realizar a caracterização molecular, as 61 amostras positivas na triagem, foram novamente testadas, dessa vez, utilizando *Nested* PCR, com oligonucleotídeos descritos por Pacheco et al. (2020) (Tabela 1), amplificando 44 amostras, onde, dezesseis (16/44), representadas pelas espécies *Ameiva ameiva*, *Ameivula ocellifera*, *Copeoglossum*

nigropunctatum, *Hoplocercus spinosus*, *Notomabuya frenata*, *Tropidurus itambere* e *Tropidurus oreadicus* apresentaram melhores reações e concentrações de DNA e foram selecionadas para sequenciamento. Sendo este, o primeiro e mais extenso levantamento molecular e microscópico de agentes hemospóridios infectando uma ampla quantidade de espécies de lagartos de vida livre já realizado no Cerrado brasileiro.

Tabela. 1 Relação das amostras por espécies de lagartos positivas para hemospóridios na análise molecular (PCR) e microscópica, de acordo com a região de colheita e sexo.

IDENTIFI CAÇÃO	ESPÉCIE	REGIÃO	SEXO	TRIAGEM (PCR)	NESTED (PCR)	ESFREGAÇÃO SANGUÍNEO
84	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	F	+	+	-
105	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	M	+	+	-
150	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	NI	+	+	+
L165*	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	F	+	+	+
169	<i>Ameiva ameiva</i>	PI	F	+	+	+
176	<i>Ameiva ameiva</i>	MT	F	+	+	+
L168*	<i>Ameiva ameiva</i>	DF	F	+	+	-
L169*	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	+	+
L170*	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	F	+	+	+
238	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	+	-
72	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	NI	+	-	-
74	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	NI	+	-	-
87	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	F	+	-	-
89	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-	-
96	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-	-
101	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-	-
104	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-	-
110	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	NI	+	-	-
124	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	F	+	-	-
127	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-	-
140	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	-	-
240	<i>Ameivula ocellifera</i>	PI	M	+	+	-
81	<i>Brasiliscincus heathi</i>	PI	M	+	-	-
204	<i>Brasiliscincus heathi</i>	PI	M	+	-	-
9	<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	DF	M	+	+	+
L171*	<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	DF	M	+	+	-
206	<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	DF	M	+	+	-
L172*	<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	DF	M	+	+	-
205	<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	DF	M	+	-	-
L173*	<i>Hoplocercus spinosus</i>	PI	M	+	+	-
L174*	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	+
L175*	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	+
33	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	+
43	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	-
51	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	M	+	+	-
54	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	M	+	+	-
L177*	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	M	+	+	+
64	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	-

L154*	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	M	+	+	+
L179*	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	M	+	+	-
281	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	-
282	<i>Notomabuya frenata</i>	DF	F	+	+	-
L180*	<i>Tropidurus itambere</i>	DF	F	+	+	+
91	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	-	-
94	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	-	-
97	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	-	-
L181*	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	+	+
83	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	+	-
88	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	+	-
100	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	+
132	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	+
137	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	-
144	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	-
151	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	NI	+	+	-
165	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	+
L185*	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	+	+
180	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	-
221	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	+	-
224	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	-
L186*	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	F	+	+	-
229	<i>Tropidurus oreadicus</i>	PI	M	+	+	-

Legenda: M: Macho; F: Fêmea; NI: Não identificado; *(Sequências deste estudo).

Tabela. 2 Espécies e número de animais testados na triagem molecular através dos oligonucleotídeos cytb 3760F e 4292R (533pb).

ESPÉCIES	Nº ANIMAIS POSITIVOS	Nº ANIMAIS NEGATIVOS	TOTAL
<i>Ameiva ameiva</i>	7	20	27
<i>Ameivula ocellifera</i>	15	14	29
<i>Brasiliscincus heathi</i>	2	17	19
<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	5	29	34
<i>Hoplocercus spinosus</i>	1	8	9
<i>Notomabuya frenata</i>	12	7	19
<i>Tropidurus itambere</i>	1	25	26
<i>Tropidurus oreadicus</i>	18	46	64
<i>Colobosaura modesta</i>	0	1	1
<i>Enyalius capetinga</i>	0	10	10
<i>Gymnodactylus</i>	0	1	1
<i>Hemidactylus brasilianus</i>	0	5	5
<i>Iguana iguana</i>	0	5	5
<i>Micrablepharus maximiliani</i>	0	6	6
<i>Polychrus acutirotris</i>	0	1	1
<i>Salvator merianae</i>	0	1	1
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	0	43	43
<i>Tropidurus hispidus</i>	0	1	1
<i>Tropidurus torquatus</i>	0	1	1
TOTAL	61	241	302

As sequências oriundas da espécie hospedeira *Notomabuya frenata* da região do Distrito federal (L174, L177, L178, L179 e L175) formaram um clado monofilético de bom suporte, distantes filogeneticamente de espécies de *Plasmodium* sp. já descritas (Figura 1). O clado formado compõe somente sequências obtidas neste estudo, sem nenhum isolado anteriormente conhecido participando do mesmo clado. Estas sequências apresentam 100% de identidade entre elas, com exceção de L175, apresentando 99,7% de identidade entre as demais, diferindo-se em apenas dois nucleotídeos.

Outro clado monofilético com bom suporte inclui as sequências L174, L177, L178, L179 e L175 também foi gerado, porém acrescido das sequências L171 e L172 (Figura 1). Esses dois últimos isolados são provenientes da espécie *Copeoglossum nigropunctatum*, coletados no Distrito Federal e apresentaram 98,2% de identidade e 1,8% de distância genética p entre si (Tabela 4). Ao analisar a identidade entre as sequências L171 e L172 com as L174, L177, L178, L179, as identidades obtidas foram de 98,9% e 98%, respectivamente. Para o isolado L175 foi obtida identidades de 98,6% e 97,7% , respectivamente.

As identidades obtidas de 97,7% a 100% entre sete sequências (L171, L172, L174, L177, L178, L179 e L175), de lagartos das espécies *Notomabuya frenata* e *Copeoglossum nigropunctatum*, bem como as distâncias genéticas destas sequências com outras espécies de *Plasmodium* em lagartos até o momento identificadas (Tabela 4) demonstram tratar-se da mesma espécie de *Plasmodium* sp. A estruturação dessas sequências em clado monofilético de bom suporte, com a formação de um clado independente (Figura 1) reiteram esta classificação. Os dados conjuntamente também evidenciam a presença de uma espécie inédita de *Plasmodium* sp. infectando lagartos *N. frenata* e *C. nigropunctatum* na região do Distrito Federal. Estes dados não só alimentam a ciência com dados inéditos, mas também com dados robustos, descrevendo esta nova espécie a partir de sete isolados, incluindo duas espécies hospedeiras distintas e em uma região, até onde sabemos, nunca antes estudada. Dados são necessários para pesquisas em hemoparasitos de répteis, visto que a amostragem limitada resulta na falta de táxons de hospedeiros reptilianos e em alguns casos, pode interferir na sustentação da classificação de espécies e até mesmo em subdivisão de gêneros (Gozález et al., 2019).

Neste estudo, o gênero *Tropidurus* foi parasitado por dois isolados (L180 e L181). No BLASTn a sequência L180 oriunda de lagarto da espécie *Tropidurus itambere*, obtida na região do Distrito Federal, demonstrou 99,36% de identidade com 100% de cobertura para o isolado MW491390 de *Plasmodium ouropretensis* depositado no GenBank (Tabela 3). Já a amostra L181 coletada na região do Piauí em *Tropidurus oreadicus*,

apresentou 100% de identidade com 100% de cobertura para o isolado MW491389 de *Plasmodium ouropretensis* depositado no GenBank (Tabela 3).

Na árvore filogenética é possível observar que as duas sequências se agruparam no mesmo clado com bom suporte (Figura 1). A identidade observada entre os isolados L180 e L181, foram de 99,4%, diferindo em três nucleotídeos. Ambas as amostras, apresentam esfregaços sanguíneos com presença de hemácias infectadas com estruturas sugestivas de parasitas hemosporídeos (Figura 2).

Os índices de identidade no BLASTn e a formação de um clado monofilético bem suportado visualizado no filograma entre os isolados do gênero *Tropidurus* L180 e L181 (Figura 1) e as sequências de *Plasmodium ouropretensis* depositadas no Genbank (Tabela 3), trazem subsídios que confirmam a presença de mais dois isolados de *Plasmodium ouropretensis* no Brasil, nas regiões do Distrito Federal e Piauí, aumentando o conhecimento de geodistribuição desse agente em lagartos, que até então só havia relato em *Tropidurus torquatus* no Sudeste do Brasil (Córdoba et al., 2021). Essa espécie foi recentemente descrita por Córdoba et al. (2021), onde identificou duas linhagens filogenéticas distintas de amostras com morfologia semelhantes a *P. tropiduri tropiduri*, uma infectando eritrócitos e outra infectando células não eritrocitárias em lagartos. A linhagem encontrada através de infecção em eritrócitos demonstrou compartilhamento de seu ancestral comum mais recente com espécies de *Plasmodium* que infectam eritrócitos detectados na Colômbia (*P. carmelinoi* e *P. kentropyxi*) (Matta et al., 2018), sendo descrita como *P. tropiduri tropiduri*, conferindo o primeiro relato com dados morfológicos e moleculares desta espécie. A linhagem não eritrocítica, formou um clado bem sustentado com *P. leucocytica*, parasito que infecta glóbulos brancos de lagartos nas ilhas do Caribe (Telford, 2009; Córdoba et al., 2021), propondo que os parasitos não eritrocitários detectados nesse estudo, fossem elevados ao nível de espécie sendo descritos como *P. ouropretensis* (Córdoba et al., 2021).

Curiosamente, no presente estudo, os dados conflitaram com Córdoba et al. (2021) que em seu trabalho, descrevem *P. ouropretensis* como espécie que apresenta estruturas morfológicas somente em trombócitos e células semelhantes a linfócitos. No entanto, em nosso estudo, ambos os isolados L180 e L181 apresentaram hemácias infectadas com estruturas sugestivas de parasitas hemosporídeos no esfregaço sanguíneo (Figura 2), com presença de massa pigmentar amarelo-ouro (Figura 2a) como descrito em espécies *P. tropiduri* (Telford, 2009). Infelizmente, tivemos problemas com a qualidade de coloração de algumas lâminas, incluindo a amostra L181, o que nos impossibilitou realizar uma análise morfológica mais detalhada. No entanto, é possível reconhecer,

estruturas sugestivas nos eritrócitos. Além disso, exames de PCR são mundialmente conhecidos pela sua alta sensibilidade na detecção de DNA de agentes, inclusive em baixa parasitemia quando não são encontradas estruturas parasitárias em esfregaço sanguíneo (Myjak, P., et al., 2002; Rodulfo, H., et al 2007)

Antecedendo algumas hipóteses para compreensão dessa divergência, foram respondidas algumas suposições possíveis: A primeira possibilidade, seria a presença de coinfeção de nossas amostras com espécies de *Plamosdium* sp. eritrocitárias. Córdoba et al. (2021), inclusive sugerem a possibilidade de *P. ouropretensis* sempre ser encontrado em simpatria com populações de *P. tropiduri tropiduri*. No entanto, não foram observadas sobreposições de picos duplos no cromatograma do sequenciamento, o que geralmente é observado em situações de coinfeção quando isolados são sequenciados por técnicas que não envolvam clonagem molecular (Schoener, E. R., et al., 2020). Também foram realizados exames moleculares para outros agentes das ordens das Hemogregarinas e Tripanosomatídeos (dados não publicados) nas mesmas amostras, todas com resultados negativos. E o terceiro ponto e não menos importante, destaca-se pela presença dessa linhagem em dois hospedeiros de espécies distintas (*T. oreadicus* e *T. itambere*) e de regiões opostas do Brasil (DF e PI).

Scorza (1971), em estudo experimental, identificou estágios trombocitários em um *T. torquatus* infectado experimentalmente com o até então *P. tropiduri*, que apresentava infecção em eritrócitos. Parasitos nas hemácias foram visualizados 11 dias após a inoculação, com o pico no 73º dia, seguido de um período de latência de 4 meses, com baixíssimo número de eritrócitos parasitados. Nesse período, foram observados os estágios intratrombocitários. Apresentando evidências que, até aquele momento descrito como *P. tropiduri*, pode produzir tanto ciclos merogônicos quanto gametogônicos em trombócitos assim como nos eritrócitos (Scorza, 1971; Telford, 2009). Talvez, esse ciclo eritrocitário também possa ocorrer em *P. ouropretensis* e as estruturas eritrocíticas aqui identificadas, façam parte do período de latência citada por Scorza (1971) em *P. tropiduri*, corroborando a baixíssima parasitemia observada nos esfregaços sanguíneos.

Essas informações mudam a perspectiva atualmente conhecida sobre *P. ouropretensis* e salienta a importância de cada vez mais estudos envolvendo hemoparasitos em lagartos, para o surgimento de novas inferências, como aqui demonstradas. Processos de plasticidade fenotípica talvez possam influenciar nessa fisiologia, induzidas pelo tipo de vetor ou região geográfica. Dessa forma, se *P. ouropretensis* possui ou não um ciclo eritrocítico, é algo que necessita mais estudos.

As sequências L185 e L186 obtidas de lagartos *Tropiduros oreadicus* do Piauí, apresentaram 99,7% de identidade entre si. Ao analisar os valores de identidade obtidos pelo BLASTn (Tabela 3), a sequência L185 apresenta 99,78% de identidade com 100% de cobertura para o isolado MW491388 de *P. tropiduri tropiduri* identificado em lagarto *T. torquatus* no Brasil. Já a sequência L186 apresenta 100% de identidade com 100% de cobertura para a sequência MK033605 de *Plasmodium* sp. em lagarto *Tropidurus hispidus* brasileiro. Na árvore filogenética, ambas se agrupam em um clado contendo isolados de *Plasmodium* sp. (MK033603 e MN540150) e *P. tropiduri tropiduri* (MW491387) identificados no Brasil (Figura 1).

Através dos dados de identidade que variaram de 99,78% a 100% e análise filogenética com a formação de clado monofilético bem suportado, foi possível atribuir as sequências L185 e L186 como novos isolados de *P. t. tropiduri*. Também incluímos nessa classificação, os isolados até então descritos como *Plasmodium* sp., as sequências depositadas MK033603 em *Hemidactylus mabouia* descrito por Harris et al. (2019) e MN540150 em *Strobilurus torquatus* por Ferreira et al. (2020), todos da região nordeste do Brasil. As mesmas sequências apresentaram 99,9% e 99,6% de identidade, respectivamente, com a espécie *P. t. tropiduri* descrita por Córdoba et al. (2021), que, conjuntamente com as amostras deste estudo, apresentaram-se agrupadas em clado bem suportado com a espécie *P. t. tropiduri*.

Duas sequências foram derivadas de lagartos *Ameivula ocellifera* (L169 e L170), coletados na região do Piauí, apresentando 98,8% de identidade entre os isolados acima descritos. A sequência L169 expressou 99,39% de identidade com a sequência MF177708 de *Plasmodium kentropyxi* da Colômbia, obtida em lagarto *Cnemidophorus cf. gramivagus* (Tabela 3). Na árvore filogenética, L169 encontra-se formando um clado monofilético de bom suporte com *Plasmodium kentropyxi* colombiano (KY653753), apresentando 99,4% de identidade, com 5 nucleotídeos diferentes (Figura 1).

L170 (procedente *A. ocellifera*) apresentou 98,7% de similaridade com *P. kentropyxi* (MN540144), visualizado na árvore filogenética, onde se agrupa em conjunto com sequências de *P. kentropyxi* identificadas em lagartos *Strobilurus torquatus* do Brasil, porém não apresentou bom suporte (Figura 1), fato possivelmente relacionado ao tamanho (479pb) das sequências brasileiras depositadas no banco de dados moleculares.

Os resultados obtidos através das sequências L169 e L170 apresentaram a descrição de mais duas linhagens de *P. kentropyxi* no Brasil, sendo a primeira no bioma Cerrado e em lagartos da espécie *A. ocellifera*. A diversidade intraespecífica dessa espécie é algo que chama atenção. Embora nem todos os clados estejam com bom suporte, nossos

isolados, pertencentes à mesma espécie hospedeira *A. ocellifera* e à mesma região geográfica, estado do Piauí, apresentaram seu ancestral comum mais recente com isolados diferentes, L169 com *P. kentropyxi* colombiano (Matta et al., 2018) e L170 com sequências de *P. kentropyxi* do Brasil (Ferreira et al., 2020). Nenhuma das sequências de *P. kentropyxi* descritas em lagartos até o momento (Matta et al., 2018; Ferreira et al., 2020; Este estudo), apresentaram 100% de identidade entre si. A identidade global entre estes isolados apresenta-se em 99,1%. Mais sequências são necessárias para que uma adequada caracterização da diversidade genética dessa espécie seja obtida.

Os isolados provenientes da espécie de lagartos *A. ameiva*, coletados nos estados do Piauí (L165) e Distrito Federal (L168), apresentaram 98,6% de identidade entre si. O isolado L165 demonstrou 100% de identidade com 100% de cobertura para *Plasmodium* sp. (MK033604), oriunda de lagarto *A. ameiva*, similarmente observada em nosso isolado (Tabela 3).

Na árvore filogenética, L168 agrupa-se com MK033604 e AY099047, formando um clado de bom suporte. A sequência L168 obtida de lagarto *A. ameiva* do Distrito Federal, apresentou 99,88% de identidade, com 100% de cobertura para MF177709 de *P. carmelinoi* identificada na Colômbia em lagarto da mesma espécie (Tabela 3). Na árvore filogenética, observa-se que nosso isolado se agrupa em um clado monofilético de bom suporte com a mesma espécie *P. carmelinoi* (KY653755) (Figura 1).

Através dos resultados encontrados em L165 e L168, foi possível atribuir mais duas sequências a *P. carmelinoi* no Brasil, dessa vez nos estados do Piauí e Distrito Federal. Além das identidades de 99,88% e 100% encontradas, foi observada a formação de um grande clado com dois subclados monofiléticos bem suportados, onde L168 apresenta-se associado ao isolado identificado na Colômbia (Matta et al., 2018) e L165 aos isolados MK033604 (Harris et al., 2019) e AY099047 (Perkins e Schall, 2002) do Brasil, aqui já descritos como *P. carmelinoi*. Ambos os isolados (MK033604 e AY099047), apresentaram distância genética de 1,4% e 1,8% respectivamente, do isolado da Colômbia. Outro fato importante, é a presença da mesma espécie hospedeira em todos os estudos em que se relata esta espécie de *Plasmodium* em lagartos (Perkins e Schall, 2002; Lainson et al., 2010; Matta et al., 2018; Harris et al., 2019; Picelli et al., 2020 e este estudo), apresentando-se a espécie *A. ameiva* como suposto hospedeiro intermediário específico para *P. carmelinoi*.

O isolado L173, derivado de um lagarto *Hoplocercus spinosus* do Piauí, apresentou 98% de identidade com 100% de cobertura para a sequência AY099055 de *Plasmodium azurophilum* em lagarto *Anolis oculatus* da Dominica. Com distância

genética de 1,9%, utilizando um alinhamento de 907 pb. *P. azurophilum* foi descrito por Telford em 1975, identificada por possuírem duas linhagens geneticamente distintas, uma linhagem infectando eritrócitos e outra acometendo leucócitos, sendo a espécie leucocitária, derivada da linhagem eritróide, alterando sua história de vida para realizar infecção na classe de glóbulos brancos (Perkins e Schall, 2002; Telford, 2009). A linhagem leucocitária foi posteriormente denominada *Plasmodium leucocytica* por Telford (2009).

Até o momento, *P. azurophilum* possui identificação em espécies de lagartos do gênero *Anolis* na região do Caribe (Perkins e Schall, 2002; Telford, 2009; Otero et al, 2018). O isolado L173 deste estudo, apresentou 98% de identidade com 100% de cobertura e distância genética de 1,9%, para a linhagem eritróide de *P. azurophilum* (AY099055) em *A. oculatus* da Dominica (Perkins e Schall, 2002). Na árvore filogenética, não se observa os isolados correspondentes em um clado monofilético, porém, apresentam o ancestral comum próximo entre eles. Talvez, para essa espécie específica, o citocromo b, com esse tamanho de fragmento e nessa região, não apresente uma resolução filogenética suficiente para agrupar todos no mesmo grupo. Entretanto, a reunião de todos os dados obtidos, nos possibilita atribuir uma nova linhagem *P. azurophilum*, pela primeira vez descrita no Brasil, bem como a inclusão de um novo hospedeiro, dessa vez em *H. spinosus*, estendendo a distribuição geográfica e de hospedeiros para essa espécie. Até onde sabemos, esse também é o primeiro relato de infecção de organismos pertencentes ao Filo Apicomplexa em lagartos *H. spinosus* no mundo.

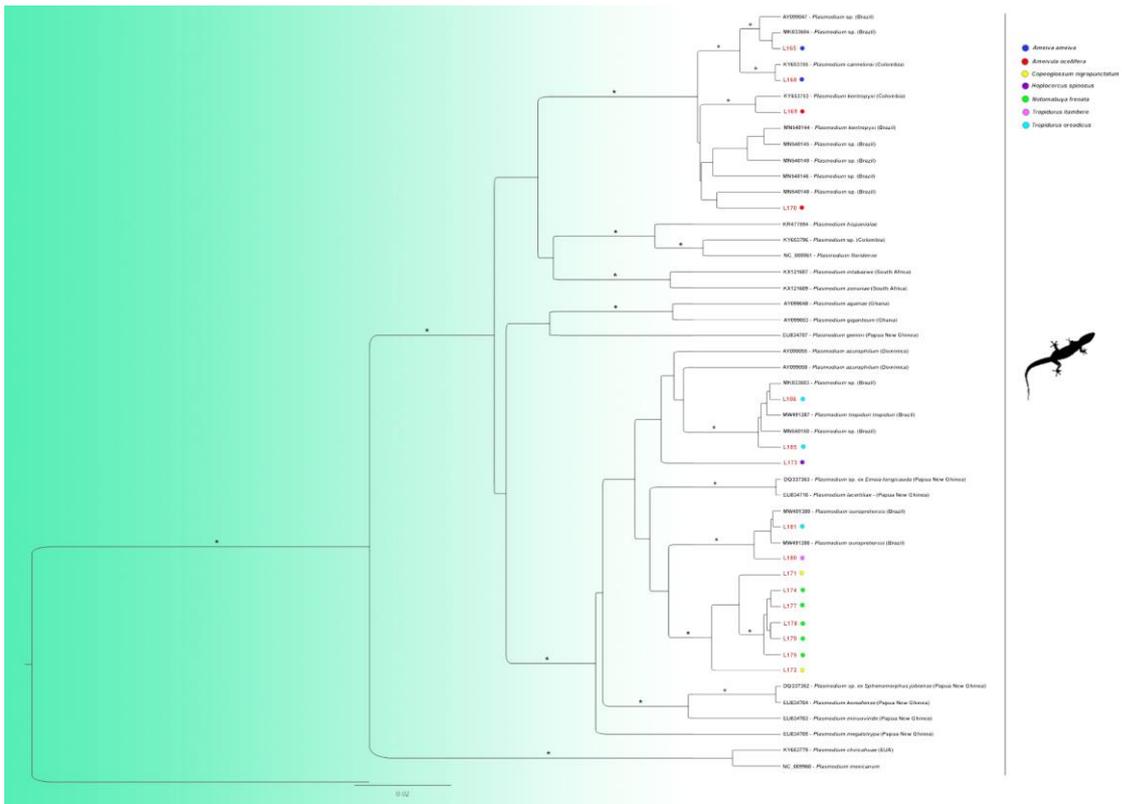


Figura. 1 Árvore filogenética obtida por análise bayesiana de fragmentos parciais do gene *cytb* (452 nt) de 48 isolados de *Plasmodium*. Probabilidades posteriores iguais a 0,90 ou mais são representadas por asteriscos. As sequências obtidas no presente estudo se encontram destacadas com círculos coloridos de acordo com a espécie hospedeira identificada.

Tabela. 3 Valores de identidade apresentados através da análise BLASTn dos isolados testados (E-value = 0.0).

SEQUÊNCIAS	TAMANHO DA SEQUÊNCIA (BP)	IDENTIDADE (%)	COBERTURA (%)	SEQUÊNCIAS COM MAIOR IDENTIDADE	PAÍSES	HOSPEDEIRO
L165	559	100%	100%	<i>Plasmodium sp.</i> isolate TEC6560 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial. MK033604.1	Brasil	<i>A. ameiva</i>
L168	834	99.88%	100%	<i>Plasmodium carmelinoi</i> clone GU040C cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial MF177709.1	Colômbia	<i>A. ameiva</i>
L169	823	99.39%	100%	<i>Plasmodium kentropyxi</i> clone GU027A cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial. MF177708.1	Colômbia	<i>Cnemidophorus cf. gramivagus</i>
L170	831	98.19%	100%	<i>Plasmodium carmelinoi</i> clone GU040C cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial. MF177709.1	Colômbia	<i>A. ameiva</i>
L171	788	98.22%	100%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA mitochondrion, complete genome MW491389.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L172	582	97.93%	99%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG123 clone UFMG123DAA mitochondrion, complete genome. MW491390.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L173	907	98%	100%	<i>Plasmodium azurophilum</i> from <i>Anolis oculatus</i> cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial gene for mitochondrial product. AY099055.1	Dominica	<i>Anolis oculatus</i>
L174	672	97.47%	100%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA mitochondrion, complete genome. MW491389.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L175	672	97.17%	100%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA mitochondrion, complete genome. MW491389.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L177	908	97.80%	100%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA mitochondrion, complete genome. MW491389.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L178	788	97.59%	99%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA mitochondrion, complete genome. MW491389.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L179	873	97.71%	100%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>

L180	621	99.36%	100%	mitochondrion, complete genome. MW491389.1 <i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG123 clone UFMG123DAA mitochondrion, complete genome. MW491390.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L181	637	100%	100%	<i>Plasmodium ouropretensis</i> isolate UFMG37 clone UFMG37DA mitochondrion, complete genome. MW491389.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L185	919	99.78%	100%	<i>Plasmodium tropiduri</i> tropiduri isolate UFMG141 clone UFMG141A mitochondrion, complete genome. MW491388.1	Brasil	<i>Tropidurus torquatus</i>
L186	869	100%	100%	<i>Plasmodium</i> sp. isolate TEC4983 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial. MK033605.1	Brasil	<i>Tropidurus hispidus</i>

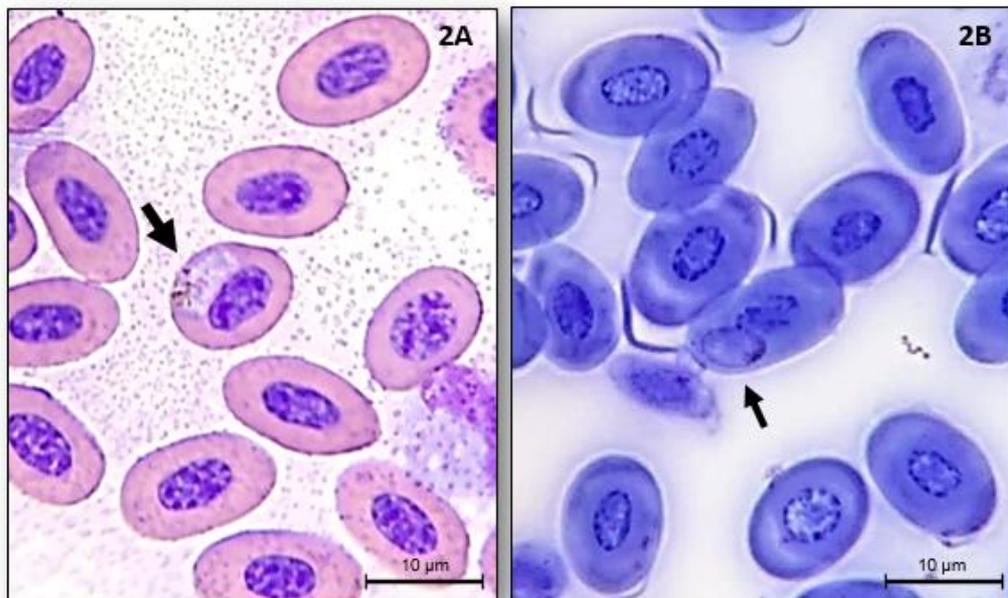


Figura. 2 Parasitos hemosporídeos identificados nas amostras L180 (2A) e L181 (2B).

4. Conclusão

A grande diversidade de espécies de *Plasmodium* sp. encontradas em espécimes de lagartos dentro do bioma Cerrado e áreas de transição, foi surpreendente. Aqui foi obtido o primeiro levantamento da infecção por *Plasmodium* em lagartos de vida livre do Cerrado brasileiro por meio de técnicas moleculares e análise microscópica, descrevemos novos isolados de *P. ouropretensis*, *P. t. tropiduri*, *P. kentropyxi*, *P. carmelinoi* e *P. azurophilum*, bem como à descrição de uma nova espécie de *Plasmodium* sp. a partir de uma análise robusta abrangendo seis isolados e duas espécies hospedeiras, contemplando uma marcada diversidade intraespecífica também observada para algumas espécies. Ampliamos a faixa de distribuição mundial para espécies e hospedeiros, incluindo o relato inédito de *P. azurophilum* em *H. spinosus* no Brasil. Este estudo também aumenta o suporte sobre indícios de especificidade hospedeira, além de salientar a importância da continuidade de pesquisas para o surgimento de novas inferências, que complementem as lacunas atualmente existentes.

REFERÊNCIAS

BEADELL, Jon S. et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 12, p. 3829-3844, 2004.

BROMWICH, Carl R.; SCHALL, Jos J. Infection dynamics of *Plasmodium mexicanum*, a malarial parasite of lizards. **Ecology**, v. 67, n. 5, p. 1227-1235, 1986.

CARINI, A. Sobre um *Plasmodium* endoglobular de um lagarto. **Arq Biol**, v. 25, p. 46-47, 1941.

CECHIN, Sônia Zanini; MARTINS, Marcio. Eficiência de armadilhas de queda (pitfall traps) em amostragens de anfíbios e répteis no Brasil. **Revista brasileira de zoologia**, v. 17, p. 729-740, 2000.

CÓRDOBA, Oscar Hernandez et al. *Plasmodium ouropretensis*, n. sp., a new case of non-erythrocytic species within lizard malaria parasites. **Parasitology**, v. 148, n. 12, p. 1467-1474, 2021.

FERREIRA, Francisco C. et al. Molecular and pathological investigations of *Plasmodium* parasites infecting striped forest whiptail lizards (*Kentropyx calcarata*) in Brazil. **Parasitology Research**, v. 119, n. 8, p. 2631-2640, 2020.

GONZÁLEZ, Leydy P. et al. *Haemocystidium* spp., a species complex infecting ancient aquatic turtles of the family Podocnemididae: First report of these parasites in *Podocnemis vogli* from the Orinoquia. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 10, p. 299-309, 2019.

HARRIS, D. James et al. Molecular screening of *Plasmodium* (Haemosporidia: Plasmodiidae) parasites from reptiles in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 6, p. 913-917, 2019.

HELLGREN, Olof et al. Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 889-896, 2007.

LAINSON, R.; FRANCO, C. M.; DA MATTA, R. *Plasmodium carmelinoi* n. sp.(Haemosporida: Plasmodiidae) of the lizard *Ameiva ameiva* (Squamata: Teiidae) in Amazonian Brazil. **Parasite**, v. 17, n. 2, p. 129-132, 2010.

LAINSON, R.; LANDAU, Irène; SHAW, J. J. On a new family of non-pigmented parasites in the blood of reptiles: Garniidae fam. nov.,(Coccidiida: Haemosporidiidea). Some species of the new genus *Garnia*. **International Journal for Parasitology**, v. 1, n. 3-4, p. 241-250, 1971.

LEVINE, NORMAN D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **The Journal of protozoology**, v. 35, n. 4, p. 518-520, 1988.

MATTA, Nubia E. et al. *Plasmodium* parasites in reptiles from the Colombia Orinoco-Amazon basin: a re-description of *Plasmodium kentropyxi* Lainson R, Landau I, Paperna I, 2001 and *Plasmodium carmelinoi* Lainson R, Franco CM, da Matta R, 2010. **Parasitology research**, v. 117, n. 5, p. 1357-1370, 2018.

MYJAK, P. et al. Usefulness of PCR for diagnosis of imported malaria in Poland. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 215-218, 2002.

NAGY, Zoltan T. et al. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. **Plos one**, v. 7, n. 3, p. e34506, 2012.

NOGUEIRA, Cristiano; COLLI, Guarino R.; MARTINS, Marcio. Local richness and distribution of the lizard fauna in natural habitat mosaics of the Brazilian Cerrado. **Austral Ecology**, v. 34, n. 1, p. 83-96, 2009.

OTERO, Luisa et al. The drivers and consequences of unstable *Plasmodium* dynamics: a long-term study of three malaria parasite species infecting a tropical lizard. **Parasitology**, v. 146, n. 4, p. 453-461, 2019.

PACHECO, M. Andreína et al. The endangered California Condor (*Gymnogyps californianus*) population is exposed to local haemosporidian parasites. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

PALINAUSKAS, Vaidas et al. Description of the first cryptic avian malaria parasite, *Plasmodium homocircumflexum* n. sp., with experimental data on its virulence and development in avian hosts and mosquitoes. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 51-62, 2015.

PERKINS, Susan L.; SCHALL, JosJ. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 972-978, 2002.

PERKINS, Susan L. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1459, p. 2345-2350, 2000.

PICELLI, Amanda M. et al. Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscopy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.

PINEDA-CATALAN, Oscar et al. Revision of hemoproteid genera and description and redescription of two species of chelonian hemoproteid parasites. **The Journal of parasitology**, v. 99, n. 6, p. 1089-1098, 2013.

RODULFO, H. et al. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 535-543, 2007.

SCHOENER, E. R. et al. Presence and diversity of mixed avian *Plasmodium* spp. infections in introduced birds whose distribution overlapped with threatened New Zealand endemic birds. **New Zealand veterinary journal**, v. 68, n. 2, p. 101-106, 2020.

SCORZA, J. V. Asexual and sexual stages of a malaria parasite in the thrombocytes of *Tropidurus torquatus* (Iguanidae) infected with *Plasmodium tropiduri*. **The Journal of Protozoology**, v. 18, n. 3, p. 403-410, 1971.

TELFORD, Sam Rountree. **Hemoparasites of the Reptilia**. CRC Press, 2009.

TELFORD JR, Sam R. Saurian malaria in the Caribbean: *Plasmodium azurophilum* sp. nov., a malarial parasite with schizogony and gametogony in both red

and white blood cells. **International Journal for Parasitology**, v. 5, n. 4, p. 383-394, 1975.

VALKIŪNAS, Gediminas et al. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 6, p. 1512-1515, 2009.

VAN AS, Johann et al. A new lizard malaria parasite *Plasmodium intabazwe* n. sp.(Apicomplexa: Haemospororida: Plasmodiidae) in the Afromontane *Pseudocordylus melanotus* (Sauria: Cordylidae) with a review of African saurian malaria parasites. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.

CAPÍTULO 4

Considerações finais

O presente estudo apresenta uma ampla diversidade de hemoprotozoários infectando lagartos no Cerrado brasileiro, abrangendo relatos inéditos de espécies de *Hepatozoon* sp. e *Plasmodium* sp., ampliando faixa de distribuição geográfica conhecida de agentes e hospedeiros, como também intensifica o suporte sobre indícios de especificidade hospedeira. O Cerrado era carente desse tipo de estudo em lagartos, que são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre a distribuição das espécies e elucidação da história evolutiva desses agentes.

Ressalta-se, a primeira rede de haplótipos entre sequências de *Hepatozoon* spp. de roedores e répteis obtida neste estudo. Onde foi possível, levantar a possibilidade de fluxo gênico entre populações de diferentes unidades federativas e validar a existência de diferenciação genética entre essas ordens.

A abundância de espécies de lagartos obtidas nesta pesquisa, demonstra a riqueza da herpetofauna do Cerrado, apresentando um alto grau de espécies endêmicas. Estas, estão sob constante ameaça de extinção, devido a perda de habitat, oriunda da crescente e veloz expansão da agropecuária e ações antrópicas, fazendo do Cerrado um atual hotspot de biodiversidade.

Finalmente, todos esses dados aqui reunidos trazem importantes contribuições e abre perspectivas para realização de mais pesquisas, aumentando assim o suporte científico para a elucidação de lacunas atualmente encontradas e construção de taxonomias mais estruturadas com melhor entendimento da epidemiologia de parasitos do Filo Apicomplexa infectando répteis.

CAPÍTULO 5

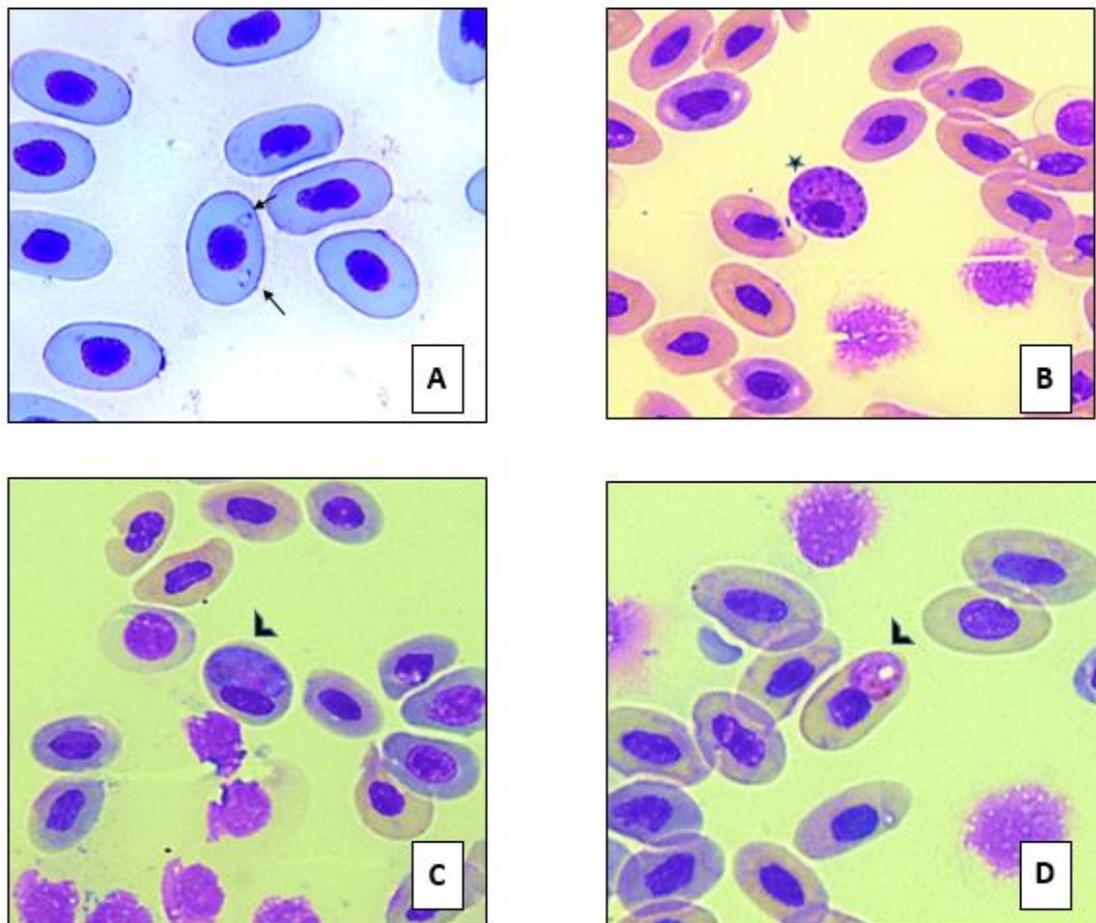
Perspectivas futuras

As medidas morfométricas dos parasitos em lâminas serão realizadas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) para vincular características morfológicas com linhagens moleculares e posterior classificação taxonômica das espécies encontradas neste estudo. Subsequentemente, será realizada a submissão do artigo ao periódico escolhido.

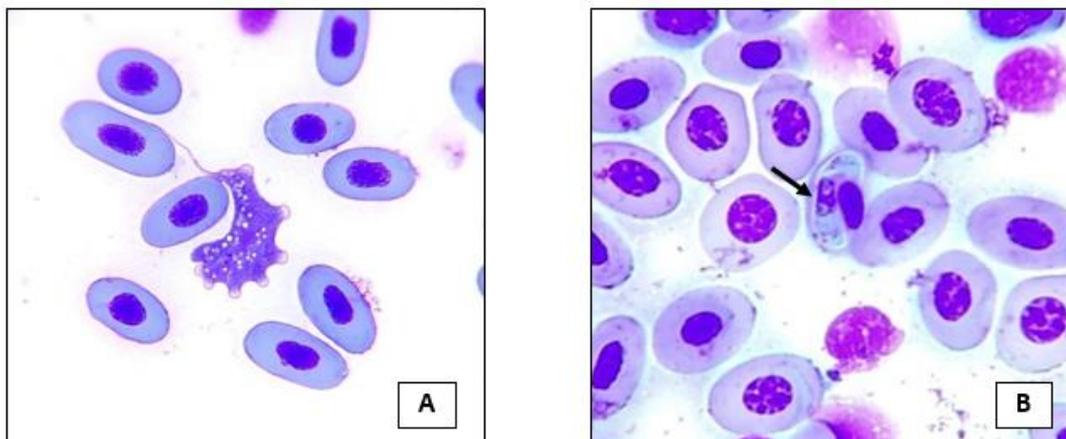
A riqueza de dados encontrados neste trabalho, nos mostra o quão rico e pouco estudado o Cerrado se apresenta. Sabemos da contribuição do nosso estudo para o meio científico, não só para o enriquecimento de dados sobre hematozoários no Brasil Central, como também, efetivo suporte para estudos futuros, principalmente voltados para a detecção de possíveis vetores, ciclos de vida, relação vetor/hospedeiro e potenciais zoonóticos desses agentes.

Por fim, ensinamos que este estudo amplie a compreensão sobre a importância desse bioma para a biodiversidade e o quanto ações antrópicas podem influenciar na alteração de micro-habitats, gerando efeitos em todos os seres que ali habitam. O desequilíbrio da biodiversidade provoca grandes impactos ambientais, afetando a vida de todos os seres, incluindo os humanos. Esperamos que trabalhos futuros possam ser incentivados, no intuito de superar as limitações ainda existentes, trazendo cada vez mais conhecimento científico para o Cerrado e auxílio para a sociedade no apoio à sua conservação.

ANEXO



Anexo 1. Parasitos hemosporídeos identificados em lagartos do Cerrado brasileiro. (A) Trofozoítos. (B) Meronte eritrocítico. (C e D) Gametócitos maduros.



Anexo 2. Parasitos hemiprotozoários encontrados em lagartos de Cerrado brasileiro. (A) *Trypanosoma* spp. infecção em *H. spinosus*. (B) Gametócito de *Hepatozoon* sp., infecção em *T. Semitaeniatus*.

Tabela Suplementar 1. Relação de espécies amostradas neste estudo de acordo com a região de coleta e sexo.

Espécie	Região		Sexo %			
			Macho	Fêmea	Jovem	NI
<i>Ameiva Ameiva</i>	DF	7	7,4	11,1	3,7	3,7
	PI	11	1,0	25,9	3,7	7,4
	MT	9	5,0	11,1	3,7	-
<i>Ameivula ocellifera</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	29	62,1	17,2	-	13,8
	MT	0	-	-	-	-
<i>Brasiliscincus heathi</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	19	52,6	10,5	-	36,8
	MT	0	-	-	-	-
<i>Colobosaura modesta</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	1	-	-	-	100,0
	MT	0	-	-	-	-
<i>Copeoglossum nigropunctatum</i>	DF	32	55,9	26,5	-	11,8
	PI	1	-	-	-	2,9
	MT	1	2,9	-	-	-
<i>Enyalius capetinga</i>	DF	10	26,3	26,3	-	-
	PI	0	-	-	-	-
	MT	9	-	-	-	-
<i>Gymnodactylus</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	1	-	-	-	100,0
	MT	0	-	-	-	-
<i>Hemidactylus brasilianus</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	5	-	-	-	100,0
	MT	0	-	-	-	-
<i>Iguana iguana</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	4	-	-	-	80,0
	MT	1	-	-	20,0	-
<i>Micrablepharus maximiliani</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	6	-	-	-	100,0
	MT	0	-	-	-	-
<i>Notomabuya frenata</i>	DF	20	40,0	45,0	-	15,0
	PI	0	-	-	-	-
	MT	0	-	-	-	-
<i>Polychrus acutirotris</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	1	-	100,0	-	-
	MT	0	-	-	-	-
<i>Salvator merianae</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	1	100,0	-	-	-
	MT	0	-	-	-	-
<i>Tropiduros oreadicus</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	1	-	100,0	-	-
	MT	0	-	-	-	-
<i>Tropidurus hispidus</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	1	-	-	-	100,0
	MT	0	-	-	-	-
<i>Tropidurus itambere</i>	DF	25	28,0	48,0	8,0	16,0
	PI	0	-	-	-	-
	MT	0	-	-	-	-
<i>Tropidurus oreadicus</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	63	42,9	47,6	3,2	1,6
	MT	0	-	-	-	-
<i>Tropidurus semitaeniatus</i>	DF	0	-	-	-	-
	PI	43	32,6	67,4	-	-
	MT	0	-	-	-	-
<i>Tropidurus torquatus</i>	DF	1	-	100,0	-	-
	PI	0	-	-	-	-
	MT	0	-	-	-	-