

TESE DE DOUTORADO

**BIODIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS ASSOCIADOS A ANFÍBIOS E
RÉPTEIS DAS REGIÕES CENTRO-OESTE E SUDESTE NO BRASIL**

Letícia Pereira Úngari

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu, SP

2023

**BIODIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS ASSOCIADOS A ANFÍBIOS E
RÉPTEIS DAS REGIÕES CENTRO-OESTE E SUDESTE NO BRASIL**

Letícia Pereira Úngari

Orientador: Prof. Dr. Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu, SP
2023

U57b

Úngari, Leticia Pereira

BIODIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS ASSOCIADOS A
ANFÍBIOS E RÉPTEIS DAS REGIÕES CENTRO-OESTE E
SUDESTE NO BRASIL / Leticia Pereira Úngari. -- Botucatu, 2023
241 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira

I. Parasitologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedicatória

.....

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Ubirajara e Ana;

À minha irmã, Beatriz;

A toda espiritualidade que me cerca e ampara.

Agradecimientos

Após todos esses anos de intenso trabalho, torna-se difícil elencar as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho. Dessa forma, gostaria de agradecer e deixar registrado meu carinho e amor a todos vocês:

Primeiramente, a Deus e toda espiritualidade que me cerca. Por me guiarem, me darem forças nos momentos difíceis e me protegerem nessa jornada incrível que foi o Doutorado. “Tudo posso naquele que me fortalece (Filipenses 4:13).”

Aos meus pais, Bira e Ana, pelo amor incondicional e por todo incentivo durante o Doutorado, principalmente, quando eu duvidava do meu potencial. Vocês são o princípio de tudo, eu amo vocês!

À minha irmã, que foi meu braço direito nessa jornada. Obrigada pela hospitalidade e pelas palavras de incentivo quando não estava bem. Você foi essencial para eu concretizar esse Doutorado.

À Donnatela, pelo amor incondicional. Por me trazer paz e calma nos momentos em que precisei.

Aos meus padrinhos, por todas as palavras de incentivo, conselhos e momentos alegres. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis. Eu amo vocês!

À minha prima, Gabriela, por sempre acreditar em mim e pela hospitalidade no início do doutorado. Obrigada por tudo!

À minha vizinha, Zilda, por todo amor e compreensão nos momentos em que estive ausente.

Aos familiares, Úngari e Pereira, por todo apoio durante o Doutorado.

À minha orientadora, Lucia Helena O'Dwyer, por toda paciência, sempre disposta a me ajudar com o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada por me receber tão bem durante o mestrado e me orientar no Doutorado. Você foi essencial nesses anos que se passaram. Hoje, minha consideração por você vai

além do profissional, você se tornou um presente em minha vida. Te amo “orientadora mais linda”.

Ao professor Reinaldo José da Silva, por desde o início, acreditar em mim e no meu potencial. Obrigada por sempre me auxiliar. Quantas vezes o senhor se dispôs a me ajudar, independente do dia e hora? Nunca vou esquecer. A conclusão dessa tese só foi possível com a sua ajuda. Obrigada por tudo!

Aos colegas de profissão da Parasitologia (UNESP), em especial Maria Regina, Edna, Cristiana, Diego, Pomba, Mariana, Enzo, Dona Lu e Olga, por todo apoio e incentivo durante esses anos de doutorado.

Ao professor André Luiz Quagliatto Santos, por me acompanhar desde a Iniciação Científica, principalmente com as coletas em campo. Obrigada por toda parceira, conversas e momentos alegres.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa e Ensino em Animais Silvestres (LAPAS - UFU), pelo acolhimento e atenção que tiveram comigo durante minhas idas à Uberlândia e viagens a trabalho.

Aos irmãos Rabello e Mel, por sempre estarem dispostos a ajudar nas coletas em campo. Obrigada por todo ensinamento passado durante às viagens.

À professora Marta Maria Geraldeteixeira da Universidade de São Paulo, por acreditar na minha pesquisa e me receber tão bem em seu laboratório. Obrigada por todos esses anos de incentivo e parceria. Sou muito grata e tenho um carinho enorme pela senhora.

Ao pessoal da USP, professor Erney Camargo, Evaristo, Gabriel, Carminha, Marta e Lyslaine, por todo auxílio e paciência. Sou muito grata por me receberem tão bem e tornar os dias de trabalho sempre leves e alegres.

Ao pós-doutando da USP, Bruno Rafael Fermíno, por me ensinar tudo que sei hoje sobre tripanosomatídeos. Por toda a assistência no laboratório. Sou muito grata.

Ao professor Alejandro Ocegüera-Figueroa, por acreditar e incentivar minha pesquisa desde o início. Obrigada por me receber tão bem em seu laboratório e por todo ensinamento passado.

Ao pessoal da Universidade Nacional Autónoma do México (UNAM), em especial Omar, Geraldo, Andrea e as Letícias, por toda hospitalidade, auxílio e paciência comigo durante o tempo em que estive por lá. Sou grata por tudo que me ensinaram, pelos momentos alegres e por toda a parceria.

À professora Marcia Cristina Cury. Embora não esteja vinculada à tese, foi quem me recebeu no início de tudo, durante a graduação, e me mostrou a pesquisa. Por toda paciência e dedicação comigo. Graças a você, hoje estou concluindo mais uma etapa, mais um sonho. Obrigada.

À minha querida amiga Vivi, e sua filha Ayumi, por toda hospitalidade e apoio durante esses anos de doutorado. Sou muito grata.

Aos meus amigos de Araruama, Botucatu e Uberlândia, por todo incentivo, e pela paciência nos momentos em que fui ausente. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por me darem forças nos momentos em que pensava em desistir. Obrigada por fazer dos meus dias mais leves e divertidos, por mostrar que a vida não precisa ser levada tão a sério. Eu amo vocês.

*Gratidão... resume e exprime toda minha essência e sentimento nesse
ciclo de vida que assim se finda.*

Pensamento

.....

*“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.*

*Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis”*

(José de Alencar)

Lista de figuras

Figura 1 (A-E): Esquema ilustrativo das rotas de transmissão das hemogregarinas entre hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Pág. 35

Figura 2: Morfotipos propostos por Dimond (1965) infectando o sangue de anuros.

Pág. 52

Figura 3: Representação do gene ribossômico (rDNA) constituído pela subunidade menor (SSU), subunidade maior (LSU) e espaços internos transcritos (ITS).

Pág. 57

Figura 4: Representação esquemática de dois genes codificadores de enzimas: Gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase citosólica (cGAPDH) e glicossômica (gGAPDH).

Pág. 58

Figura 5: Mapa das localidades que foram amostradas para hemoparasitos de répteis e anuros.

Pág. 66

Figura 6 (A-D): Captura e contenção de crocodilianos para coleta de sangue.

Pág.68

Figura 7: Coleta de sangue pelo seio paravertebral cervical em répteis (A-C) e confecção de extensões sanguíneas (D).

Pág. 69

Lista de tabelas

.....

Tabela 1: Lista de Localidades amostradas com suas respectivas coordenadas geográficas.

MT = Mato Grosso; GO = Goiás; MS = Mato Grosso do Sul; SP = São Paulo.

Pág. 65

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para haemogregarinas de anfíbios e répteis coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.

Pág. 72

Tabela 3: Condições do ciclo para cada par de oligonucleotídeos utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para haemogregarinas de anfíbios e répteis coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.

Pág. 73

Tabela 4: Oligonucleotídeos e ciclos de amplificação e temperatura utilizados nas diferentes Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de tripanossomas de anuros coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.

Pág. 75

Tabela 5: Lista de espécies de répteis e anfíbios coletados nos estados Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil, no presente estudo.

Pág. 80

Tabela 6: Lista de répteis e anfíbios infectados com hemoparasitos identificados através da análise morfológica em microscopia óptica convencional.

Pág. 82

Lista de abreviaturas

5S rRNA	RNA do gene 5S ribossomal
18S rRNA ou SSU 18S	Subunidade menor do rRNA de 18S
28S rRNA ou LSU 28S	Subunidade maior do rRNA de 88S
BAB	Meio Agar Sangue ou “Blood Agar Base”
BSA	Albumina bovina sérica
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido-trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
gGAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal
H₂O	Água
HCL	Ácido Clorídrico
KCL	Cloreto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
LB	Meio Luria-Bertani
LIT	Meio “Liver infusion triptose”
M	Molar
Mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
ML	Máxima Verossimilhança
mM	Milimolar
Nt	Nucleotídeo
°C	<i>Grau celsius</i>
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotação por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SFB	Soro fetal bovino
TCC/USP	“Trypanosomatid Culture Collection” da Universidade de São Paulo
TE	Tampão Tris-EDTA
UV	Luz ultravioleta
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

Este trabalho contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos: 2018/00754-9; 2018/09623-4

Sumário

.....

SUMÁRIO

Resumo	22
Abstract	25
1) Introdução	28
1.1) Introdução geral	29
1.2) O grupo das hemogregarinas	33
1.2.1) Família Haemogregarinidae	35
1.2.2) Família Hepatozoidae	37
1.2.3) Família Dactylosomatidae	44
1.2.4) Critérios taxonômicos e de diagnóstico para hemogregarinas	45
1.3) O gênero <u>Trypanosoma</u>	48
1.3.1) Classificação dos tripanossomas em anfíbios	49
1.3.2) Estudos moleculares de <u>Trypanosoma</u> em anfíbios	55
2) Justificativa	59
3) Objetivos	61
3.1) Objetivo Geral	62
3.2) Objetivos Específicos	62
4) Materiais e Métodos	63
4.1) Autorizações	64
4.2) Locais de estudo	64
4.3) População de estudo	67
4.4) Contenção e identificação dos animais	67
4.5) Ectoparasitos: coleta e armazenamento	68
4.6) Coleta e armazenamento dos fragmentos de órgãos	68
4.7) Preparo e análise das lâminas histológicas	69
4.8) Coleta, armazenamento e preparo das amostras de sangue	70
4.9) Cultivo <i>in vitro</i> dos tripanossomas	70
4.10) Análise morfológica dos hemoparasitos	71
4.11) Análise molecular	71
4.11.1) Hemogregarinas	71

4.11.2) Ectoparasitos: Sanguessugas	73
4.11.3) Tripanossomas	75
5) Resultado Geral	79
5.1) Hemoparasitos	81
5.2) Ectoparasitos	82
6) Referências	84
7) Capítulo 1	115
8) Capítulo 2	140
9) Capítulo 3	169
10) Capítulo 4	219
11) Capítulo 5	221
12) Capítulo 6	223
13) Capítulo 7	225
14) Capítulo 8	227
15) Capítulo 9	229
17) Conclusão	231
18) Anexos	234
19) Anexos (outros artigos)	238

Resumo

.....

RESUMO

O Brasil é considerado um país rico em fauna silvestre, sendo o terceiro colocado no ranking de biodiversidade de répteis e o primeiro colocado no ranking de biodiversidade de anfíbios. Entretanto, apesar de existirem estudos sobre parasitos nestes animais na região Neotropical, ainda há muito a se conhecer sobre a diversidade de parasitos neste grupo de animais. Com isso, o objetivo desse projeto foi identificar e caracterizar a biodiversidade de espécies de hemoparasitos (haemogregarinas e tripanossomas) e ectoparasitos (sanguessugas) associados a répteis e anfíbios procedentes das Regiões Centro-Oeste e Sudeste Brasileiras, abrangendo os Biomas Cerrado e Mata Atlântica considerados os principais em diversidade de herpetofauna. No total, foram coletadas amostras de sangue de 445 animais, sendo 136 répteis (45 crocodilianos, 45 testudines, 31 lagartos e 15 serpentes) e 309 anuros (54 sapos, 161 rãs e 94 pererecas), para análise morfológica, morfométrica e molecular dos hemoparasitos. Além disso, alguns animais foram eutanasiados para coleta de tecidos (fígado, baço, rim, coração e pulmão). Desse total, através da análise morfológica, foram observados 183 (41,30%) animais positivos. Dos 136 répteis, 80 (58,82%) estavam infectados, sendo 31 (68,88%) crocodilianos, 39 (86,66%) testudines e 11 (73,33%) serpentes. Dos anuros, 102 (33%) estavam infectados, sendo 2 (3,7%) sapos, 54 (33,54%) rãs e 46 (48,93%) pererecas. Quatro anuros estavam coinfectados com haemogregarinas e tripanossomas. Além disso, durante contenção desses animais, os mesmos foram inspecionados para presença de ectoparasitos, já que são considerados vetores de vários patógenos, e foram observadas sanguessugas aderidas aos quelônios aquáticos e ácaros em anuros e répteis coletados. Através das análises morfológicas e moleculares, foi possível identificar: tripanossomas acometendo anfíbios, três novas espécies de *Hepatozoon* e duas novas espécies de *Dactylosoma* (Dactylosomatidae) em anuros; três novas espécies de

Hepatozoon, além de *Hepatozoon cevapii* e *Hepatozoon cuestensis* acometendo serpentes; três possíveis novas espécies de *Hepatozoon* em crocodilianos *Caiman crocodilus*; seis novas espécies de *Haemogregarina* em testudines *Podocnemis uniflis* e *Podocnemis expansa*; e sanguessugas, consideradas possíveis vetores na transmissão de haemogregarinas em testudines brasileiros, com a identificação de uma nova espécie deste possível vetor. De acordo com as análises executadas até o momento, foi possível observar grande diversidade de hemoparasitos acometendo a herpetofauna das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Esse resultado reforça a necessidade de mais estudos sobre esses hemoparasitos, sendo a taxonomia prioritária nesse quesito, com a identificação e descrição dessa diversidade de parasitos (FAPESP: 2018/00754-9; 2018/09623-4).

Palavras-chave: anuros, répteis, biodiversidade, *Trypanosoma*, *Haemogregarina*, *Hepatozoon*, *Dactylosoma*, Brasil.

Abstract

.....

ABSTRACT

Brazil is considered a country rich in wild fauna, being the third place in the reptile biodiversity ranking and the first place in the amphibian biodiversity ranking. However, although there are studies on parasites in these animals in the Neotropical region, there are so much more to know about the diversity of these parasites. Thus, the objective of this project was to identify and characterize the biodiversity of hemoparasite species (haemogregarines and trypanosomes) and ectoparasites associated with reptiles and amphibians from the Center-West and Southeast regions of Brazil, covering the Cerrado and Atlantic Forest Biomes, considered the main in herpetofauna diversity. In total, blood samples were collected from 445 animals, 136 of which were reptiles (45 crocodilians, 45 testudines, 31 lizards and 15 snakes) and 309 anurans, for morphological, morphometric and molecular analysis. Besides, some animals were euthanized for tissue collection (liver, spleen, kidney, heart and lung) as well. Of this total, through morphological analysis, 183 (41.30%) positive animals were observed. Of the 136 reptiles, 80 (58.82%) were infected, being 31 (68.88%) crocodilians, 39 (86.66%) testudines and 11 (73.33%) snakes. Of the anurans, 102 (33%) were positive. Four anurans were co-infected with haemogregarines and trypanosomatids. In addition, during containment of these animals, they were inspected for the presence of ectoparasites, since they are considered vectors of several pathogens, and leeches were observed attached to some aquatic turtles and mites and ticks in reptiles and anurans. Through morphological and molecular analyses, it was possible to identify: trypanosomatids affecting amphibians, three new species of *Hepatozoon* and two new species of *Dactylosoma* (Dactylosomatidae) in anurans, three new species of *Hepatozoon* besides the identification of *Hepatozoon cevapii* and *Hepatozoon cuestensis* in Brazilian snakes, three possible new species of *Hepatozoon* in crocodilians of the species *Caiman*

crocodilus; six new species of *Haemogregarina* in testudines of the species *Podocnemis uniflis* and *Podocnemis expansa*, and leeches considered possible vectors in the transmission of haemogregarines in Brazilian testudines, with the identification of a new species of these probably vectors. According to the study, it was possible to observe a great diversity of hemoparasites affecting the herpetofauna of the Center-West and Southeast regions of Brazil. This result reinforces the need for further studies on these hemoparasites, with taxonomy being a priority in this regard, with the identification and description of this diversity of parasites (FAPESP: 2018/00754-9; 2018/09623-4).

Keywords: Anurans, biodiversity, reptiles, *Trypanosoma*, *Haemogregarina*, *Hepatozoon*, *Dactylosoma*, Brazil.

Introdução

1) INTRODUÇÃO

1.1) Introdução geral

O Brasil é considerado um país rico em variedade de espécies de répteis e anfíbios (Rodrigues, 2005; Silvano & Segalla, 2005). Segundo Costa *et al.* (2022), no território brasileiro há 848 espécies de répteis catalogadas, sendo 38 quelônios, seis jacarés, 82 anfisbenas, 292 lagartos e 430 serpentes, ocupando a terceira colocação mundial. Em relação aos anfíbios, o Brasil é o país com a maior riqueza e diversidade (Segalla *et al.*, 2021). Atualmente são conhecidas 1.188 espécies de anfíbios, amplamente distribuídas, das quais 1.144 espécies pertencem à ordem Anura, cinco espécies à ordem Caudata e 39 espécies pertencentes à ordem Gymnophiona Muller, 1832 (Frost, 2022). Entretanto, o número de espécies de répteis e anfíbios varia de acordo com o bioma (Maneyro & Carreira, 2006; Machado & Maltchik, 2007) e o conhecimento sobre estes animais nos biomas brasileiros, em especial Cerrado e Mata Atlântica, é considerado pobre se comparado a outras localidades mundiais (Sabino & Prado, 2000).

Em relação ao Cerrado, grande parte da biodiversidade de anfíbios e répteis está representada nesse bioma, e estimativas de riqueza indicam a ocorrência de 285 espécies de répteis e 215 espécies de anfíbios (Rêgo *et al.*, 2019).

A Mata Atlântica apresenta a maior riqueza de anfíbios e répteis dentre os biomas brasileiros (Segalla *et al.*, 2019). Este bioma comporta uma elevada diversidade de habitat e micro-habitat, favorecendo espécies especialistas em cada tipo de ambiente e, consequentemente, os endemismos (Marques *et al.*, 1998). Por comportar alta biodiversidade e sofrer os efeitos da perda de hábitat e modificação de seus remanescentes devido à ação humana, a Mata Atlântica e o Cerrado estão catalogados dentre os 34 *hotspots* mais ameaçados do mundo, colocando em risco toda essa biodiversidade (Myers *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Eterovick *et al.*, 2005; Mittermeier *et al.*, 2005). Além disso, reduzida a 12% de sua extensão original, a Mata Atlântica atualmente consiste em fragmentos descontínuos, como resultado de processos históricos de uso e ocupação do solo (Assis *et al.*, 2019). Registros do declínio e possíveis riscos de extinção de espécies de répteis e anfíbios, associados a mudanças climáticas, fragmentação e perda de habitat (Gibbons *et al.*, 2000; Carnaval *et al.*, 2006) têm alertado a comunidade científica sobre a necessidade de maior conhecimento sobre as espécies de répteis e anfíbios, bem como os parasitos que os acometem.

A diversidade de parasitos que acomete esses animais é grande e os estudos desses patógenos têm ganhado destaque em diferentes áreas do conhecimento, pois são amplamente utilizados como modelos ecológicos, com crescente constatação de que o parasitismo exerce papel fundamental na estrutura, dinâmica temporal e espacial de populações naturais com ação direta nos processos de competição e estabilidade de ecossistemas (Holmes & Price, 1986).

De acordo com Nasiri *et al.* (2014), praticamente 100% dos répteis de vida livre em todo o mundo são acometidos por algum agente infeccioso, podendo ser endoparasitos, como protozoários, helmintos, bactérias ou vírus, ou ectoparasitos, como sanguessugas, ácaros (mesostigmatas e metastigmatas), dentre outros. Dentre os hemoparasitos, as haemogregarinas, os tripanosomatídeos e os hemosporídios são os mais observados em répteis. Entretanto, há presença de outros grupos, como, piroplasmorida, parasitos procariotos (infecção clamidial e por rickettsias), microfilária e hemococcídios em lagartos (Telford, 2009; Úrsula *et al.*, 2014).

Em relação aos anfíbios, há relatos de hemococcídios, microfilarídeos, hemogregarinas e tripanosomatídeos, sendo este último o grupo mais comumente encontrado (Readel & Goldberg, 2010; O'Donoghue, 2017). Em um trabalho desenvolvido por Netherlands *et al.* (2015), sobre biodiversidade de hemoparasitos acometendo sapos procedentes da região de África do Sul, os autores relataram ocorrência de microfilarídeos, *Trypanosoma* spp. Grubi, 1843 (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) e hemogregarinas. Dentre as hemogregarinas, os autores observaram nos sapos *Hepatozoon* spp. Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) e *Dactylosoma* spp. Labbé, 1894 (Apicomplexa: Adeleina: Dactylosomatidae). Em consideração aos tripanosomatídeos, estes são continuamente relatados em todo o mundo acometendo os anfíbios da Ordem Anura Merrem, 1820, e métodos diagnósticos morfológicos e moleculares podem ser citados, como as de Malysheva (2014) e Bernal & Pinto (2016).

Quanto ao Brasil, mesmo sendo um país megadiverso em herpetofauna, hemoparasitos foram estudados em poucas espécies. Em relação aos répteis, de acordo com Bérnils e Costa (2012), há 36 espécies de testudines brasileiros catalogadas, mas somente a tartaruga de cabeça grande do amazonas, *Peltocephalus dumerilianus* (Schweigger, 1812); o jabuti-tinga, *Chelonoides denticulata*, (Linnaeus, 1766); o cágado de barbicha, *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812); a tartaruga pitiú, *Podocnemis sextuberculata* Cornalia 1849; a tracajá, *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) e a tartaruga da Amazônia, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), foram pesquisadas em

relação a alguma hemoparasitose (Lainson & Naiff, 1988; Campos-Brites & Ratin, 2004; Soares *et al.*, 2014; Picelli *et al.*, 2015; Pessoa *et al.*, 2016; Úngari *et al.*, 2018a). Dentre os trabalhos citados, Úngari *et al.* (2018a) descreveram uma nova espécie de hemoparasito, *Haemogregarina podocnemis* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae), em *P. unifilis* com auxílio da taxonomia integrativa.

Dentre as seis espécies de crocodilianos brasileiros existentes, o jacaré-tinga, *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758), e o jacaré do Pantanal, *Caiman yacare* (Daudin, 1801), são os mais estudados. Como exemplo, Viana *et al.* (2010) e Soares *et al.* (2017) pesquisaram *Hepatozoon caimani* Carini, 1909 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) em *C. yacare*.

Em relação à diversidade brasileira de lagartos, os principais estudos abrangem somente as famílias Iguanidae e Teiidae. Esses animais são acometidos, principalmente por hemosporídeos e hemogregarinas. Harris *et al.* (2015) analisaram 230 lagartos nativos e exóticos na América do Sul e observaram *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) nesses animais.

Até 1996, havia a descrição de 200 espécies de serpentes infectadas por alguma hemoparasitose nas regiões temperadas a tropicais (Smith, 1996). No Brasil, um dos principais estudos, até hoje, sobre prevalência de *Hepatozoon* spp. em serpentes brasileiras foi desenvolvido por Pessoa *et al.* (1974), os quais analisaram 2.128 indivíduos e observaram 17.1% de positividade em esfregaço de sangue. O Brasil possui 10 famílias de serpentes com 366 espécies catalogadas (Costa *et al.*, 2021). As três principais famílias de serpentes analisadas quanto à presença de hemoparasitos são Boidae, Colubridae e Viperidae. O'Dwyer *et al.* (2013) e Borges-Nojosa *et al.* (2017), por exemplo, relataram presença de espécies de *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) em *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) e *Philodryas nattereri* (Steindachner, 1870), respectivamente.

Além das hemogregarinas em répteis, os tripanossomas foram identificados, principalmente com auxílio de diagnóstico molecular (Viola *et al.*, 2009; Fermino *et al.*, 2015).

Nos anfíbios brasileiros, dentro da Ordem Anura, a mais predominante em diversidade de espécies no Brasil, há 20 famílias catalogadas (SBH, 2021), mas somente os indivíduos da família Hylidae Rafinesque, 1815 (perereca), Bufonidae Gray, 1825 (sapo) e Leptodactylidae Werner, 1896 (rã) foram datados com hemoparasitoses. Como exemplo, Leal *et al.* (2015) caracterizaram *Hepatozoon* spp. em duas espécies de anuros

(*Leptodactylus chaquensis* Cei, 1950 e *Leptodactylus podicipinus* Cope, 1862 no Pantanal (Mato Grosso do Sul), através do diagnóstico morfológico e molecular. Estudos relativamente recentes foram desenvolvidos sobre tripanossomas, como o de Ferreira *et al.* (2015), os quais analisaram 112 anuros procedentes do bioma Cerrado através da técnica molecular, e Attias *et al.* (2016), os quais fizeram caracterização ultraestrutural e análise filogenética desses tripanosomatídeos em *Leptodactylus* spp. procedentes do Pantanal brasileiro.

Em relação aos métodos diagnósticos, durante anos a descrição e identificação de espécies de hemoparasitos em répteis e anfíbios eram baseadas, somente, em critérios morfológicos das formas evolutivas sanguíneas, ou pelo encontro de parasitos em nova espécie de hospedeiro e/ou localidade (Siddall, 1995). Com isso, muitas das espécies descritas provavelmente não são mais espécies válidas. Em estudos posteriores, a utilização da análise morfológica das formas evolutivas sanguíneas e tissulares, presentes nos hospedeiros vertebrados, e cálculo morfométrico (medições de comprimento, largura e área do hemoparasito), começaram a ser empregados. Mesmo assim, algumas espécies, como as de *Trypanosoma*, apresentam morfologia e morfometria similares entre si e, no caso das hemogregarinas, mesmo entre os diferentes gêneros, há similaridade morfológica, sendo necessário outro método diagnóstico, como a análise molecular (Moço *et al.*, 2012; Fermino *et al.* 2015).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta valiosa, possui a capacidade de detectar espécies de agentes infecciosos, bem como analisar sua relação filogenética. Entretanto, para o grupo das hemogregarinas, a técnica molecular ainda é escassa utilizando oligonucleotídeos que amplificam regiões conservadas do gene 18S rRNA (Moço *et al.*, 2012; Dvořáková *et al.* 2013). Em relação aos tripanosomatídeos, estes apresentam mais dados moleculares, com descrição de oligonucleotídeos que amplificam regiões de genes variáveis (V7V8 SSU rRNA e gGAPDH), mas sem muitos estudos sobre esses parasitos em anfíbios e répteis brasileiros (Fermino *et al.*, 2015).

Dessa forma, para a caracterização da diversidade de espécies de hemoparasitos que acometem répteis e anfíbios brasileiros é necessária a utilização da taxonomia integrativa, a qual baseia-se no conjunto diagnóstico morfológico e morfométrico das formas evolutivas observadas no hospedeiro vertebrado (répteis) e nos vetores, bem como análise molecular com genes conservados e variáveis (18S rRNA, ITS-1, mitocondriais, dentre outros). Somente com a caracterização das espécies desses parasitos será possível inferir sobre a fauna de hemoparasitos que acometem estes hospedeiros

1.2) O grupo das *hemogregarinas*

O filo Apicomplexa (Levine, 1970) agrupa protozoários que apresentam estruturas conhecidas como complexo apical (Levine *et al.*, 1971), composto por elementos do citoesqueleto e pelas organelas secretórias especializadas chamadas roptrias, micronemas e grânulos densos (Siddall, 1995).

A caracterização desse filo segue a revisão de Levine *et al.* (1988), o qual é subdividido em quatro grupos (gregarinas, coccídios, hemosporídios e piroplasmas). Os agrupamentos são baseados, principalmente, por características biológicas e do ciclo de vida, como os hospedeiros, os vetores e quais tecidos do hospedeiro parasitam (Morrison, 2009).

Os parasitos pertencentes a esse filo possuem ciclo de vida complexo, podendo apresentar duas fases assexuadas, chamadas de merogonia e esporogonia, e uma sexuada, conhecida como gametogonia. São os únicos entre os eucariotos a apresentar ontogenia de reprodução cíclica (Siddall, 1995). O gametócito masculino se diferencia em um ou mais microgametas e fertiliza o macrogameta, ou gameta feminino, originando o zigoto (gametogênese). Este se diferencia em oocistos contendo esporozoítos (esporogênese). Em seguida, no hospedeiro, os esporozoítos invadem célula e diferenciam-se em merozoítos, estes se dividem até duas vezes assexuadamente (merogonia primária e merogonia secundária) gerando várias células filhas, também chamadas de merozoítos. Em seguida, diferencia-se em gametócitos (gametogonia), que são precursores da fase sexual.

A subordem Adeleina Léger 1901 caracteriza-se pela presença de sigízia, microgamontes produzindo 1-4 microgametas, esporozoítos envoltos por esporocisto, ou livres, dentro dos oocistos, e as espécies podem ser monoxênicas ou heteroxênicas. É considerada subordem heterogênea e polifilética (Barta e Dessser, 1989; Siddall & Dessser, 1991; Siddall, 1995), e atualmente é subdividida em quatro famílias: Haemogregarinidae (Neveu-Lamaire 1901) Léger 1911, Dactylosomatidae Jakowska & Nigrelli 1955, Karyolysidae Wenyon 1926, e Hepatozoidae Wenyon 1926 (Barta *et al.*, 2012; Netherlands *et al.*, 2018), havendo relatos de espécies de todas estas famílias acometendo a herpetofauna mundial.

No Brasil, espécies de dois gêneros, *Haemogregarina* (Danilewsky, 1886) (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) e *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) foram relatadas em répteis e anfíbios (Telford, 2009; Barta *et al.*, 2012) e

espécies do terceiro gênero, *Dactylosoma* (Apicomplexa: Adeleina: Dactylosomatidae), foram observadas acometendo anuros (Coelho *et al.*, 2021).

As famílias Hepatozoidae e Haemogregarinidae diferenciam-se entre si, principalmente, pela fase esporogônica nos vetores e presença ou ausência de esquizogonia sanguínea em *Haemogregarina* spp. e *Hepatozoon* spp., respectivamente (Barta, 2000).

Siddall (1995), estudando espécies de *Haemogregarina*, observou que algumas dessas espécies poderiam pertencer a outros gêneros, o que o levou a fazer uma nova revisão da subordem Adeleina. O autor sugeriu a transferência dos parasitos de lagartos, serpentes e aves para o gênero *Hepatozoon*. Essa transferência foi baseada em estudos nos quais observou uma elevada quantidade de esporocistos formados nos oocistos da fase esporogônica. A partir disso, o critério morfológico mais aceito para diferenciação entre os gêneros *Haemogregarina* e *Hepatozoon* é o desenvolvimento esporogônico nos vetores (hospedeiros invertebrados). No gênero *Haemogregarina* os oocistos são menores e há produção de cerca de oito esporozoítos no interior, enquanto em *Hepatozoon* os oocistos são maiores em tamanho e número de esporozoítos (Siddall, 1995).

No ano seguinte, Smith (1996) realizou revisão do gênero *Hepatozoon* seguindo orientação de Siddall (1995), e transferiu as espécies de *Haemogregarina* de lagartos, serpentes e aves para *Hepatozoon*. O autor fez essa transferência mesmo desconhecendo a esporogonia de muitas espécies de *Hepatozoon* nesses hospedeiros.

Sendo assim, as principais características de cada gênero do grupo das hemogregarinas, observadas acometendo a herpetofauna brasileira, são: O gênero *Haemogregarina* com merogonia nas células sanguíneas e teciduais, oocistos relativamente pequenos e baixa quantidade de esporozoítos produzidos. O gênero *Hepatozoon* com merogonia restrita aos tecidos, principalmente fígado e baço, oocistos maiores e milhares de esporozoítos produzidos. Já o gênero *Dactylosoma*, é o mais diferente de todos, sem merogonia tecidual, com todo o ciclo ocorrendo no sangue do hospedeiro vertebrado, com primeira e segunda merogonia sanguínea.

Em relação à transmissão entre os diferentes gêneros, a infecção por *Haemogregarina* spp. nos hospedeiros vertebrados pode ocorrer durante o repasto sanguíneo das sanguessugas (vetor), por inoculação dos estágios infectantes via saliva (Smith, 1996; Telford Jr., 2009). Para *Hepatozoon* spp., a infecção não é inoculativa, e sim, por ingestão do vetor infectado ou por ingestão de hospedeiros paratênicos (Smith, 1996; Telford Jr., 2009) (Figura 1).

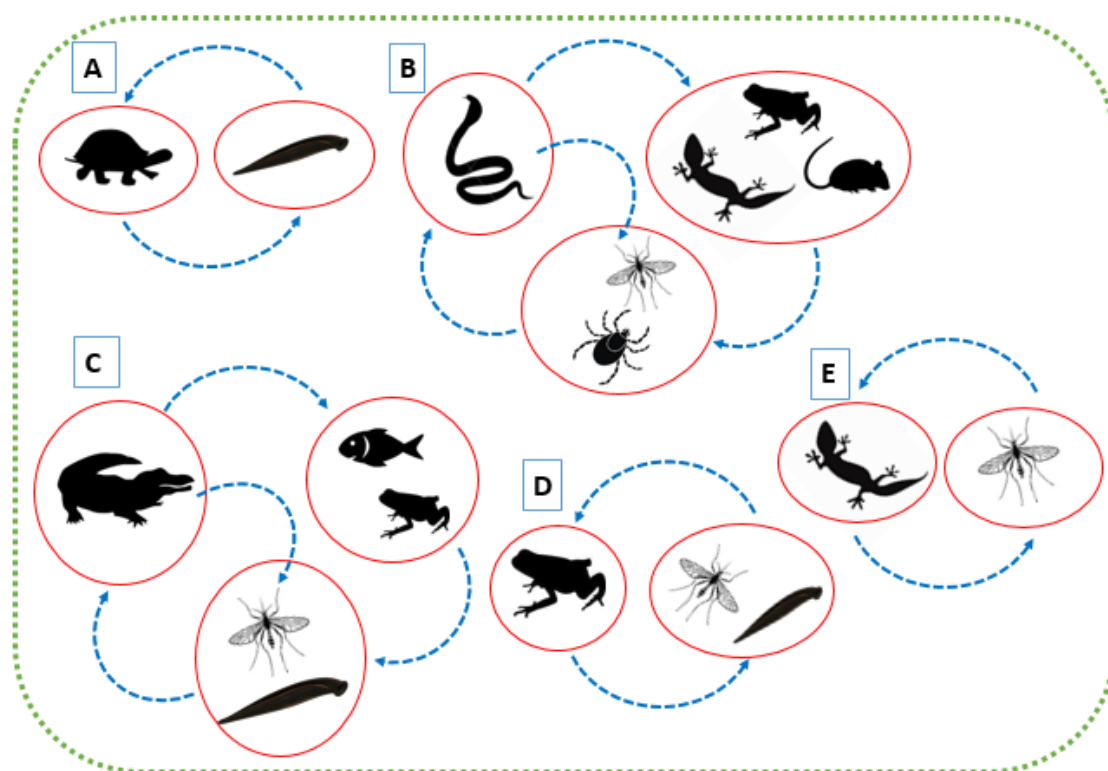


Figura 1 (A-E): Esquema ilustrativo das rotas de transmissão das hemogregarinas entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. A) Infecção por *Haemogregarina* spp. em testudines (hospedeiro vertebrado) durante repasto sanguíneo das sanguessugas (vetor). B) *Hepatozoon* spp. infectando serpentes através de hospedeiros paratênicos (anfíbios, lagartos e roedores) que ingeriram vetores (mosquitos hematófagos e carrapatos) positivos ou através da ingestão acidental de vetores infectados. C) Crocodilianos infectados por *Hepatozoon* spp. pela ingestão de presas, sendo estas hospedeiros paratênicos (anfíbios e peixes), positivas para o parasito ou através da ingestão acidental de vetores, como as sanguessugas e mosquitos hematófagos. Pode ocorrer também transmissão de *Haemogregarina* spp. em crocodilianos através do repasto sanguíneo feito por vetor (sanguessugas) positivo. D) Anfíbios positivos para *Hepatozoon* spp. e *Dactylosoma* spp. através da ingestão de vetores infectados, como as sanguessugas e mosquitos hematófagos. E) Transmissão de *Hepatozoon* spp. em lagartos através da ingestão de mosquitos hematófagos (vetores) infectados (desenho feito por Úngari, L.P.).

1.2.1) Família *Haemogregarinidae*

O termo hemogregarina é geralmente utilizado para parasitos vermiformes e largos encontrados dentro de leucócitos e eritrócitos, os gametócitos (Levine *et al.*, 1988; Davies, 2000). Historicamente, parasitos sanguíneos de anfíbios, répteis, aves e mamíferos foram incluídos no gênero *Haemogregarina*, devido à similaridade morfológica dos gametócitos entre os diferentes gêneros da subordem Adeleina (Desser *et al.*, 1995; Smith, 1996).

Os gêneros *Haemogregarina*, *Cyrlia* (Lainson, 1983) e *Desseria* Siddall, 1995 estão incluídos nessa família e possuem características exclusivas, como merogonia em

células sanguíneas ou tecidos, oocistos relativamente pequenos (35 µm de diâmetro), ausência de esporocistos e baixa quantidade relativa de esporozoítos produzidos (8-100).

Em torno de 400 espécies foram descritas nessa família. Levine (1988), revisando o grupo, considerou existirem 300 espécies neste gênero enquanto Siddall (1995) designou somente 19 como *Haemogregarina sensu stricto*. As espécies deste grupo possuem ciclo de vida heteroxênico com peixes e répteis sendo considerados hospedeiros vertebrados, os isópodes gnatídeos e as sanguessugas (famílias Glossiphonidae, Ozobranchidae e Psicolidae) como vetores (Desser, 1993; Siddall, 1995; Siddall & Desser, 2001; Davies *et al.*, 2004).

Em relação aos répteis, há somente uma espécie de *Haemogregarina*, *Haemogregarina crocodilorum* Borner 1901, descrita até hoje, que foi observada em um aligátor americano, *Alligator mississippiensis* (Daudin, 1801). Anos depois, Khan *et al.* (1980) relataram a presença dessa mesma espécie em seis aligátos americanos, mostrando merogonia nos eritrócitos e esporogonia nas sanguessugas removidas diretamente desses animais.

Já em testudines, o número de espécies é bem maior, e com ocorrência relatada em diferentes espécies. Estudos desenvolvidos com populações de diferentes regiões geográficas, como Estados Unidos (McAullife, 1977), Canadá (McAllister & King, 1980; Siddall & Desser, 1992), Romênia (Mihalca *et al.*, 2002; Mihalca *et al.*, 2008), Austrália (Pierce & Adlard, 2004) e Costa Rica (Rossow *et al.*, 2013) obtiveram 100% de positividade em testudines, como *Chelydra serpentina* (Linnaeus, 1758), *Chrysemys scripta elegans* (Weid, 1838), *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus, 1766), *K. leucostumum* (Duméril & Bibron, 1851) e *Rhinoclemmys funérea* Meyer & Wilson, 1973

No Brasil, há 36 espécies de quelônios aquáticos catalogadas (Costa *et al.*, 2022), sendo que os relatos de hemogregarinas acometendo esses animais abrangem, na sua grande maioria, dados de ocorrência e morfologia das formas evolutivas sanguíneas. Estudos desenvolvidos por Campos-Brites & Ratin (2003) e Soares *et al.* (2014) registraram positividade variando entre 28% a 98% em quelônios aquáticos. Outros trabalhos com foco em prevalência e dados morfológicos foram publicados, como *Haemogregarina* sp. em *Podocnemis unifilis* (Soares *et al.*, 2014), *Haemogregarina* sp. em *Podocnemis expansa* (Picelli *et al.*, 2015) e *Haemogregarina* sp. em *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) e *P. expansa* de cativeiro (Pessoa *et al.*, 2016).

Nesses animais, a espécie cujo ciclo de vida é mais conhecido é *Haemogregarina balli*, a qual foi observada em *Chelydra serpentina* (Schweigge, 1812) e na sanguessuga *Placobdella ornata* Verrill, 1872 (Siddall & Dessler, 1991). A transmissão ocorre durante a hematofagia realizada pelos vetores, com inoculação de merozoítos. No hospedeiro vertebrado se alojam nos órgãos como pulmões, baço e fígado, formando merontes pré-eritrocíticos contendo merozoítos. Esses caem na corrente sanguínea, invadem eritrócito e se transformam em pré-merontes que se tornam merontes primários eritrocíticos, originando novos merozoítos. Estes rompem o eritrócito e podem invadir outros se diferenciando em gametócitos (macrogametócitos e microgametócitos) ou merontes secundários eritrocíticos (Siddall & Dessler, 1991; Siddall & Dessler, 1992; Davies & Johnston, 2000).

Com o avanço do uso de técnicas moleculares, embora ainda escassos, alguns estudos com foco em amplificação do gene 18S rDNA foram realizados (Oliveira *et al.* 2018; Úngari *et al.* 2018; Guterrez-Liberato *et al.* 2021; Correa *et al.* 2022). Oliveira *et al.* (2018), através da análise morfológica e molecular, identificaram *Haemogregarina* em duas espécies de tartarugas brasileiras, *P. expansa* e *P. geoffroanus*. Úngari *et al.* (2018) descreveram a primeira espécie de *Haemogregarina*, *Haemogregarina podocnemis*, em *Podocnemis unifilis* de vida livre coletadas no estado de Goiás, Brasil, com o uso de técnicas morfológicas e moleculares. Recentemente, mais duas espécies foram descritas infectando *P. expansa* e *P. sextuberculata* na região Amazônica, estado do Pará, Brasil (Correa *et al.* 2022).

1.2.2) Família Hepatozoidae

A família Hepatozoidae é constituída por um único gênero, *Hepatozoon*, o qual apresenta características exclusivas como merogonia restrita a tecidos, oocistos relativamente grandes (100 µm de diâmetro), presença de esporocistos e de centenas de esporozoítos e transmissão via ingestão (Smith, 1996).

O ciclo de vida de espécies de *Hepatozoon* é bastante complexo, com mecanismos de transmissão variados, em que a mesma espécie pode infectar diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados. Landau *et al.* (1972) realizaram experimentos de transmissão cruzada de *Hepatozoon domerguei* Landau, Chabau, Michel & Brugoo, 1970 entre diferentes espécies de serpentes e lagarto *Oplurus saba* Duméril & Bribon, 1837, com duas espécies de vetores, os mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 e *Anopheles stephensi* Liston, 1901. Em todos os experimentos foram observados gametócitos,

merontes e cistos do parasito nos hospedeiros. Lembrando que as serpentes e a espécie de lagarto utilizados nesses experimentos ingeriram os vetores. Em seguida, o lagarto infectado experimentalmente serviu de fonte alimentar para uma serpente livre de *Hepatozoon* e a mesma, posteriormente, apresentou gametócitos na circulação sanguínea. Landau *et al.* (1972) conseguiram, portanto, comprovar transmissão através de predação de vertebrados com cistos com cistozoítos nas vísceras.

Estudos posteriores, como os de Smith *et al.* (1994), Lainson *et al.* (2003) e Sloboda *et al.* (2008) reforçaram a via de transmissão em sistemas parasito-hospedeiro, quando o vertebrado, comumente, não ingere os vetores invertebrados, como é o caso de serpentes. Dessa forma, a ingestão ocorre de maneira acidental e a principal forma de transmissão é pela presa infectada.

Os hospedeiros invertebrados (vetores) são, principalmente, os mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Culicidae). Esses podem transmitir a parasitose para as serpentes por hospedeiros paratênicos, que se alimentam naturalmente desses gêneros de mosquitos, infectando as serpentes que os ingerirem, ou através da ingestão direta desses mosquitos pelas serpentes (Ball *et al.*, 1967). Os invertebrados artrópodes não fazem parte da alimentação normal de serpentes, entretanto Ball *et al.* (1967), demonstraram ser possível essa transmissão pela ingestão acidental de vetores.

Flebotomíneos da espécie *Phlebotomus vexator* (Coquillett, 1907) também podem atuar como hospedeiros invertebrados, havendo relato de achado de oocisto na hemocela dessa espécie de vetor (Ayala, 1970). Outros grupos de artrópodes são transmissores dessa parasitose, como os barbeiros, carrapatos e ácaros, que podem manter a fase esporogônica (Wozniak & Telford, 1991).

Com isso, Telford (1984), analisando registros de estudos anteriores, concluiu que as espécies de *Hepatozoon* que acometem répteis apresentam baixa especificidade de hospedeiros, tanto para os hospedeiros vertebrados, quanto para os invertebrados. Um aspecto que deve ser levado em consideração é a alimentação desses indivíduos em seu ambiente natural. Segundo Telford (1984), serpentes que se alimentam de anfíbios, lagartos e outras serpentes estão mais suscetíveis a adquirirem a parasitose. Entretanto, isto não explica a alta taxa de infecção em *Crotalus durissus*, espécie que não se alimenta de tais presas. O'Dwyer *et al.* (2003) reportaram prevalência de 19,4% nessas serpentes. Em outro estudo, Úngari *et al.* (2018), analisando serpentes de cativeiro brasileiras, relataram prevalência em 10,9% das cascavéis analisadas.

A rota de transmissão congênita foi descrita por Lowick & Yaeger (1987). Esses pesquisadores observaram exemplares de *Nerodia fasciata confluens* (Blanchard, 1923) com elevada parasitemia, e tanto a fêmea quanto seus filhotes estavam todos infectados pelo protozoário.

Em relação ao ciclo de vida, Ball *et al.* (1967), Ball *et al.* (1969), Bashtar *et al.* (1991) e Smith *et al.* (1994) mostraram que a fase esporogônica do parasito inicia-se com a ingestão de microgamontes e macrogamontes de *Hepatozoon* spp., durante repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado. Em seguida, os gamontes migram para a parede intestinal onde ocorre a gametogênese. Um microgamonte origina quatro microgametas uniflagelados que, por singamia, fecundam os macrogametas, oriundos de macrogamontes, formando um zigoto. O zigoto cresce rapidamente e atravessa a parede intestinal, localizando-se na hemocele do vetor hematófago. Nesse local, forma um oocisto com múltiplos esporocistos contendo esporozoítos (estágio evolutivo infectante para o hospedeiro vertebrado). Quando o artrópode é ingerido, os esporozoítos são liberados e inicia-se a fase do ciclo no hospedeiro vertebrado. Os esporozoítos podem seguir para os hepatócitos, formando um cistozoíto, ou iniciar o primeiro ciclo merogônico que ocorre na parede intestinal dos hospedeiros vertebrados. Dois tipos de merontes são formados: um contendo macromerozoítos que, transportados via sangue ou linfa invadem novos tecidos e outro, contendo micromerozoítos que irão penetrar nos eritrócitos, sofrer gamontogonia e dar origem aos gamontes circulantes, infectivos para os vetores hematófagos (Smith, 1996).

Até 1996, foram catalogadas mais de 120 espécies de *Hepatozoon* em serpentes de 200 espécies diferentes, nas regiões temperadas a tropicais (Levine, 1988; Smith, 1996). A partir de então, outras espécies vêm sendo descritas como *Hepatozoon musa* Borges-Nojosa, Borges-Leite, Maia, Zanchi-Silva, Braga & Harris 2017, descrita infectando a serpente *Philodryas nattereri* Steindachner (Squamata: Dipsadidae) no Nordeste brasileiro.

As espécies de *Hepatozoon* de serpentes brasileiras são: *H. juxtannuclearis*, *H. fusifex* e *H. terzii*, parasitos de *Boa constrictor* (Carini, 1947; Ball *et al.*, 1969); *H. raulei*, *H. plimmeri* e *H. jararacuçu* em espécies de *Bothrops* (Phisalix & Laveran, 1913; Pessoa *et al.*, 1971; De Biasi *et al.*, 1989); *H. luhei* em *Corallus* sp. (Pessoa *et al.*, 1970); *H. romani*, *H. capsulata*, *H. cevapii*, *H. massardi* e *H. cuestensis* parasitando *Crotalus durissus terrificus* (Phisalix, 1931; O'Dwyer *et al.*, 2013); *H. philodryasi* em *Philodryas patogenensis* (Carini, 1910); *H. carinicauda* Pessôa & Cavalheiro, 1969 em *Helicops*

angulatus (Linnaeus, 1758) (Paula *et al.* 2022); *H. mingonei* e *H. cyclagrasii* em *Hydrodynastes gigas* (Arantes, 1934; Pêssoa *et al.*, 1970); e *H. musa* em *Phylodryas nattereri* (Borges-Nojosa *et al.*, 2017).

Há na literatura poucos estudos sobre prevalência de *Hepatozoon* em serpentes. Hull & Camin (1960) analisaram 600 serpentes cativas no Zoológico dos Estados Unidos e observaram 30,8% infectadas por esse parasito. No Brasil, Pessoa *et al.* (1974) relataram 17,1% de serpentes positivas dentre 2128 analisadas, e O'Dwyer *et al.* (2003) encontraram positividade em 16,38% de 238 serpentes recém-capturadas. Úngari *et al.* (2018) analisaram 157 serpentes de cativeiro, sendo 128 peçonhentas e 29 não peçonhentas, e 20 (12,78%) estavam positivas para *Hepatozoon* pela análise óptica das extensões sanguíneas. Além disso, a análise molecular identificou duas espécies previamente descritas na literatura, *H. musa* e *H. cuestensis*.

Em relação à descrição de espécies infectando serpentes, com dados morfológicos e moleculares, dois artigos podem ser citados (O'Dwyer *et al.* 2013; Borges-Nojosa *et al.* 2017). O'Dwyer *et al.* (2013) descreveram três espécies de *Hepatozoon*, *Hepatozoon cevapii*, *Hepatozoon massardi* e *Hepatozoon cuestensis* infectando *Crotalus durissus terrificus* no estado de São Paulo, Brasil. Enquanto que Borges-Nojosa *et al.* (2017) descreveram *Hepatozoon musa* em *Phylodryas nattereri* procedente da região Nordeste do Brasil.

Em relação a *Hepatozoon* em testudines, durante muitos anos somente uma espécie era conhecida na literatura, *Hepatozoon fitzsimonsi* (Dias 1953) Cook, Lawton, Davies & Smit 2014. Nesse estudo, Cook *et al.* (2014) redescreveram *Haemogregarina fitzsimonsi* como *Hepatozoon fitzsimonsi* baseados em critérios taxonômicos, morfológicos e de ciclo de vida. Recentemente, mais um artigo foi publicado sobre hemogregarina em testudines; Gutiérrez-Liberato *et al.* (2022) descreveram uma nova espécie, *Hepatozoon simidi*, infectando a tartaruga aquática neotropical *Rhinoclemmys melanosterna* Gray, 1861 na Colômbia, através da análise morfológica das formas evolutivas sanguíneas e molecular com gene-alvo 18S rRNA.

Os crocodilianos apresentam poucas espécies de *Hepatozoon* descritas, com os primeiros relatos reportados por Simond (1901) na Índia, que descreveu *Haemogregarina hankini* em *Gavialis gangeticus* (Gmelin, 1789) e *Crocodylus porosus* Schneider, 1801. Na Alemanha, Börner (1901) descreveu *Haemogregarina* sp. em *Crocodylus cutus* (Cuvier, 1807) e *Alligator mississippiensis* (Daudin, 1801). Thiroux (1910) descreveu uma nova espécie, *Haemogregarina petiti* em *Crocodylus niloticus* Laurenti, 1768, que

posteriormente foi relatada por outros autores como Cahtton e Roubaud (1913) e Hoare (1932). Entretanto, essas espécies foram descritas baseadas somente nos gametócitos sanguíneos.

Posteriormente, em Uganda, Hoare (1932), estudando uma série de hematozoários em animais silvestres em laboratório, observou moscas tsé-tsé (*Glossina palpalis* Robinezu-Desvoidy, 1830) realizando repasto sanguíneo em crocodilianos naturalmente infectados. Logo, foram encontrados oocistos com centenas de esporocistos na cavidade destes dípteros, revelando o desenvolvimento esporogônico do parasito. Dessa forma, houve alteração do nome *Haemogregarina petiti* para *Hepatozoon petiti*.

Atualmente, há seis espécies de *Hepatozoon* descritas em crocodilianos no mundo, sendo duas reportadas na América do Sul. *Hepatozoon serrei* Phisalix 1914, que acomete *Paleosuchus trigonatus* (Schneider, 1801) e *Hepatozoon caimani* Carini 1909 reportados em jacarés do gênero *Caiman*. No Brasil, somente *H. caimani* foi observada até o momento, parasitando *Caiman latirostris* (Daudin, 1802), *Caiman crocodilus* Linnaeus, 1958 e *Caiman yacare* (Daudin, 1802) (Smith, 1996; Lainson, 1977; Lainson *et al.*, 2003; Viana & Marques, 2005; Viana *et al.*, 2010a).

Há mais de 100 anos, *Hepatozoon caimani* foi descrito no estado do Rio de Janeiro, Brasil, por Carini (1909), através da observação de gametócitos nos eritrócitos de três indivíduos do jacaré-de-papo-amarelo, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802), hospedeiro nunca relatado com essa parasitose anteriormente. Posteriormente, Migone (1916) também observou gametócitos intraeritocíticos em *C. crocodilus* na região do Paraguai, porém não os denominou.

Pessoa *et al.* (1972) realizaram as primeiras pesquisas sobre esporogonia de *Haemogregarina caimani*, assim denominada na época. Foram estudados a sanguessuga *Haementeria lutzi* Pinto, 1920, o triatomíneo *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e mosquitos *Culex dolosus* (Lynch Arribálzaga, 1891). Foi observado desenvolvimento esporogônico somente em *C. dolosus*, com numerosos oocistos aderidos no estômago e na cavidade geral, e quando maduros, contendo 100 a 120 esporocistos dentro de cada oocisto, com esporozoítos medindo 160 a 200 µm. Com isso, foi possível a mudança do nome da espécie de parasito, de *Haemogregarina caimani* para *Hepatozoon caimani*.

Além desses relatos, Lainson (1977) observou esse protozoário em *C. crocodilus* na região de Bragança, Pará. O pesquisador verificou o desenvolvimento esporogônico, com formação de grande quantidade de esporocistos por oocisto em mosquitos *Culex fatigans*, assim como observado por Pessoa *et al.* (1972).

Anos depois, Lainson *et al.* (2003) conseguiram elucidar o ciclo de vida de *H. caimani* em *C. crocodilus*, pela primeira vez, no estado do Pará. O vetor *Culex fatigans* fez repasto sanguíneo em *C. crocodilus* infectado com *H. caimani*, e em seguida, foi possível observar esporogonia com oocistos esporulados aderidos ao intestino do vetor. Com isso, esses mosquitos infectados foram fornecidos como alimento para anuros das espécies *Leptodactylus fuscus* e *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) e apresentaram cistos contendo cistozoítos desenvolvidos nos órgãos, principalmente no fígado. Em seguida, esses anuros, experimentalmente infectados, serviram de alimento para crocodilianos não infectados, os quais apresentaram gametócitos sanguíneos dias após infecção em órgãos como, fígado, baço, rins e pulmão. Já a merogonia foi observada somente no intestino delgado (Lainson *et al.*, 2003).

Após a identificação de anuros como hospedeiros paratênicos de *H. caimani* em jacarés, Pereira *et al.* (2014) realizaram experimento com peixes, para averiguar a possibilidade de estes também atuarem como hospedeiros paratênicos. Usaram quatro espécies de mosquitos, *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904), *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus*, e todos realizaram repasto sanguíneo em dois *C. yacare* naturalmente infectados, entretanto, somente *C. quinquefasciatus* apresentaram oocistos. Em seguida, peixes *Metynnis* sp. Cope, 1878 e *Astyanax* sp. Baird & Girard, 1854 foram individualmente alimentados com esses *C. quinquefasciatus* infectados. Nenhum parasito foi encontrado em *Astyanax* sp., mas todos os espécimes de *Metynnis* sp. apresentaram numerosos cistos, contendo cistozoítos. Os cistos estavam localizados próximos a vasos hepáticos. Além disso, gametócitos intraeritrocíticos foram observados em jacarés jovens que ingeriram os peixes infectados (Pereira *et al.*, 2014).

Através de todas essas descobertas, Lainson *et al.* (2003), Viana *et al.* (2012) e Pereira *et al.* (2014) consideram anuros e peixes, que fazem parte da dieta de jacarés em ambiente silvestre, como vias naturais de transmissão de *H. caimani*. Todavia, a especificidade de hospedeiros desse parasito ainda é muito questionada (Telford *et al.*, 2001).

Há na literatura poucos relatos sobre prevalência de *H. caimani* em populações de jacarés brasileiros. Na região amazônica, Lainson (1977) observou 76,7% de *C. crocodilus* parasitados; Marques & Viana (2005) relataram 71,4% de *C. yacare* positivos para esse parasito no Pantanal Mato-Grossense; nesse mesmo local, posteriormente, Viana *et al.* (2010) relataram 76% dos *C. yacare* positivos para *H. caimani*.

Em relação à utilização de técnicas moleculares para diagnóstico de *Hepatozoon* spp. em jacarés, dois trabalhos foram publicados. Soares *et al.* (2017) caracterizaram molecularmente, pela primeira vez, *H. caimani* em uma população de *C. yacare* do Pantanal, com o gene alvo 18S rRNA. Logo em seguida, Bouer *et al.* (2017) também desenvolveram um estudo molecular amplificando uma região do gene 18S rRNA e identificando *H. caimani* em *C. crocodilus yacare* do Pantanal.

Em relação aos anuros, algumas espécies de *Hepatozoon* foram descritas ao longo dos anos, baseadas, na maioria das vezes, somente pela morfologia dos gamontes sanguíneos (Desser, 1993). Cunha & Muniz (1927) observaram a evolução esquizogônica de hemogregarina parasitando o fígado, pulmão e intestino de *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) provenientes do Brasil. Costa *et al.* (1973) descreveram *Hepatozoon leptodactyli*, em homenagem ao hospedeiro, cujo gênero é *Leptodactylus*, através da observação de formas intracelulares. Os autores capturaram 90 anuros das espécies *Leptodactylus pentadactylus* Laurent, 1768 e *L. latrans*, além de sanguessuga *Haementeria lutzi*, e 17 (21,11%) apresentaram-se positivas para o parasito. Além disso, formas esquizogônicas foram observadas no fígado e baço pulmão, intestino delgado, coração e cérebro. No provável vetor, os pesquisadores observaram o estágio esporogônico, com presença de oocisto no intestino do hirudíneo, depois que a sanguessuga se alimentou em *L. pentadactylus*.

Souza & Borriello Filho (1974) observaram haemogregarina em *Rhinella ornata* (Spix, 1824) procedente do Brasil, com características similares da espécie descrita por Costa *et al.* (1973). Com o passar dos anos, vários outros pesquisadores observaram hemogregarinas em anuros (Fantam *et al.*, 1942; Kim *et al.*, 1998; Desser, 2001).

Dentre os trabalhos publicados, Desser *et al.* (1995) foram os primeiros a detalhar o ciclo esporogônico no vetor invertebrado, estudando o ciclo de vida de *Hepatozoon catesbiana* e seus hospedeiros, *Lithobates catesbeianus* (Schaw, 1802) e *Culex territans* Walker, 1856. Foram encontrados oocistos no túbulo de Maphighi de *Cx. territans*, após o repasto sanguíneo do vetor em rãs positivas.

Em um estudo brasileiro, Leal *et al.* (2009) observaram rãs pertencentes às famílias Leptodactylidae e Hylidae positivas para hemogregarinas.

Embora existam alguns estudos sobre prevalência, ciclo de vida e morfologia das formas evolutivas de *Hepatozoon* spp., pouquíssimas pesquisas utilizaram diagnóstico molecular no Brasil. Um exemplo é o trabalho publicado por Leal *et al.* (2015), quando os autores analisaram 145 anuros brasileiros das espécies *Leptodactylus chaquensis* e

Leptodactylus podicipinus, e observaram positividade em 42 animais. Entretanto, somente executaram o diagnóstico molecular em dez *L. chaquensis* positivas.

Os principais trabalhos com dados morfológicos e moleculares para *Hepatozoon* em anuros são de outros países. Netherlands *et. al.* (2014) descreveram *Hepatozoon ixoxo* infectando três espécies de bufonídeos do gênero *Amietophrynus* (Frost *et al.*, 2006) na África do Sul. Além deste, Netherlands *et. al.* (2017) descreveram mais outras três espécies utilizando diagnóstico morfológico e molecular.

1.2.3) Família Dactylosomatidae

Dactylosomatidae é uma pequena família que atualmente compreende os gêneros *Dactylosoma* Labbé, 1894 e *Babesiosoma* Jakowska e Nigrelli, 1956 (Jakowska & Nigrelli 1955, 1956).

Segundo Barta (2012), os membros desta família passaram por inúmeras reclassificações e revisões sistemáticas, desde a descrição da primeira espécie, *Dactylosoma ranarum* (Kruse, 1890). Além disso, faltam informações sobre a biologia desse grupo de parasitos, com os ciclos de vida de apenas duas espécies elucidados até o momento, o de *Babesiosoma stableri* Schmittner & McGhee, 1961 e o de *Babesiosoma mariae* (Hoare, 1930) (Barta & Dessler 1989; Negm-Eldin, 1988).

Embora as sanguessugas sejam consideradas os vetores desses parasitos, em um estudo recente, possíveis estágios de desenvolvimento de *Dactylosoma kermi* Netherlands, Cook & Smit, 2020 foram observados no intestino e hemocele de mosquitos, que se alimentaram de hospedeiros infectados (Netherlands *et al.*, 2020).

Espécies de *Dactylosoma* são caracterizadas pelo desenvolvimento merogônico no sangue periférico de seus hospedeiros vertebrados. Durante a merogonia primária, um grande meronte multinucleado é formado, produzindo até 16 merozoítos. Esses merozoítos, então, separam-se repetindo a merogonia primária ou iniciando a merogonia secundária. Na merogonia secundária, os merontes produzem até oito merozoítos que repetem a merogonia secundária ou amadurecem em gamontes (Netherlands *et al.*, 2020).

Atualmente, existem somente seis espécies reconhecidas de *Dactylosoma* fora do Brasil. Duas destas foram encontradas infectando peixes e quatro espécies em anuros. Em relação aos anuros, foram descritas *Dactylosoma ranarum*, que infecta a rã europeia *Pelophylax kl. esculentus* (Linnaeus, 1758); *Dactylosoma sylvatica* Fantham, Porter & Richardson, 1942 relatada em *Lithobates sylvatica* (LeConte, 1825) de Quebec, Canadá; *Dactylosoma taiwanensis* Manwell, 1964 em *Fejervarya limnocharis* Gravenhorst, 1829

coletada em Taiwan; e *D. kermi* em anuros *Ptychadena anchietae* Bocage, 1868 e *Sclerophrys gutturalis* Power, 1927 da África do Sul. Além disso, até o momento, apenas duas espécies foram caracterizadas molecularmente, *D. ranarum* e *D. kermi*, e uma espécie de *Dactylosoma* não nomeada, da Bélgica (Netherlands *et al.*, 2020).

No Brasil, apenas três estudos relataram espécies de *Dactylosoma* em anuros. Durham (1902) observou duas espécies de hemogregarinas infectando sapos do estado do Pará; a primeira espécie uma hemogregarina não identificada que apresentava características semelhantes a *Hemolivia stellata* Petit, Landau, Baccam & Lainson, 1990, e a segunda, uma hemogregarina com morfologia semelhante a espécies de *Dactylosoma*. O segundo foi um estudo de Da Costa & Pereira (1971) que examinaram um total de 100 rãs e sapos capturados durante 1964-1971, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Parasitos de diferentes grupos foram identificados, incluindo espécies de *Hepatozoon* e *Dactylosoma*. Segundo Da Costa & Pereira (1971), espécies de *Dactylosoma* e *Hepatozoon leptodactyli* foram observadas parasitando *Leptodactylus latrans* (Steffen, 1815) (syn. *L. ocellatus*). Esses autores sugeriram que, embora o parasito dactilosomatídeo observado fosse semelhante a *D. ranarum*, mais dados seriam necessários antes que a classificação pudesse ser feita. Recentemente, Côelho *et al.* (2020) relataram *Dactylosoma* sp. em duas espécies de sapos, *Rhinella major* (Muller & Helmic, 1936) e *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758), no estado do Pará, Brasil, através da análise morfológica por microscopia óptica convencional.

1.2.4) Critérios taxonômicos e de diagnóstico para haemogregarinas

Durante um período relativamente longo, a descrição de novas espécies de hemogregarinas era baseada somente em critérios como morfologia dos gametócitos presentes nas células sanguíneas e/ou pelo encontro de parasitos em nova espécie de hospedeiro e/ou em uma nova localidade (Siddall, 1995). Entretanto, experimentos realizados entre diferentes espécies de hospedeiros, com a mesma espécie de parasito, mostrou que a especificidade de hospedeiro pode ser baixa dependendo da espécie, desencorajando a antiga prática de classificação de novas espécies e mostrando a necessidade de observação de outras fases do ciclo do parasito (Ball *et al.*, 1967; Landau *et al.*, 1972).

Desser (1995), através de diversos estudos, concluiu que o gênero *Haemogregarina* não pode ser distinguido do gênero *Hepatozoon* com base somente na aparência de seus

gamontes intraeritrocíticos e merontes tissulares. Para a identificação, também é necessária análise do desenvolvimento esporogônico no vetor.

A distinção de espécies, quando baseada somente em características morfológicas de oocistos e gamontes, torna-se falha devido à semelhança das formas evolutivas (Pessoa & De Biasi, 1973; O'Dwyer *et al.*, 2002).

Os primeiros trabalhos descritivos na literatura sobre espécies de hemogregarinas em répteis traziam somente informações sobre morfologia dos gamontes (formato, coloração e presença de cápsula). Em seguida, começaram a ser abordados aspectos morfométricos, que geralmente limitavam-se à descrição do comprimento e largura dos gamontes e cistos. Atualmente, outras variáveis como medidas de área do parasito e do núcleo são utilizadas, assim como, as técnicas moleculares (Telford Jr *et al.*, 2004, Rubini *et al.*, 2005b).

Os primeiros estudos moleculares para hemogregarinas foram conduzidos por Wozniak *et al.* (1994). Os autores conseguiram amplificar o rDNA de cinco diferentes isolados de *Hepatozoon*, utilizando oligonucleotídeos (18AP853 e 18AP1488) desenvolvidos a partir da sequência específica para o locus de DNA ribossomal de hemoparasitos do filo Apicomplexa. Na PCR foram observados padrões específicos de bandas para cada isolado, demonstrando que estas espécies podem ser molecularmente diferenciadas pela sequência do locus de rDNA.

Entretanto, Perkins & Martin (1999) analisaram os pares de oligonucleotídeos desenvolvidos por Wozniak *et al.* (1994) e observaram que estes não eram específicos, e amplificavam, também, genes dos hospedeiros vertebrados, quando o DNA era extraído do sangue. Com isso, os pesquisadores Perkins & Keller (2001) desenvolveram novos oligonucleotídeos (HEMO1 e HEMO2). A sequência de oligonucleotídeos HEMO1 amplifica uma região conservada do grupo das hemogregarinas e HEMO2 uma região conservada de apicomplexos, sendo considerados genéricos.

No Japão, Inokuma *et al.* (2002) desenharam duas sequências de oligonucleotídeos (HepF e HepR), que amplificam uma sequência parcial do gene 18S rDNA de *Hepatozoon* spp. A partir disso, analisaram a espécie de *Hepatozoon* em cães que ocorre naquele país, baseados nos alinhamentos com sequências já existentes de *H. canis* (AF176835), *H. americanum* (AF176836) que infectam cães, e *H. catesbiana* de anfíbios (AF176837). A análise da identidade gênica mostrou que a espécie de *Hepatozoon* observada em cães no Japão é uma variação da cepa de *H. canis*.

No Brasil, Rubini *et al.* (2005a) caracterizaram geneticamente a espécie de *Hepatozoon* que acomete cães utilizando os oligonucleotídeos HepF e HepR e Rubini *et al.* (2006), utilizando os mesmos oligonucleotídeos conseguiram caracterizar, também, a espécie de *Hepatozoon* encontrada em gatos, ambas caracterizadas como sendo *H. canis*.

Ujvari *et al.* (2004) desenharam outros oligonucleotídeos (HEPF300 e HEP900) específicos para o gênero *Hepatozoon*, para diagnosticar infecção em serpentes *L. fuscus*. Contudo, não foi possível nomear a espécie, pois os autores não possuíam outros dados biológicos do hemoparasito.

Os oligonucleotídeos descritos por Perkins & Keller (2001) e os descritos por Ujvari *et al.* (2004) amplificam fragmentos de 900 pares de bases e 600 pares de bases, respectivamente. Esses fragmentos são adjacentes do gene 18S rRNA, sendo possível obter maior fragmento ao concatenar ambos. Com isso, Harris *et al.* (2011) caracterizaram molecularmente espécies de *Hepatozoon* em répteis presentes nas Ilhas Seychelles, África, sequenciando regiões do gene 18S rDNA, utilizando os oligonucleotídeos HEMO1 e HEMO2 (Perkins & Keller, 2001) e HepF300 e Hep900 (Ujvari *et al.*, 2004), cuja análise filogenética indicou que as espécies de *Hepatozoon* presentes nessas ilhas formam uma linhagem monofilética. Em outro trabalho utilizando esses dois pares de oligonucleotídeos, Maia *et al.* (2011) realizaram análise molecular sobre espécies de *Hepatozoon* de lagartos do Norte da África e encontraram múltiplas linhagens geneticamente distintas.

Borges-Nojosa *et al.* (2017) descreveram uma nova espécie, *Hepatozoon musa*, em serpente *Philodryas nattereri* no Nordeste brasileiro, através da análise morfológica e morfométrica de gametócitos presentes no sangue do hospedeiro, e caracterização molecular usando os oligonucleotídeos HEMO1/HEMO2 e HEPF300/HEP900. Dessa forma, reforçando a necessidade e importância da análise molecular, juntamente com a análise morfológica e morfométrica das formas evolutivas do parasito em répteis, para diagnóstico de espécies de hemogregarinas.

Embora recente, os registros moleculares para o grupo de hemogregarinas crescem constantemente e padrões filogenéticos são observados. Dentre esses padrões, o gênero *Hepatozoon* é constantemente observado como parafilético, com a presença de dois subclados. Um constituído por isolados de mamíferos e o outro apresentando isolados de répteis, anfíbios, marsupiais e roedores. Além disso, a família Karyolysidae também é parafilética, com o clado constituído por isolados de espécies de *Karyolysus* e de *Hepatozoon* de alguns lagartos, e outro formado somente por isolados de *Hemolivia* spp..

Dessa forma, o grupo das hemogregarinas é considerado polifilético. Informação que contradiz, de certa forma, os dados morfológicos e os ciclos de vida bem estabelecidos para cada gênero dentro desse grupo. Sendo assim, Karadjian *et al.* (2015) publicaram um estudo sobre revisão sistemática para as hemogregarinas com o 18S rRNA como gene-alvo. Nesse estudo, eles juntaram características morfológicas, de ciclo de vida e filogenéticas para descrever um novo gênero, *Bartazoon*. Nesse gênero, todas as espécies de hemogregarinas descritas em répteis, anfíbios, aves e roedores, que são transmitidas por mosquitos, seriam transferidas para o novo gênero.

Entretanto, tal estudo não foi considerado relevante pela sociedade acadêmica e, logo em seguida foi desqualificado por Maia *et al.* (2016). Os autores alegaram que a reclassificação das haemogregarinas por Karadjian *et al.* (2015) foi premeditada, pois foi executada baseada em um único gene conservado, além de mostrar incongruências filogenética, como por exemplo nova classificação e redescrição de espécies previamente diagnosticadas como *Hepatozoon*, para *Hemolivia*.

Como observado acima, até recentemente, para hemogregarinas, o diagnóstico molecular baseava-se na amplificação de 18S rDNA. Entretanto, recentemente, Gutierrez-Liberato *et al.* (2022) desenharam oligonucleotídeos que amplificam regiões variadas dos genes mitocondriais (CoxI, Cox III e Cytb). Estes se mostraram eficientes na amplificação de *Haemogregarina* spp. de testudines da Colômbia.

1.3) O gênero *Trypanosoma*

A família Trypanosomatidae contém parasitos uniflagelados e unicelulares obrigatórios de diversos hospedeiros (plantas, vertebrados e invertebrados) nos diferentes continentes. Com base no ciclo de vida, os tripanosomatídeos se dividem em dois grupos. Um composto por espécies monoxênicas, que se desenvolvem em um único hospedeiro, e outro grupo formado por espécies heteroxênicas, com dois hospedeiros, sendo que um deles serve como vetor. As espécies com ciclo de vida monoxênico são restritas a hospedeiros invertebrados (Adl *et al.* 2012; Lukes *et al.*, 2014a; Cavalier-Smith 2016; Maslov *et al.*, 2019). Os tripanosomatídeos com ciclo de vida heteroxênico são classificados nos seguintes gêneros: *Trypanosoma*, Leishmania Cunnigham, 1885, *Endotrypanum* Mesnil & Brimont, 1908, *Porcisia* Schaw, Camargo & Teixeira, 2016 e *Phytomonas* Donavan, 1909, alternando o seu ciclo de vida entre hospedeiros invertebrados e vertebrados; sendo *Phytomonas* com alternância entre invertebrados

(hemípteros fitófagos) e plantas (Fernandes *et al.*, 1993; Hamilton *et al.*, 2004; Hoare & Wallace, 1966; Votykka *et al.*, 2015; Lukes *et al.*, 2016).

Com base em filogenias moleculares, a família Trypanosomatidae é dividida em 6 subfamílias e 22 gêneros, descritos com a combinação de parâmetros taxonômicos moleculares e clássicos como morfologia, hospedeiro, ciclo de vida e comportamento em meio de cultivo (Lukes *et al.*, 2014). Em relação ao gênero *Trypanosoma*, este é formado por parasitos heteroxênicos de vertebrados e invertebrados, classificados em diversos subgêneros, que representam o maior número de espécies descritas na família (Vickerman, 1976; Dolezel *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006).

Os parasitos do gênero *Trypanosoma* pertencem à família Trypanosomatidae Doflein, 1901, ordem Trypanosomatida Kent, 1880 e classe Kinetoplastea Honigberg, 1963 (Adl *et al.*, 2012; Cavalier-Smith, 2016). A classe denomina-se Kinetoplastea devido à presença de cinetoplasto, que é considerado região de única mitocôndria desses organismos que contém o DNA mitocondrial, denominadas DNA do cinetoplasto (kDNA) (Simpson, 1987; Vickerman, 1976).

As espécies de *Trypanosoma* parasitam vertebrados de todas as classes (anfíbios, peixes, répteis, aves e mamíferos) e invertebrados hematófagos (artrópodes e sanguessugas) que atuam como vetores. Embora a maioria dos estudos possua enfoque nos organismos responsáveis por patologias de importância médica humana e veterinária, como o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas e *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono (Hoare, 1972; Vickerman, 1976; Stevens *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2006; Hamilton *et al.*, 2007; Maslov *et al.*, 2013; Lukes *et al.*, 2014); a maioria das espécies de *Trypanosoma* são consideradas não patogênicas.

1.3.1) A classificação dos tripanossomas em anfíbios

Em relação aos tripanossomas de répteis e anfíbios, sua classificação foi baseada exclusivamente em critérios taxonômicos tradicionais e poucas espécies foram validadas por inferências filogenéticas. Pouco se conhece sobre os ciclos de vida, desenvolvimento e vetores desses parasitos de hospedeiros não mamíferos, embora centenas de espécies tenham sido descritas nesses hospedeiros em todo o mundo (Ferreira *et al.*, 2007, 2008; Viola *et al.*, 2009; Fermino *et al.*, 2013, 2015, 2019; Bernal *et al.*, 2016; Spodareva *et al.*, 2018).

Em relação à filogenia, os tripanossomas se dividem em dois clados, um terrestre e um aquático. No clado terrestre encontram-se quase todos os tripanossomas de mamíferos

e aves, e algumas espécies parasitam lagartos, serpentes e crocodilianos. Estudos recentes demonstraram que tripanossomas de répteis podem ser filogeneticamente relacionados com os de mamíferos do clado terrestre. Já no clado aquático, se agrupam os isolados de algumas tartarugas, crocodilianos, anfíbios e peixes (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; Ferreira *et al.* 2007, 2008; Viola *et al.*, 2008a, 2009; Dvorakova *et al.*, 2015; Fermino *et al.*, 2015, 2019; Ortiz *et al.*, 2017).

O clado aquático é composto, predominantemente, por espécies de vertebrados de hábitos aquáticos (anuros, peixes, ornitorrincos, jacarés e quelônios) cujos vetores podem ser sanguessugas, descritas como vetores para anuros, peixes, tartarugas e serpentes aquáticas, e insetos hematófagos (flebotomíneos, coretrelídeos e culicídeos). Esse clado é considerado basal do gênero *Trypanosoma* e muito importante para estudos evolutivos da família Trypanosomatidae (Ferreira *et al.*, 2007; 2008; Bartlett-Healy *et al.*, 2009; Fermino *et al.*, 2015, 2019; Bernal & Pinto, 2016; Spodareva *et al.*, 2018). Os tripanossomas desse clado se distribuem em dois subclados principais. Um subclado é constituído, predominantemente, por tripanossomas de peixes dulcícolas e marinhos e alguns tripanossomas de répteis como tartarugas (*T. chelodinae* Jakes, O'Donoghue & Adlard, 2001 e *Trypanosoma mocambicum* Piennar, 1962) e jacaré (*Trypanosoma clandestinus* Teixeira & Camargo, 2016). Corroborando isso, um tripanossoma de ornitorrinco (*Trypanosoma binneyi* Mackerras, 1959) também se encontra presente nesse clado. No segundo subclado predominam os tripanossomas de anuros, apenas um tripanossoma de lagarto (*T. therezieni* Brygoo, 1963 de camaleão de Madagascar), e isolados de possíveis vetores: flebotomíneos, coretrelídeos e culicídeos (Bartlett-Healy *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2007, 2008; Fermino *et al.*, 2013, 2015, 2019; Bernal & Pinto, 2016).

Os tripanossomas de anuros são considerados de grande importância para a compreensão evolutiva da família Trypanosomatidae. Devido ao seu comportamento de vida, podem transitar do ambiente aquático para o terrestre, sendo assim, convivendo com vetores dos dois ambientes, como sanguessugas (aquáticos) e dípteros (terrestres) (Bartlett-Healy *et al.*, 2009; Bernal & Pinto, 2016; Fermino *et al.*, 2013, 2019; Ferreira *et al.*, 2008; Spodareva *et al.*, 2018).

Além disso, os tripanossomas de anuros apresentam a maior plasticidade morfológica dentro do gênero *Trypanosoma* (Ferreira *et al.*, 2007; Spodareva *et al.*, 2018). As três primeiras descrições de espécies do gênero *Trypanosoma* foram a partir de análise em esfregaços sanguíneos de rãs (Spodareva *et al.*, 2018). A primeira espécie,

Trypanosoma rotatorium (Mayer, 1843), é considerada espécie-tipo do gênero *Trypanosoma* e apresenta morfologia e movimento peculiares tendo sido, a princípio, descrita como ameba (*Amoeba rotatoria*) Laveran, 1901. Posteriormente, *Trypanosoma ranarum* Danilewsky, 1885 e *Trypanosoma loricatum* Dutton, Todd & Tobey, 1907 foram descritas. Inicialmente, devido ao movimento, esses organismos foram considerados protozoários ciliados - *Paramecium loricatum* e *Undulina ranarum* (Lankester, 1871; Mayer, 1843).

Em 1965, Dimond fez uma revisão taxonômica dos tripanossomas de anuros e reconheceu 26 espécies, além de definir morfotipos presentes no sangue desses hospedeiros vertebrados (Figura 2).

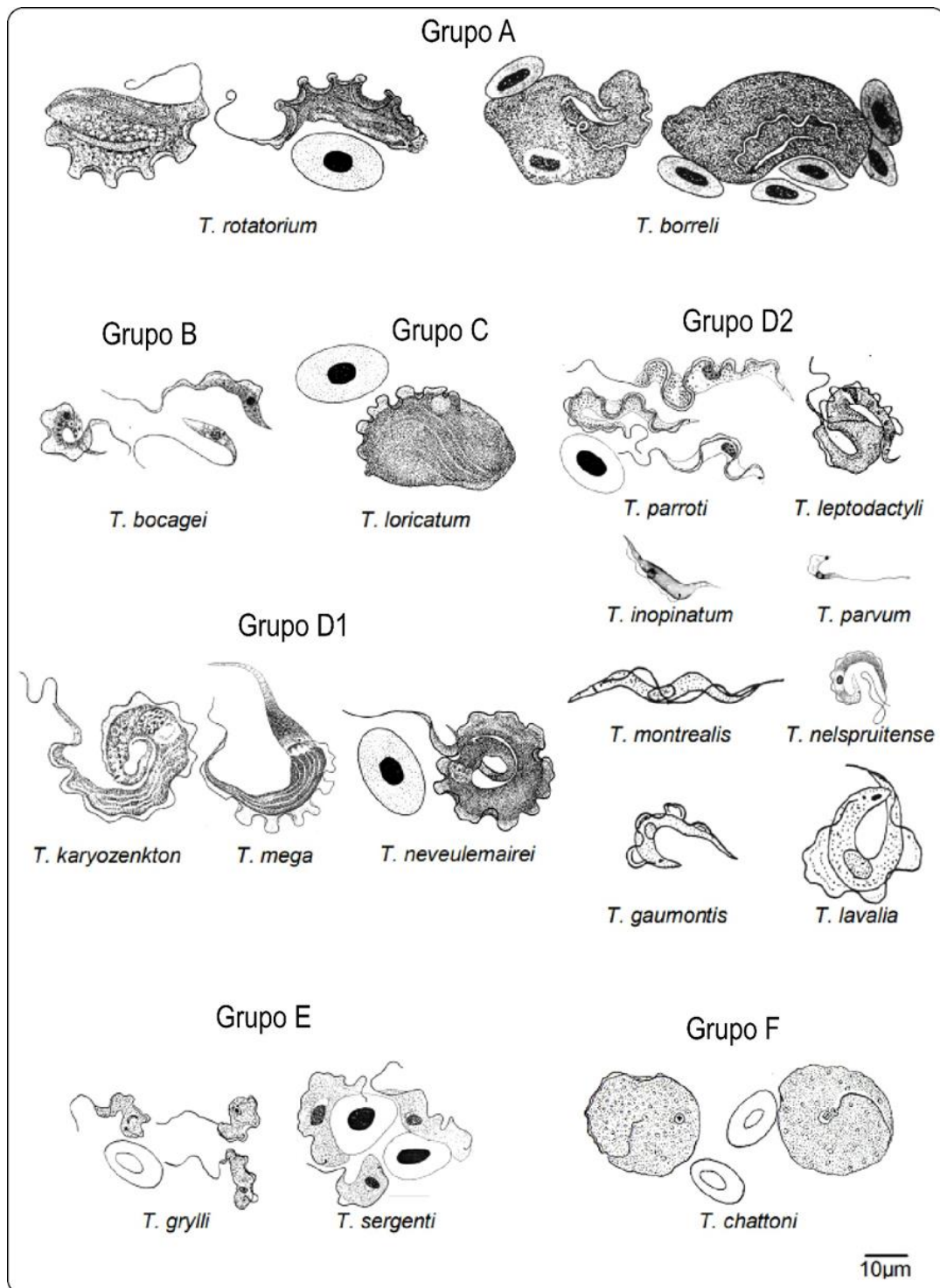


Figura 2: Morfotipos propostos por Dimond (1965) infectando o sangue de anuros.

A proposta de classificação de tripanossomas de Dimond (1965) foi baseada em marcadores morfológicos das formas sanguíneas presentes nos anuros, enquadrada em grupos de A a F. O grupo A apresenta corpo achatado e em forma de folha. O grupo B apresenta corpo achatado com região anterior larga, a partir do cinetoplasto, se estreitando posteriormente. O grupo C apresenta corpo robusto, comprido e ovoide. O grupo D se

subdivide em dois morfotipos (D1 e D2), ambos com corpo alongado e extremidades estreitas; o grupo D1 tem o cinetoplasto mais próximo do núcleo do que a extremidade posterior; o grupo D2 tem o cinetoplasto mais próximo da extremidade posterior do que do núcleo. O grupo E tem corpo piriforme e o grupo F tem o corpo esférico.

Na revisão de Bardsley & Harmsen (1973), 60 espécies de tripanossomas de anuros foram validadas por parâmetros tradicionais. A fim de estabelecer parâmetros taxonômicos mais confiáveis para a classificação dessas espécies, os autores propuseram a combinação dos seguintes critérios: distribuição geográfica, hospedeiro invertebrado de origem, hospedeiro vertebrado de origem, morfologia, citologia e fisiologia, além do comportamento e padrão reprodutivo (ciclo de vida).

Em geral, os principais parâmetros utilizados para descrição de tripanossomas de anuros são: hospedeiro vertebrado, origem geográfica e morfologia (Desser, 2001; Lemos *et al.*, 2008; Leal *et al.*, 2009). Embora o número de espécies descritas em anuros seja elevado, a maioria não foi cultivada e nem crio preservada, impedindo assim, estudos moleculares comparativos com novos isolados e espécies. A ausência de amostras das espécies já descritas impossibilita uma completa revisão taxonômica molecular desse grupo, já que informações sobre morfologia e hospedeiros de origem não são suficientes para definir espécies (Bardsley & Harmsen, 1973; Ferreira *et al.*, 2007).

Sabe-se que os tripanossomas de anuros são altamente pleomórfico em suas formas sanguíneas, apresentando as maiores e mais diversas morfologias encontradas no sangue de todos os hospedeiros já analisados. No entanto, o pleomorfismo aparente e as infecções mistas por diferentes tripanossomas impossibilitam afirmar se os tipos morfológicos (morfotipos) são estágios distintos de uma mesma espécie ou são espécies diferentes (Ferreira *et al.*, 2007; Attias *et al.*, 2016; Spodareva *et al.*, 2018).

As formas epimastigotas e tripomastigotas podem variar conforme as condições do meio de cultivo, temperatura e tempo de cultura (Ferreira *et al.*, 2007; Lemos *et al.*, 2008; Attias *et al.*, 2016). Em um estudo com infecção experimental de *Bufo americanus* Holbrook, 1836 com *Trypanosoma fallisi* Martin & Desser, 1990, Martin & Desser (1991a) descreveram duas fases de infecção com alterações na morfologia associadas à estação do ano. O início da infecção era constituído por formas tripomastigotas largas, observadas no final da primavera e durante todo o verão; e as formas mais finas e curtas se revelaram presentes em todas as estações do ano/durante o ano inteiro. Sabe-se que alterações morfológicas associadas à sazonalidade são consideradas uma resposta do

hospedeiro às baixas temperaturas. Resultados semelhantes, como morfologia, tempo de infecção e temperatura foram observadas por Reilly & Woo (1982).

Os tripanossomas observados na Europa, na América do Norte e na Ásia em estudos anteriores (Diamond, 1965; Bardsley & Harmsen, 1973; Desser, 2001; Ferreira *et al.*, 2008) se assemelham a alguns morfotipos encontrados em anuros brasileiros. Embora os morfotipos encontrados sejam muito semelhantes aos descritos para diversas espécies como *Trypanosoma bocagei* França, 1911, *Trypanosoma chattoni* Mathis & Leger, 1911, *T. rotatorium* e *T. fallisi* os estudos filogenéticos moleculares realizados com os isolados brasileiros não observaram similaridade gênica e a existência dessas espécies no Brasil (Ferreira *et al.*, 2007, 2008).

No Brasil, *Trypanosoma borelli* Marchoux & Salimbeni, 1907 foi descrita em *Scinax ruber*, da família Hylidae (Bardsley & Harmsen 1973); além de outras diversas espécies, que foram descritas com base na morfologia de formas encontradas no sangue de anuros da família Leptodactylidae: *Trypanosoma ocellati* Brumpt, 1936, *Trypanosoma leptodactyli* Carini, 1910, *Trypanosoma celestinoi* Brumpt, 1936 e *T. rotatorium* em *Leptodactylus ocellatus* Linnaeus, 1758; *T. chattoni* em *L. fuscus* e *T. rotatorium*-like em *L. chaquensis* (Lemos *et al.*, 2008). A única espécie de tripanossoma de anuro brasileiro descrita com base em um conjunto de parâmetros morfológicos e moleculares foi *Trypanosoma herthameyeri*, posicionada filogeneticamente e caracterizada morfolologicamente em trabalho realizado por Attias *et al.* (2016).

Em relação aos vetores, as sanguessugas (classe Hirudinea, filo Annelida) são consideradas ectoparasitos hematófagos com baixa especificidade de hospedeiro vertebrado, podendo ser vetores de *Trypanosoma* para anfíbios (Bardsley & Harmsen, 1973), peixes (Molyneux, 1977), répteis (Molyneux, 1977; Siddall & Desser, 1992; Fermino *et al.*, 2015) e mamíferos (Hoare, 1972). Em estudos de filogenia molecular, os tripanossomas transmitidos por sanguessugas aquáticas foram posicionados no grupo aquático, reforçando a estreita relação entre vetor, hospedeiro e ambiente (Hamilton *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2014; Fermino *et al.*, 2015). Sendo assim, os anuros com hábitos de vida aquáticos são mais suscetíveis a infecções por tripanossomas através das sanguessugas (Barta & Desser, 1984; Desser, 2001).

As famílias de sanguessugas apontadas como vetores de tripanossomas de anuros são Glossifoniidae, Piscicolidae e Hirudinidae (Bardsley & Harmsen, 1973). A princípio, as sanguessugas foram associadas à transmissão a partir da observação de *Trypanosoma inopinatum* Sargent & Sargent, 1904 em *Helobdella algira* syn. *Batrachobdella algira*

(Moquin-Tandon, 1846), sanguessugas comuns de *Rana esculenta*. Sendo assim, foi proposto que *H. algira* seria o vetor de *T. inopinatum* para *Rana esculenta* (Billet, 1904; Brumpt, 1906). Posteriormente, o desenvolvimento de *T. falisii* foi descrito em *Bufo* sp. e sanguessugas. No entanto, os estudos realizados utilizaram anuros e/ou sanguessugas naturalmente infectados na natureza, e não foram comparados.

Em anuros, diversos insetos hematófagos são considerados vetores, como dípteros dos gêneros *Aedes* (Bailey, 1962; Ramos Urdaneta-Morales, 1977), *Corethrella* Coquillett, 1902 (Johnson *et al.*, 1993; Bernal & Pinto, 2016), *Culex* (Desser *et al.*, 1973, 1975; Bartlett-Healy *et al.*, 2009), *Lutzomyia* França, 1924 (Ayala 1968; Ayala & McKay, 1971), *Phlebotomus* Loew, 1845 (Ferreira *et al.*, 2008), e *Sergentomyia* Hertig, 1948 (Nzeli *et al.*, 2014). Diversos insetos se alimentam do sangue de anuros, alguns exclusivamente, e são considerados vetores potenciais na transmissão (Anderson & Ayala, 1968; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977; Bernal & Pinto, 2016).

1.3.2) Estudos moleculares de *Trypanosoma* em anfíbios

Em relação aos estudos moleculares, há poucos trabalhos sobre diversidade de espécies de tripanossomas em anuros. Maslov *et al.* (1996) realizaram a primeira análise filogenética, na qual *T. rotatorium* foi agrupado com tripanossomas de peixes, *Trypanosoma triglae* Neumann, 1909, *Trypanosoma carassi* (Mitrophanov, 1883) e *T. boissoni*, formando um grupo basal aos demais tripanossomas. Além disso, essa análise foi a primeira a relacionar um grupo formado por hospedeiros de hábitos aquáticos (peixes e anfíbios). Em seguida, Lukes *et al.* (1997) realizaram um trabalho que incluiu onze tripanossomas e corroborou a existência do grupo aquático por tripanossomas de anuros (*T. rotatorium*) e peixes (*T. boissoni*, *T. triglae* e *T. carassi*), agrupando organismos transmitidos por sanguessugas. Além disso, Haag *et al.* (1998), analisando um número maior de tripanossomas, observaram que *Trypanosoma mega* Dutton & Todd, 1903 (anuro) e *T. therezieni* (camaleão) também se posicionaram no grupo aquático, reafirmando, assim, a monofilia do grupo.

Em dois trabalhos desenvolvidos por Ferreira *et al.* (2007, 2008), os autores incluíram, pela primeira vez, isolados de anuros e flebotomíneos do Brasil em análises filogenéticas, revelando uma enorme diversidade genética e várias espécies novas. Os tripanossomas foram isolados de bufonídeos, leptodactilídeos e hilídeos de diferentes espécies e biomas do Brasil, e distribuídos em três grupos aparentemente relacionados com as famílias dos hospedeiros: An01, compreendendo tripanossomas de hilídeos e

leptodactílídeos, An02, com isolados de bufonídeos e leptodactílídeos e An03, com isolados de bufonídeos, leptodactílídeos e flebotomíneos. A composição dos três grupos (An01- An03) sugeriu a ocorrência de eventos de trocas de tripanossomas de anuros de diferentes famílias. Nos artigos citados, todos os tripanossomas previamente descritos foram agrupados no clado An04: *T. ranarum* de ranídeo dos Estados Unidos, *Trypanosoma neveulemairei* Brumpt, 1928 de ranídeo da Europa, *T. mega* de bufonídeo da África, *T. rotatorium* e *T. fallisi* de ranídeos do Canadá (Ferreira *et al.*, 2007, 2008).

Atualmente, das mais de 60 espécies de tripanossomas descritas em anuros, apenas oito são consideradas espécies válidas, com base no posicionamento em filogenia molecular: *T. chattoni* de *Rana pipiens* Schreber, 1782 dos Estados Unidos; *T. rotatorium* de *Bufo regularis* (Reuss, 1833) do Canadá; *T. ranarum* de *Rana pipiens* e *Rana catesbeiana*, do Canadá e dos Estados Unidos; *T. fallisi* isolado de *Bufo americanus* Holbrook, 1836, do Canadá e dos Estados Unidos; *T. neveulemairei* isolado de *Rana esculenta*, da antiga Iugoslávia na Europa; *T. mega* de *Bufo regularis* da África; e *Trypanosoma tungarae* Cope, 1864 foi detectada em amostras de sangue de *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864), uma espécie de rã Neotropical, capturada no Panamá (Clark *et al.*, 1995; Attia *et al.*, 2016; Bernal & Pinto, 2016). No Brasil, é reconhecida somente a espécie *T. herthameyeri* de Souza & Camargo, 2016 de *Leptodactylus chaquensis*, *L. latrans* e *L. fuscus*, dos biomas Caatinga e Pantanal (Sato, 2022).

A espécie *T. herthameyeri* foi a primeira espécie de tripanossoma descrita em anuros brasileiros com isolamento em cultura, e foi caracterizada morfolologicamente e posicionada em filogenia molecular (Attias *et al.*, 2016). Já *T. tungarae* não foi cultivada, sendo a descrição baseada em morfologia e sequência de SSU rRNA. Com a descrição dessas duas espécies, baseadas em análises filogenéticas, cinco clados foram identificados. An01 ao An05. An02 sendo constituído por *T. herthameyeri* e o An05 sendo constituído por *T. chattoni* e *T. tungarae*.

As filogenias inferidas para *Trypanosoma* com marcadores moleculares utilizam sequências de genes ribossômicos (rRNA) (Ferreira *et al.*, 2007; Hamilton *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2012; 2013). Os ribossomos são compostos por duas subunidades com quatro tipos de RNAs: a subunidade maior (LSU), que contém os rRNAs 28S, 5.8S e 5S, e a subunidade menor (SSU) que contém o 18S rRNA. A maioria destes genes está organizada em uma unidade de transcrição única denominada “cístron ribossômico”, transcrita pela RNA polimerase I, que está presente em múltiplas cópias organizadas como repetições *tandem*, que são compostas por unidades de transcrição (cistrons

ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS) (Sogin *et al.*, 1986; Torres-Machorro *et al.*, 2010) (Figura 2).

As subunidades 18S e 24S são formadas por sequências altamente conservadas que são intercaladas por espaçadores internos transcritos (ITS1-4) de conservação moderada. Os espaçadores transcritos ETS (espaçador externo) e IGS (espaçador intergênico) apresentam sequências muito variáveis possibilitando a identificação de diferentes genótipos e linhagens dentro uma mesma espécie (Sogin *et al.*, 1986) (Figura 2).

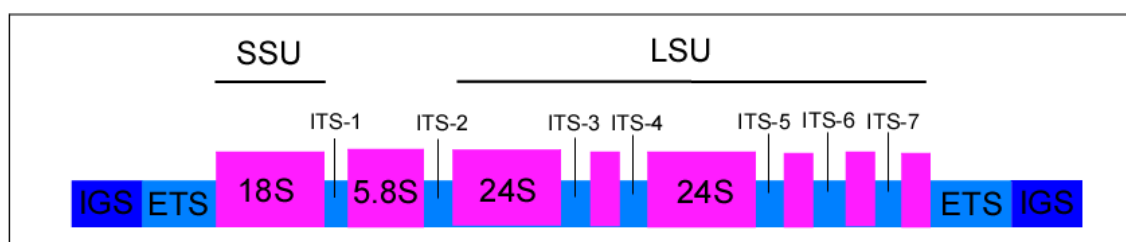


Figura 3: Representação do gene ribossômico (rDNA) constituído pela subunidade menor (SSU), subunidade maior (LSU) e espaços internos transcritos (ITS). Adaptado de Hernández & Carvalho (2014).

A subunidade menor (SSU rRNA) tem se tornado marcador comum para estimar a biodiversidade de determinada amostra biológica, devido à sua distribuição e funcionamento universal em todos os organismos conhecidos (Sogin *et al.*, 1986). Além disso, sua sequência gênica e estrutura secundária são formadas por nove regiões variáveis (VI – V9), das quais V2, V4 e V9 têm sido consideradas as mais adequadas para avaliar a biodiversidade de eucariotos (Hadziavdic *et al.*, 2014).

Para organismos da classe Kinetoplastida, as sequências do gene ribossômico têm sido bastante utilizadas para inferir relações filogenéticas para estabelecer os principais grupos naturais dentro da família Trypanosomatidae e para estabelecer a identificação de gêneros, espécies e genótipos dentro do gênero *Trypanosoma* (Stevens & Gibson, 1999; Maslov *et al.*, 2019; Simpson *et al.*, 2006; Ferreira *et al.* 2007, 2008; Viola *et al.*, 2008; Cavazzana *et al.*, 2010; Lukes *et al.*, 2014).

Além disso, os tripanossomas possuem dois genes codificadores de enzimas (GAPDH). Essas enzimas estão relacionadas com a glicólise e estão localizadas em compartimentos celulares diferentes: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase citosólica

(cGAPDH), de cópia única, e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH), com duas cópias (Kendall *et al.*, 1990; Hannaert *et al.*, 1992). A versão glicolítica do gene GAPDH (gGAPDH) é um marcador valioso para filogenia e taxonomia dos tripanosomatídeos com identificação a nível de gênero e espécie (Figura 4).

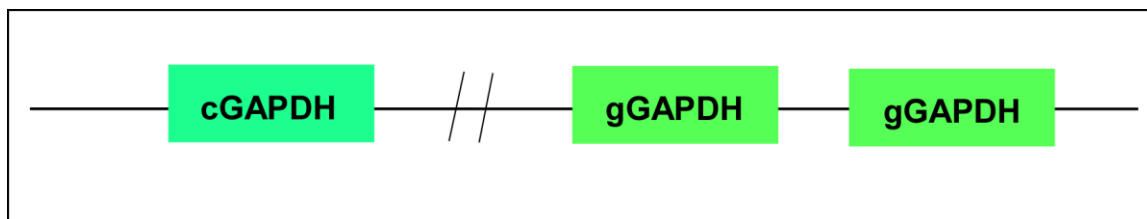


Figura 4: Representação esquemática de dois genes codificantes de enzimas: Gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase citosólica (cGAPDH) e glicossômica (gGAPDH). Adaptado de Hernández & Carvalho (2014).

O uso combinado das análises filogenéticas realizadas com sequências de gGAPDH e SSU rRNA apresentam topologias congruentes, sendo que o uso concatenado desses dois genes gera altos valores de suporte (Hamilton *et al.*, 2004; Viola *et al.*, 2008a; 2009). Além disso, vários isolados do gene gGAPDH estão disponíveis em bancos de dados, facilitando a comparação de espécies já existentes com candidatos a novas espécies e novos genótipos (Hamilton *et al.*, 2004, 2005, 2007; Viola *et al.*, 2008; 2009; Fermino *et al.*, 2013, 2015; Attias *et al.*, 2016).

Justificativa

.....

2) *Justificativa*

As análises morfológicas, morfométricas e moleculares são importantes e essenciais, pois, auxiliam na distinção entre gêneros e possíveis espécies de hemoparasitos. Além disso, o conhecimento abrangente da diversidade é uma condição indispensável para que sejam inferidas relações filogenéticas consistentes que, por sua vez, serão o arcabouço de uma nova taxonomia dos hemoparasitos. Com um conjunto confiável de informações, será possível inferir árvores filogenéticas mais bem resolvidas e, assim, entender melhor a história evolutiva desses parasitos. Com isso, essa distinção e identificação da biodiversidade hemoparasitária é necessária para estudos posteriores sobre interação parasito-hospedeiro.

Objetivos

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

- Analisar a biodiversidade de espécies de hemogregarinas e tripanossomas associados a répteis e anfíbios procedentes das Regiões Centro-Oeste e Sudeste Brasileiras, com o uso da taxonomia integrativa através de análises morfológicas e moleculares.

3.2) Objetivos específicos

- Pesquisar a presença de hemoparasitos, a partir de extensões sanguíneas das amostras procedentes dos répteis e anfíbios coletados, realizando a análise morfológica e morfométrica das formas evolutivas dos hemoparasitos observados;
- Pesquisar a presença de estágios evolutivos teciduais dos hemoparasitos, a partir de análise histológica de fragmento de órgãos dos animais coletados, realizando a análise morfológica e morfometria dos parasitos teciduais;
- Analisar o desenvolvimento das formas evolutivas de *Trypanosoma* em meio de cultura.
- Realizar a caracterização molecular de espécies de hemoparasitos de répteis e anfíbios, a partir da técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) convencional ou Nested-PCR;
- Inspeccionar os animais para presença de ectoparasitos e, quando possível, relacionar a presença desses ectoparasitos nos hospedeiros vertebrados (anfíbios e répteis) como possíveis vetores de hemoparasitoses.
- Descrever, se possível, novas espécies de hemoparasitos que acometem esses hospedeiros vertebrados (anfíbios e répteis).

Materiais e Métodos

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Autorizações

O estudo foi submetido e autorizado pelo Comitê de Ética na Utilização Animal do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, (CEUA – UNESP, nº do protocolo 1061) (Anexo 1) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO, nº do processo 61940) (Anexo 2).

4.2) Locais de estudo

A parte laboratorial foi desenvolvida em cinco Universidades:

- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Setor de Parasitologia, sendo esta a instituição sede da pesquisa onde a doutoranda realizou grande parte da pesquisa, como as análises morfológicas, e morfométricas dos hemoparasitos, bem como a análise molecular de hemogregarinas.
- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Taxonomia e Filogenia de tripanosomatídeos, cidade de São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Marta Maria Geraldine Teixeira e do Pós-doutorando Bruno Fermino, onde a doutoranda aprendeu e executou as análises dos tripanosomatídeos (Anexo 3).
- *Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Laboratorio de Helminología*, cidade do México, sob supervisão do Prof. Dr. Alejandro Francisco Ocegüera Figueroa, onde a doutoranda aprendeu e executou a identificação das espécies de sanguessugas associadas aos testudines brasileiros (Anexo 4).
- *University of the Free State, Department of Zoology and Entomology (Bloemfontein, África do Sul)*, sob supervisão do professor Doutor Edward Charles Netherlands através de auxílio remoto nas identificações e descrições de espécies de hemogregarinas.
- Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Pesquisa e Estudo em Animais Silvestres (LAPAS), com auxílio do Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos e toda a equipe nas coletas executadas no Mato Grosso e Goiás.

As coletas ocorreram em locais distribuídos entre os estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, onde a doutoranda e equipe realizaram as coletas (Tabela 1, Figura 5).

➤ ***Estado de Mato Grosso***

As coletas foram realizadas em região que se localiza na divisa com o Estado de Goiás (Leste), cujo bioma é de transição entre Cerrado e Pantanal e por ser “habitat” de répteis e anfíbios. Assim como na região de Goiás, citada anteriormente, o Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos também a utiliza como local de pesquisa.

➤ ***Estado de Goiás***

O local onde a coleta foi executada fica situado na região Centro-Oeste, faz parte da Bacia Tocantins-Araguaia e margeia o Rio Vermelho que desagua no Rio Araguaia, região localizada entre as cidades Aruanã e Britânia. Esse tem como característica o bioma Cerrado, cuja vegetação é marcada por árvores e arbustos tortuosos, cascas grossas e raízes profundas. A área foi escolhida por ser habitat natural de répteis e anfíbios sendo utilizada para pesquisa pelo Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos.

➤ ***Estado do Mato Grosso do Sul***

As coletas foram realizadas na Reserva Particular de Patrimônio Natural Cisalpina, Brasilândia, Mato Grosso do Sul, onde o bioma predominante é o Cerrado, além de se tratar de área de confluência dos rios Verde e Paraná. É uma extensa várzea inundada periodicamente na época das chuvas, com um complexo sistema de lagoas, córregos e canais interligados entre si e ao canal do rio Paraná. A área foi escolhida por ser habitat natural de répteis e anfíbios sendo utilizada para pesquisa pelo Prof. Titular Reinaldo José da Silva (licença SISBIO nº 59230-1).

➤ ***Estado de São Paulo***

Nesse estado, onde predomina o Bioma Mata Atlântica, foram coletados répteis (principalmente serpentes e lagartos) e anfíbios procedentes de três propriedades privadas: 1) Fazenda São Sebastião do Paraíso e proximidades, cidade de Boa Esperança do Sul. 2) Fazenda Carandá, cidade de Araraquara. 3) Fazenda Santa Júlia, cidade de Gavião Peixoto. O presente estudo foi encaminhado para o responsável pelas propriedades e obtido a autorização de permanência, durante período de coleta, em terra privada (Anexo 6).

Tabela 1: Lista de Localidades amostradas com suas respectivas coordenadas geográficas. MT = Mato

Grosso; GO = Goiás; MS = Mato Grosso do Sul; SP = São Paulo.

Localidade	Município	Estado	Coordenadas
Faz. São Sebastião do Paraíso	Boa Esperança do Sul	SP	21°51'36.83"S, 48°27'3.56"O
Fazenda Santa Júlia	Gavião Peixoto	SP	21°50'43.74"S, 48°28'43.43"O
Fazenda Carandá	Araraquara	SP	21°52'30.28"S, 48°13'50.78"O
Pesqueiro - Faz. São Sebastião do Paraíso	Gavião Peixoto	SP	21°50'41.83"S, 48°28'10.24"O
RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°15'34.36"S, 51°54'18.96"O
Riacho cano RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°16'0.49"S, 51°54'7.65"O
Lagoa buraco 2 RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°11'18.00"S, 51°54'12.40"O
Estrada rio Paraná RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°13'38.20"S, 51°52'37.10"O
Ao redor da AIQ 2, RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°17'30.60"S, 51°54'50.30"O
Estrada Rio Bom Jardim RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°17'20.98"S, 51°55'2.76"O
Estrada Rhinella RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°17'41.10"S, 51°55'11.60"O
Rio novo RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°19'53.47"S, 51°56'39.61"O
Estrada Beira Rio RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°16'40.23"S, 51°55'30.20"O
Rancho do Japonês	Araguaiana	MT	14°35'49.1"S, 51°42'55.71"O
Alojamento CEPEMA	Cocalinho	MT	14°31'40.16"S, 51°41'34.07"O
Rio Pindaíba. Rancho do Japonês	Araguaiana	MT	14°35'47"S, 51°43'9.59"O
Riacho 2	Araguaiana	MT	14°32'51.38"S, 51°40'47.96"O
Lagoa 2. Rancho do Japonês	Araguaiana	MT	14°35'53.44"S, 51°42'56.43"O
Fazenda Boa Esperança - Lago Jacaré	Cocalinho	MT	14°46'44.82"S, 51°32'50.86"O
Fazenda Boa Esperança	Cocalinho	MT	14°46'32.27"S, 51°32'50.29"O
Riacho	Nova Xavantina	MT	14°31'48.03"S, 51°41'43.88"O
Riacho 1	Araguaiana	MT	14°32'13.49"S, 51°40'38.81"O
Faz. Amado Batista	Cocalinho	MT	14°28'39.27"S, 51°36'31.95"O
Banhado estrada (lago Pseudis)	Cocalinho	MT	14°45'56.81"S, 51°32'18.29"O
Estrada	Araguaiana	MT	14°35'5.29"S, 51°41'19.15"O
Estrada	Araguaiana	MT	14°33'16.46"S, 51°40'52.44"O
Fazenda Sertaneja Retiro	Cocalinho	MT	14°26'19.98"S, 51°35'20.17"O
Rancho do César – Rio Vermelho	Britânia	GO	15°10'44.82"S, 51°9'58.48"O
Cabanas Hotel São Pedro	Britânia	GO	15° 14'30.80"S, 51°9'27.05"O
Rio Tigrinho	Britânia	GO	15° 13'42.20"S, 51°9'30.0"O
Rio Araguaia	Itacaiú	GO	15°04'39.81"S, 51°26'68,91" O

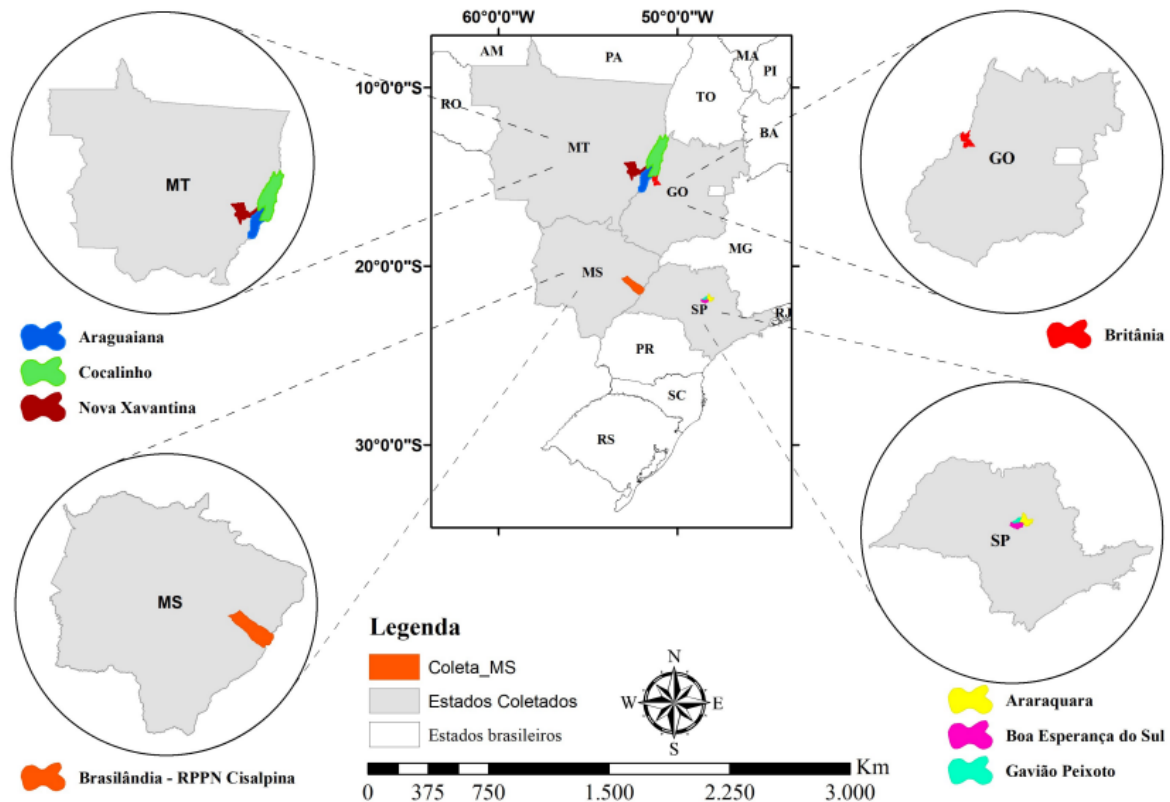


Figura 5. Mapa das localidades que foram amostradas para hemoparasitos de répteis e anuros.

4.3) População de estudo

Foram analisados hemoparasitos de animais de vida livre pertencentes ao grupo dos répteis (serpentes, lagartos, crocodilianos e testudines) e anfíbios (anuros – sapos, pererecas e rãs) que foram encontrados no período de coleta nas regiões estipuladas. A nomenclatura dos répteis e anuros e a identificação das espécies foram realizadas a partir da classificação adotadas por Frost (2011) (*Online Reference*), pela Sociedade Brasileira de Herpetologia - SBH (2010). Os animais encontrados foram contidos para coleta de sangue e alguns exemplares eutanasiados para coleta dos fragmentos de órgãos (coração, baço, fígado, pulmões e rins), seguindo a autorização da CEUA e do SISBIO.

4.4) Contenção e identificação dos animais.

Para a coleta do sangue os animais foram submetidos à contenção física com equipamentos apropriados, seguindo normas semiológicas para cada grupo de animais.

Em relação aos répteis, os testudines foram capturados por pesca, através de rede ou manualmente pela carapaça, imobilizados por contenção física (Portelinha *et al.*, 2013) e marcados por perfuração carapacial (Malvasio *et al.*, 2003). Os crocodilianos foram

capturados pela busca ativa utilizando às mãos ou varas de pesca com corda de aço. A contenção foi realizada vedando os olhos e a boca com fita adesiva transparente e amarrando as patas com cordas (Viana *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011) (Figura 5).



Figura 6 (A-D): Captura e contenção de crocodilianos para coleta de sangue.

As serpentes não peçonhentas foram capturadas utilizando ganchos apropriados e imobilizadas pela contenção física. As serpentes peçonhentas foram capturadas com ganchos apropriados e contidas de duas maneiras: manualmente com as presas imobilizadas com blocos de isopor ou inseridas em tubos de plástico transparentes (Brazil, 2008; Vogt, 2008). Os lagartos foram capturados manualmente ou utilizando um pano, o qual é colocado em cima do indivíduo, em seguida contido dorsalmente e marcado na cauda (Haklová-Kočíková *et al.*, 2014).

Em relação aos anfíbios, os indivíduos foram capturados manualmente através do método de procura visual diurna e noturna.

Os hospedeiros capturados (répteis e anfíbios) tiveram seus comprimento-rostro-cloacal (CRC) medidos utilizando-se balança pendurada ou paquímetro (precisão de 0,01 mm) e sua massa foi obtida com o uso de balanças Pesola®. Além disso, durante a contenção foi executada a identificação da faixa etária e observação do sexo (Zippel *et al.*, 2001; Brasil, 2008; Vogt, 2008; Velasco *et al.*, 2009).

4.5) Ectoparasitos: coleta e armazenamento

Todos os indivíduos capturados foram inspecionados para presença de ectoparasitos. Os ectoparasitos encontrados foram armazenados de três maneiras: em álcool 70%, em formalina tamponada (10%) para posterior identificação e histologia, ou congelados à -20° C para execução da análise molecular (PCR).

4.6) Coleta e armazenamento dos fragmentos de órgãos.

Alguns animais foram eutanasiados para obtenção dos órgãos para análise histopatológica e molecular. Os animais foram fixados em solução de formol 10% e preservados em álcool 70%, de acordo com a licença de captura/coleta/transporte

expedida pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (licença 59230-1). Todos os indivíduos que não foram mortos para coleta dos órgãos foram soltos em seu habitat natural, logo após captura e coleta das amostras.

A eutanásia foi executada através da aplicação de anestésico comercial 50 mg/kg (Thiopentax®) intracerebral pelo forame magno em répteis e intraperitoneal em anfíbios (Sebben, 2007; Soares *et al.*, 2017).

Para a análise tecidual, os animais foram necropsiados e *imprints* de parte dos órgãos (fígado, baço, coração, pulmões e rins) foram confeccionados. Outros fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10%, para posterior análise histopatológica. Para a análise molecular, os órgãos (fígado, baço, coração, pulmões e rins) foram armazenados em tubos esterilizados e acondicionados em freezer à -20°C até execução da técnica molecular.

4.7) Preparo e análise das lâminas histológicas

Os fragmentos de órgãos e ectoparasitos, previamente fixados em formalina tamponada (10%) e mantidos refrigerados a 10°C, foram desidratados com etanol por 30 minutos, embebido em resina, seccionado e, cada secção foi corada com hematoxilina e eosina (HE). Por fim, as lâminas foram examinadas em microscopia óptica convencional, para análise morfológica de possíveis formas evolutivas dos hemoparasitos presentes nessas amostras (Demoner *et al.*, 2013).

4.8) Coleta, armazenamento e preparo das amostras de sangue.

A amostra de sangue foi coletada com seringas de 1 mL e/ou 3 mL e agulhas descartáveis (22/19), por punção do seio venoso paravertebral cervical (Zippel *et al.*, 2001) em répteis e anfíbios maiores, e em anfíbios menores por punção cardíaca. Imediatamente após a coleta de sangue, foram confeccionadas de 2-5 extensões sanguíneas e o restante do sangue foi armazenado para realização de análise molecular. Em anfíbios, além disso, uma parte do sangue foi colocada em meio de cultura para pesquisa de tripanossomas. Para execução da PCR, uma alíquota foi adicionada em tubo de poliestireno contendo EDTA (anticoagulante) da Kasvi® e armazenada a -20 °C até a execução da PCR. Já para análise dos tripanossomas, o restante de sangue coletado foi separado para hemocultura, adicionado em tudo de ensaio contendo 3 mL de meio

bifásico (BAB-LIT) e em incubadas à 25 °C (temperatura ambiente) para posterior análise na Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Taxonomia e Filogenia de tripanosomatídeos. A quantidade de sangue coletada variou de acordo com o tamanho e peso do indivíduo analisado, sendo no máximo 2 mL colhido (Figura 7).



Figura 7: Coleta de sangue pelo seio paravertebral cervical em répteis (A-C) e confecção de extensões sanguíneas (D).

Após confecção das extensões sanguíneas, estas foram deixadas em temperatura ambiente (25 °C) para secagem, e foram, posteriormente, fixadas com metanol absoluto e coradas com Giemsa Eosina Azul de Metileno Merck® diluído em água destiladas (pH 7.0 for 50 min) a 10%, de acordo com Eisen & Schall (2000).

4.9) Cultivo *in vitro* dos tripanossomas

Na Universidade de São Paulo, as hemoculturas provindas das coletas que apresentaram positividade para os tripanossomas foram mantidas em cultura e analisadas diariamente. Esse meio bifásico, onde o sangue foi inoculado em campo, é composto por uma fase sólida e uma fase líquida. A fase sólida é constituída por BAB (*Blood Agar Base* com 15 % de sangue de coelho) e a fase líquida de meio LIT ou Grace contendo 15 % de soro fetal bovino, 0,8 mg/ml de gentamicina e 5 mg/ml de ampicilina. Após o crescimento inicial dos parasitos em cultura primária, estes foram transferidos do tubo de coleta para garrafas de cultura contendo monocamadas de células de insetos Hi-5 e meio TC100 e incubados a 25° C. Atualmente, os isolados estão mantidos (criopreservados) em nitrogênio líquido (em meio LIT com 10% SFB e 20% DMSO) e depositados na *Trypanosomatidae Culture Collection* da Universidade de São Paulo (TCC-USP). Semanalmente foram confeccionadas lâminas com a intensão de corar os parasitos procedentes das fases logarítmica e estacionária, sendo uma alíquota das culturas lavadas três vezes em PBS, colocadas em lâminas e fixadas em metanol absoluto e coradas com Giemsa Eosina Azul de Metileno Merck® diluído em água destilada a 10% (pH 7.0 por 1 hora) e lavadas em solução de Hank's.

4.10) Análise morfológica e morfométrica dos hemoparasitos.

A análise foi executada em microscopia óptica com auxílio de óleo de imersão em objetiva 100x utilizando o software Qwin (Leica). As formas evolutivas sanguíneas, teciduais e procedentes do meio de cultura foram identificadas segundo dados da literatura (Smith, 1996; Telford Jr., 2009; Viana *et al.*, 2010, Borges-Nojosa *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2017; Bouer *et al.*, 2017; Úngari *et al.*, 2018a; Úngari *et al.*, 2018b; Netherlands *et al.*, 2018; Netherlands *et al.*, 2020).

No cálculo morfométrico, a média e desvio padrão ($M \pm DP$) foram descritos com as medidas em micrometros (μm). Para as hemogregarinas, foram avaliados o comprimento, a largura e a área do corpo e do núcleo do hemoparasito (O'Dwyer *et al.*, 2013). Já em relação aos tripanossomas, tanto os isolados em meio de cultura como os parasitos observados nas extensões sanguíneas foram mensurados da seguinte maneira: comprimento total, comprimento do corpo celular sem flagelo, comprimento do flagelo, distância núcleo-porção anterior e núcleo-porção posterior, distância núcleo-cinetoplasto, largura da membrana ondulante e largura do corpo celular.

Já a parasitemia para o grupo das hemogregarinas foi determinada pelo número de parasitos observado para cada 2.000 eritrócitos, com 20 réplicas de 100 eritrócitos (RBC) examinados por campo óptico (Godfrey *et al.*, 1987; Godfrey *et al.*, 1990).

4.11) Análise Molecular:

4.11.1) Hemogregarinas

➤ Extração de DNA

Para extração de DNA das amostras sanguíneas (100 μl) e dos tecidos foi empregado o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após extração, as amostras foram acondicionadas em freezer - 20 °C até a realização da PCR.

➤ Oligonucleotídeos e condições de amplificação.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em equipamento NanoDrop 2000/spectrophotometer (Thermo Scientific) e submetidas à análise molecular para amplificação parcial do gene 18S rRNA. Os oligonucleotídeos assim como as condições de amplificação do termociclador “MyCycler™ thermalcycler” (BioRad®) constam nas Tabelas 2 e 3. A reação de amplificação de PCR foi realizada com volume final de 25 μL , contendo 1 μL (10 pmol) de cada *primer*, 12.5 μL de Master Mix MyFi™ Mix

Bioline® e 5 µL do DNA extraído, com água *nuclease-free* utilizada para preencher até o volume final. Em seguida, os produtos derivados da PCR foram mantidos a 4 °C até a realização da eletroforese.

Tabela 2: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas na PCR para haemogregarinas de anfíbios e répteis coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.

Gene	Reação	Primer	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon	Referência
18S rRNA	PCR	HepF300 Hep900	ATACATGAGCAAAATCTCAAC CTTATTATTCCATGCTGCAG	600pb	Ujvari et al. (2004)
	PCR	4558 2733	GCTAATACATGAGCAAAATCTCAA CGGAATTAACCAGACAAAT	1120pb	Mathew et al. (2000)
	PCR	Hemo 1 Hemo 2	TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC	800pb	Perkins and Keller (2001)

Tabela 3: Condições do ciclo para cada par de oligonucleotídeos utilizado na PCR para haemogregarinas de anfíbios e répteis coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.

Primer	Ciclo Inicial (<i>Hot Start</i>)	Nº de ciclos	Anelamento e extensão	Extensão Final
HepF30/Hep900	94 °C / 3 min	35	94 °C /45s, 56 °C / 60s e 72°C /60s	72 °C /7 min
4558/2733	94 °C / 3 min	40	94 °C /60s, 56 °C / 60s e 72°C /90s	72 °C /7 min
Hemo 1/Hemo 2	94 °C / 5 min	35	94 °C /60s, 48 °C /60s e 72°C /5min	72 °C /5 min

Foram utilizados controles positivos dos hemoparasitos e controles negativos (água ultrapura) para descartar produtos amplificados considerados falsos negativos e falsos positivos. Os controles positivos para haemogregarinas estão presentes no banco de controles positivos do Laboratório de Parasitologia, Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu.

➤ *Eletroforese*

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Pronadisa®) em tampão TBE 1X para presença de produtos amplificados utilizando-se 3µL de cada produto da reação misturados a 1 µL de tampão de amostra. Os géis de agarose foram

corridos em cuba horizontal “Hoefer HE 33” (GE Healthcare®). Fragmentos foram visualizados por coloração com “GelRed™” (Biotium®) e separados por 50 minutos a 100 volts sendo visualizados em Fotodocumentador “Major Science UVDI®”. Os fragmentos amplificados foram comparados com um marcador de tamanho molecular “1Kbplus DNA ladder” (Thermofisher). Em seguida separados para purificação e sequenciamento e enviados à empresa Genotyping Diagnósticos Genéticos™.

4.11.2) Ectoparasitos: sanguessugas

➤ Identificação

Todos os animais coletados foram inspecionados para ectoparasitos.

Os espécimes de sanguessugas foram identificados usando chaves taxonômicas e descrições (Ringuelet, 1976, 1981, 1985; Sawyer, 1986) e através da comparação com espécimes tipos depositados na “Colección Nacional de Helminths, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México”. A análise e dissecções dos espécimes selecionados foram feitas com auxílio de Nikon Estereomicroscópio SMZ-U.

➤ Coloração de sanguessugas

As sanguessugas foram colocadas em álcool 96% por 10 minutos e, em seguida, tingidas com Paracarmin de Mayer por 1 a 3 minutos. Depois, lavadas em álcool 96% por 10 minutos, hidratadas em concentrações decrescentes de álcool: 70%, 50%, 25% e por fim, água destilada (10 minutos em cada concentração). Posteriormente, coradas com Hematoxilina de Delafield por 3 a 5 minutos. Lavadas em água destilada. Diferenciadas em água acidulada a 2% com ácido clorídrico até atingir uma coloração rosa claro. Lavadas em água destilada novamente. Em seguida, gotas de Carbonato de Lítio foram adicionadas no meio com água destilada até atingirem uma coloração azul-roxeador. Depois, lavadas em água destilada por 10 minutos. Desidratadas em gradações decrescentes de álcool, até chegar a álcool absoluto (10 minutos em cada concentração e 20 minutos no álcool absoluto). Clarificadas agregando Salicilato de Metila aos poucos, nos exemplares em álcool absoluto. E por fim, montadas em lâminas usando Bálsamo do Canadá, etiquetadas e colocadas para secar.

➤ Técnicas moleculares

As técnicas moleculares seguiram o protocolo de execução de acordo com Ocegüera-Figueroa (2012). As amostras de tecidos de sanguessugas foram obtidas da ventosa posterior, para minimizar a possibilidade de contaminação com DNA do hospedeiro, que poderia estar presente no trato gastrointestinal da sanguessuga. “Kit” de extração de tecido (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA) foram usados para lise tecidual, extração de DNA total e purificação, de acordo com as normas do fabricante.

A subunidade do citocromo c oxidase mitocondrial (COI), a subunidade I da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (ND1), o gene 12S rDNA (12S), assim como o 18S rDNA (18S), a região ITS (com os espaçadores de transcrição 1 e 2 flanqueando o gene ribossomal 5.8S) foram amplificados de acordo com as seguintes condições: COI, 94 °C (5 min), 30 ciclos de 94 °C (45 s), 48 °C (45 s), 72 °C (1 min) e extensão final de 72 °C (7 min). Gene 18S: 94 °C (5 min), 35 ciclos de 94 °C (20 s), 47 °C (20 s), 68 °C (50 s) e extensão final de 70 °C (7 min). Genes 12S e 28S: 94 °C (5 min), 44 ciclos de 95 °C (1 min), 52 °C (1 min), 70 °C (1 min) e extensão final de 72 °C (7 min). Região ITS: 95 °C (5 min), 35 ciclos de 95 °C (30 s), 50 °C (30 s), 72 °C (1.5 min) e extensão final de 72 °C (8 min) (Figueroa, 2012). Os oligonucleotídeos utilizados para cada gene e as reações de amplificação de cada fragmento do gene foram conduzidos usando o “Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare, Piscataway, NJ) segundo Ocegüera-Figueroa (2012).

Os produtos de PCR foram purificados com AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, Massachusetts, USA). As reações de sequenciamento foram conduzidas no Laboratório de Biodiversidade Nacional (LANABIO) em um sequenciador ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Os produtos do sequenciamento (forward e reverse) foram alinhados e editados no Geneious Pro v.5.1.7 (Biomatters Ltd. Auckland, New Zealand). O alinhamento de todas as sequências desse estudo e disponíveis no GenBank foi executado utilizando o programa do Instituto Europeu de Bioinformática MUSCLE v. 3.7 (Edgar, 2004).

Para a análise filogenética foram executadas três filogenias, a análise de Máxima Parcimônia (MP), a análise de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI). Em relação à MP, dos dados dos genes 18S, 28S, 12S e COI, esta foi realizada no PAUP (Swofford, 2002) com 100 repetições. Gaps foram tratados como dados perdidos. Os valores de Bootstrap para as análises combinadas foram obtidos em TNT com 1000 pseudoréplicas. Os índices de Consistência e Retenção foram calculados em PAUP

(Swofford, 2002). A BI foi conduzida em MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Os dados foram divididos por gene para COI, 12S, ND1, 28S e ITS. O modelo evolucionário GTR + I + G foi aplicado para cada dado baseado no “Akaike Information Criterion” via FindModel (Tao *et al.*, 2008). E por último, a análise de ML foi executada utilizando RAxML v. 8.2 (Stamatakis, 2014). O melhor modelo de substituição foi selecionado através do *Akaike Information Criterion* (Schliep, 2011; R Core Team, 2013). Todas as árvores foram analisadas no programa FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2018).

➤ ***Microscopia eletrônica de varredura***

Para Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), as sanguessugas foram desidratadas em ponto crítico seco com CO₂, e então montadas em um *stub* com fita de carbono, revestida de ouro, e observada em Hitachi modelo s-2460N SEM (Hitachi, Tóquio, Japão). O material-tipo será depositado na Coleção de Helminthos Nacionais (CNHE), Instituto de Biologia, Universidade Nacional Autônoma do México, México Cidade, México.

4.11.3) *Tripanossomas*

➤ ***Extração de DNA***

O sangue armazenado em tubos de EDTA e fragmentos de órgãos (baço, fígado, coração e rim) dos animais previamente diagnosticados positivos foram levados ao Laboratório da Universidade de São Paulo, onde a extração do DNA segue um protocolo padronizado no Laboratório da Prof. Dra. Marta Maria Geraldete Teixeira.

Para extrair o DNA de amostras, primeiramente adiciona 50 µL da amostra em um *eppendorf* e coloca para secar à 37 °C durante uma hora, ressuspende em 200 µL de solução DIGSOL (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, NaCl 117 mM e SDS a 1%), adiciona 400 ng de Pronase e 200 ng de RNase e incuba à 37 °C durante 12 horas. Para precipitar o DNA, adiciona 400 µL de acetato de amônia 4M, homogeneiza vigorosamente por 30 segundos várias vezes ao longo de pelo menos 15 minutos, à temperatura ambiente, e centrifuga durante 20 minutos a 12.000 rpm a 10 °C, inverte o sobrenadante num novo tubo e depois adiciona 1 mL de etanol absoluto, homogeneiza suavemente a solução e centrifuga como descrito acima. Para lavar o DNA, descarta o sobrenadante e adiciona etanol 70%, homogeneiza suavemente e repete o mesmo processo de centrifugação. Depois, descarta o sobrenadante e deixa o DNA secar a 37 °C durante 40 minutos e, em

seguida, adiciona 80 µL de TE (Tris-EDTA: Tris-HCl 2 M pH 7,5 (1,25 mL); EDTA 0,5 M pH 8,0 (0,5 mL) em H₂O) para eluir o produto.

➤ **Oligonucleotídeos e condições de amplificação.**

As reações Nested-PCR (Noyes *et al.*, 1999) foram utilizadas para a amplificação gene SSU rRNA e do gene gGAPDH de amostras de material direto (sangue e fragmento de órgãos). Os oligonucleotídeos utilizados, as condições de amplificação e a temperatura de anelamento foram padronizados como consta na Tabela 4.

Para a 1ª amplificação do gene gGAPDH foram utilizados os oligonucleotídeos GAPDH SF e GAPDH SR e para a 2ª amplificação os oligonucleotídeos GAP 3F e GAP 5R (Fermino *et al.*, 2013). Para a amplificação do gene SSU rRNA foram utilizados os oligonucleotídeos 927F e 927R e para a 2ª amplificação os oligonucleotídeos 609F e 706R (Maia da Silva *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006).

Tabela 4: Oligonucleotídeos e ciclos de amplificação e temperatura utilizados nas diferentes reações de PCR para amplificação de tripanossomas de anuros coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil.

Gene	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Condições de amplificação
SSU rRNA	Primeira reação: 927F: GAAACAAGAAACACGGGAG 927R: CTACTGGGCAGCTTGGA	95 °C/3min 30 ciclos: 94 °C/60s, 55 °C/60s, 72 °C/60s 72 °C/10min
	Segunda reação: 609F: CACCCGCGGTAATTCCAGC 706R: TTGAGGTTACAGTCTCAG	
gGAPDH	Primeira reação: GAPDH SF: GTGGCGGKGTGTYGACATG AACA GAPDH SR: TTGGAGTCRTAGATRGAGCT	95 °C/3min 34 ciclos: 94 °C / 60 s, 55 °C / 60 s, 72 °C / 60 s 72 °C / 10 min
	Segunda reação: GAP 3F: GTGAAGGCGCAGCGCAAC GAP 5R: CCGAGGATGYCCTTCATG	

➤ **Eletroforese**

De 5 a 10 µl dos produtos das reações de PCR foram homogeneizados com 2 µl de tampão de amostra e submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato; 2 mM de EDTA, pH 8). Foi utilizado o marcador de peso

molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Fermentas®) e corado com *Gel Red® NucleicAcid Gel Stain* (Biotium®) e fotografado sob luz UV.

➤ ***Clonagem dos produtos amplificados da PCR***

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram clonados no vetor TOPO TA Cloning (Invitrogen®), utilizados para transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH10β. As células foram transformadas e diretamente transferidas para placa com meio LB ágar com 100 µg/ml de ampicilina e mantidos à 37 °C por 12 horas. Os clones foram ampliados em meio LB líquido por mais 12 horas à 37 °C à 200 rpm. Por fim, os *pellets* foram purificados com o sistema *Wizard Plus SV Minipreps DNA Pufication System* (Promega®, São Paulo, SP, Brasil).

➤ ***Sequenciamento***

Foram utilizados o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®), conforme especificações do fabricante para o preparo das reações para o sequenciamento dos fragmentos de DNA clonados e dos produtos amplificados por PCR. Aproximadamente 200 ng de DNA plasmidial e 10 ng de oligonucleotídeos (M13F e M13R) foram utilizados, chegando ao volume final de 10 µL. Após a reação, o DNA foi precipitado e analisado no sequenciador automático *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer*.

➤ ***Alinhamento das sequências, análise dos dados e filogenia***

A identidade das sequencias foi verificada através do BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e os eletroferogramas *forward* e *reverse*, gerados automaticamente, foram submetidos ao alinhamento consenso com auxílio do programa Geneious versão 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012). Posteriormente, as sequências foram depositadas no Banco de dados online GenBank.

Para a realização das análises filogenéticas, as sequências obtidas do gene gGAPDH e 18S rRNA nesse estudo e as sequências disponíveis no GenBank foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE utilizando o software Geneious v. 7.1.3 (Biomatters, <http://www.geneious.com>). Já as sequencias obtidas do gene 18S rRNA foram alinhadas com o programa *Clustal W* alterando os parâmetros relativos à inserção de *gaps* (peso de inserção=1, extensão=1), ambos anexados ao programa *MEGA 7* (Kumar *et al.*, 2016).

As inferências filogenéticas foram determinadas pelos métodos ML e BI. Para ML foi usado o programa RaxML v.7.0.3 (Stamatakis, 2006), executando 300/500 replicatas e o modelo de substituições GTR gamma. As BI foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Cem replicatas foram empregadas e o modelo de substituições GTR gamma utilizado com proporção de sítios invariantes. A relação evolutiva entre os isolados e seus clados foi executada pela análise filogenética *Network*, com valores de suporte de 500 replicatas.

O programa Mega 5.05 (Kumar *et al.*, 2016) foi usado para a realização das análises de distâncias genéticas usando o método *Neighbor Joining*. As árvores resultantes de cada análise foram visualizadas usando o programa FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2012) e editadas no Canvas.

Resultado Geral

.....

5) RESULTADO GERAL

Foram utilizadas amostras de répteis e anfíbios de coletas realizadas nos anos de 2017, 2018, 2019 e 2020. Em 2017, foi executado um projeto piloto com coleta no mês de agosto nos estados de Mato Grosso e Goiás. Em 2018, foi realizada uma coleta do dia 31 de julho ao dia 06 de agosto em Mato Grosso. Em 2019, foram realizadas coletas nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul, no período de seca (inverno) nos meses de junho a agosto. No período chuvoso, de verão, houve coletas em dezembro de 2019, janeiro e fevereiro de 2020. Em dezembro de 2019 as coletas foram realizadas no estado de São Paulo; em janeiro de 2020 as coletas foram realizadas nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo; e em fevereiro de 2020 as coletas ocorreram nos estados de Mato Grosso e Goiás. Foram coletados anuros (sapos, pererecas e rãs) e répteis (serpentes, lagartos, crocodilianos e testudines) ao longo desses anos. As informações referentes aos animais coletados constam na Tabela 5.

Tabela 5: Lista de espécies de répteis e anfíbios coletados nos estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo, Brasil, no presente estudo.

Espécie	Família	Estado	Nº
Amphibia: Anura			
<i>Boana raniceps</i> (Cope, 1862)	Hylidae Rafinesque, 1815	MT, MS, GO	28
<i>Boana cf. raniceps</i>	Hylidae	MT, MS	4
<i>Boana caiapo</i> Pinheiro, Cintra, Valdujo, Silva, Martins, Silva & Garcia, 2018	Hylidae	MT	3
<i>Boana faber</i> (Wied, 1821)	Hylidae	MT	1
<i>Boana lundii</i> (Burmeister, 1856)	Hylidae	SP	2
<i>Boana albopunctata</i> (Spix, 1824)	Hylidae	SP	1
<i>Chiasmocleis albopunctata</i> (Boettger, 1885)	Microhylidae Günther, 1858	SP	2
<i>Dendropsophus aff. microcephalus</i>	Hylidae	GO	1
<i>Dendropsophus anataliasiasi</i> (Bokermann, 1972)	Hylidae	MT	3
<i>Dendropsophus araguaya</i> (Napoli & Caramaschi, 1998)	Hylidae	MT	2
<i>Dendropsophus nanus</i> (Boulenger, 1889)	Hylidae	SP	4
<i>Dermatonotus muelleri</i>	Hylidae	MS	6
<i>Elachistocleis cesarii</i> (Miranda Ribeiro, 1920)	Microhylidae	MT, MS	2
<i>Leptodactylus brevipes</i> Cope, 1887	Leptodactylidae Werner 1896	GO	1
<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	Leptodactylidae	SP	4
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824)	Leptodactylidae	MT, SP	17
<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen, 1815)	Leptodactylidae	MT, MS, GO	49
<i>Leptodactylus mystaceus</i> (Spix, 1824)	Leptodactylidae	SP	9
<i>Leptodactylus petersii</i> (Steindachner, 1864)	Leptodactylidae	MT	1
<i>Leptodactylus podicipinus</i> (Cope, 1862)	Leptodactylidae	MT, MS, GO, SP	15
<i>Leptodactylus pustulatus</i> (Peters, 1870)	Leptodactylidae	MT, GO	6
<i>Leptodactylus sp.</i>	Leptodactylidae	MT, SP	7
<i>Osteocephalus taurinus</i> Steindachner, 1862	Hylidae	MT	6
<i>Physalaemus centralis</i> Bokermann, 1962	Leptodactylidae	MT	2
<i>Physalaemus cuvieri</i> Fitzinger, 1826	Leptodactylidae	SP	5
<i>Physalaemus marmoratus</i> (Reinhardt & Lütken, 1862)	Leptodactylidae	MS	1
<i>Physalaemus nattereri</i> (Steindachner, 1863)	Leptodactylidae	MS, MT, SP	9

<i>Physalaemus</i> sp.	Leptodactylidae	MT	1
<i>Pseudis platensis</i> Gallardo, 1961	Hylidae	MS, MT	9
<i>Pseudopaludicola mystacalis</i> (Cope, 1887)	Leptodactylidae	GO	27
<i>Rhinella diptycha</i> (Cope, 1862)	Bufo	MS, MT, GO, SP	35
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i> (Gallardo, 1965)	Bufo	MT	5
<i>Rhinella ocellata</i> (Günther, 1858)	Bufo	MT	4
<i>Scinax fuscovarius</i> (A. Lutz, 1925)	Hylidae	MT	22
<i>Scinax</i> sp.	Hylidae	MS	2
<i>Scinax x-signatus</i> (Spix, 1824)	Hylidae	SP	13
<i>Trachycephalus typhonius</i> (Linnaeus, 1758)	Hylidae	MT, SP, GO	6
Reptilia			
Squamata: Serpentes			
<i>Bothrops moojeni</i> Hoge, 1966	Viperidae	MS, SP	3
<i>Chironius flovolineatus</i> (Jan, 1863)	Colubridae	MT	1
<i>Dipsas mikanii</i> Schlegel, 1837	Colubridae	GO	1
<i>Helicops angulatus</i> Linnaeus, 1758	Colubridae	GO	1
<i>Leptodeira annulata</i> Linnaeus, 1758	Colubridae	MT, GO	3
<i>Oxyrhopus rhombifer</i> Duméril, Bibron and Duméril, 1854	Colubridae	MT	2
<i>Oxyrhopus trigeminus</i> Duméril, Bibron and Duméril, 1854	Colubridae	MT	1
<i>Pseudoboa nigra</i> (Duméril, Bibron and Duméril, 1854)	Colubridae	MT	1
<i>Xenodon matogrossensis</i> (Scrocchi and Cruz, 1993)	Colubridae	MT	1
Squamata: Sauria			
<i>Ameiva ameiva</i> (Linnaeus, 1758)	Teiidae	MT	1
<i>Ameivula ocellifera</i> (Spix, 1825)	Teiidae	MT	1
<i>Hemidactylus mabouia</i> (Moreau de Jonnés, 1818)	Gekkonidae	MS, GO, SP	6
<i>Iguana iguana</i> (Linnaeus, 1758)	Iguanidae	MT, GO	3
<i>Tropidurus oreadicus</i> Rodrigues, 1987	Tropiduridae	MT, MS, GO	19
<i>Tropiduros</i> sp.	Tropiduridae	MT	1
Testudines: Pleurodira			
<i>Chelonoidis carbonarius</i> (Spix, 1824)	Testudinidae	MT	4
<i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweiggr, 1812)	Chelidae	GO, SP	2
<i>Podocnemis expansa</i> (Schweiggr, 1812)	Podocnemidae	GO	3
<i>Podocnemis unifilis</i> Troschel, 1848	Podocnemidae	GO, MT	36
Crocodylia			
<i>Caiman crocodilus</i> (Linnaeus, 1758)	Alligatoridae	MT	44
<i>Paleosuchus trigonatus</i> (Schneider, 1801)	Alligatoridae	MT	1

5.1) Hemoparasitos.

No total, foram coletadas amostras de 445 animais, sendo 136 répteis (45 crocodilianos, 45 testudines, 31 lagartos e 15 serpentes) e 309 anuros (54 sapos, 161 rãs e 94 pererecas). Desse total, através da análise morfológica, foram observados 183 (41,30%) animais positivos. Dos 136 répteis, 80 (58,82%) estavam infectados, sendo 31 (68,88%) crocodilianos, 39 (86,66%) testudines e 11 (73,33%) serpentes. Dos anuros, 102 (33%) estavam infectados, sendo 2 (3,7%) sapos, 54 (33,54%) rãs e 46 (48,93%) pererecas. Quatro anuros estavam coinfectados com haemogregarinas e tripanossomas (Tabela 6): um espécime de *L. labyrinthicus* positivo para *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp.; um espécime de *L. latrans* positivo para *Trypanosoma* sp. e *Hepatozoon* sp.; um exemplar de *L. latrans* positivo para *Trypanosoma* sp. e *Dactylosoma* sp.; e um espécime de *T. typhonius* positivo para *Trypanosoma* sp. e *Dactylosoma* sp.

Tabela 6: Lista de répteis e anfíbios infectados com hemoparasitos identificados através da análise morfológica em microscopia óptica convencional.

Hospedeiros	P (%)	Hemogregarinas			Kinetoplastida	CI
		<i>Haemogregarina</i>	<i>Hepatozoon</i>	<i>Dactylosoma</i>	<i>Trypanosoma</i>	
Amphibia: Anura						
<i>B. raniceps</i>	20 (71,4)				20	
<i>B. cf. raniceps</i>	4 (100)				4	
<i>B. caiapo</i>	2 (66,6)				2	
<i>B. lundii</i>	1 (50,0)				2	
<i>D. aff microcephalus</i>	1 (100)				2	
<i>D. anataliasiasi</i>	1 (33,3)				2	
<i>L. fuscus</i>	1 (25,0)				2	
<i>L. labyrinthicus</i>	6 (35,3)		4*	1	2*	1
<i>L. latrans</i>	30 (61,2)		2*	2*	28*	2
<i>L. petersii</i>	1 (100)				1	
<i>L. podicipinus</i>	5 (33,3)				5	
<i>L. pustulatus</i>	4 (66,6)				4	
<i>L. sp.</i>	2 (28,5)		1		1	
<i>P. platensis</i>	4 (44,4)				4	
<i>R. diptycha</i>	1 (2,8)			1		
<i>R. mirandaribeiroi</i>	1 (20,0)		1			
<i>S. fuscovarius</i>	5 (22,7)				5	
<i>S. sp.</i>	1 (50,0)				1	
<i>S. x-signatus</i>	1 (7,69)				1	
<i>T. typhionius</i>	6 (100)			1*	6*	1
Squamata: Serpentes						
<i>B. moojeni</i>	2 (66,6)		2			
<i>C. flovolineatus</i>	1 (100)		1			
<i>D. mikanii</i>	1 (100)		1			
<i>L. annulata</i>	2 (100)		2			
<i>O. rhombifer</i>	2 (100)		2			
<i>O. trigeminus</i>	1 (100)		1			
<i>P. nigra</i>	1 (100)		1			
<i>X. matogrossensis</i>	1 (100)		1			
Testudines: Pleurodira						
<i>P. expansa</i>	3 (100)	3				
<i>P. unifilis</i>	36 (100)	36				
Crocodylia						
<i>C. crocodilus</i>	31 (70,9)		31			

* CI: Coinfecção.

Através da análise morfológica, por microscopia óptica, foram observados *Trypanosoma* spp. (Capítulo 3) e hemogregarinas (*Dactylosoma* spp. e *Hepatozoon* spp.) (Capítulos 4, 5 e 8) nos anuros. Já em répteis, somente hemogregarinas (*Hepatozoon* sp. e *Haemogregarina* sp.) foram observadas, sendo *Hepatozoon* spp. em serpentes (Capítulos 6 e 7) e em crocodilianos (Capítulo 2), e *Haemogregarina* spp. em testudines (Capítulos 1 e 9). Em lagartos não foram detectados hemogregarinas e tripanossomas.

5.2) Ectoparasitos

Durante a contenção dos animais, foram observados carrapatos, ácaros subcutâneos e sanguessugas. Em três anuros, um *O. taurinus* de Mato Grosso, um *L. latrans* de Goiás

e um *S. fuscovarius* de Goiás foram observados ácaros subcutâneos. Já em relação aos carrapatos, foram observados em quatro anuros (*R. diptycha*) de Goiás e Mato Grosso, e uma serpente (*B. moojeni*) do Mato Grosso do Sul.

Do total de testudines analisados, em onze animais foi possível coletar sanguessugas aderidas a eles, sendo duas *P. expansa* e nove *P. unifilis*. Todas as sanguessugas foram analisadas pelo método molecular e morfológico com auxílio da microscopia óptica convencional e microscopia eletrônica de varredura. Sendo assim, as sanguessugas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Unoculubbranchiobdella* Peralta, Matos & Serra-Freira, 1998.

Na análise histológica das sanguessugas coletadas de sete testudines foi possível observar estruturas internas, localizadas próximas à ventosa posterior e brânquias, que se assemelham a estágios evolutivos de hemogregarinas. Além disso, a análise molecular revelou positividade para hemogregarina (Capítulo 1).

Referências

.....

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E, Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59(5):429-93.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E, Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W. 2005. The new higher level classification of Eucaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399-451.
- Anderson, J.R., Ayala, S.C. 1968. Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: First report from the Americas. *Science* 161: 1023– 1025.
- Arantes, J.B. 1934. *Haemogregarina cyclagras* n. sp. parasita de serpente *Cyclagras gigas* (Duméril e Bribon, 1854). *Revista de Biologia e Hygiene* 5:9
- Araújo, F.A.A., Santalúcia, M., Cabral, R.F. 2003. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. pp. 6-12 In: Cardoso et al. (Orgs.) **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, São Paulo – SP.
- Attias, M., Sato, L.H., Ferreira, R.C., Takata, C.S.A., Campaner, M., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G.; Souza, W. 2016. Developmental and Ultrastructural Characterization and Phylogenetic Analisis of *Tripanosoma herthameyeri* n. sp. of Brazilian Leptodactilydae frogs. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63: 610-622.
- Ayala, S.C., McKay, J. 1971a. *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 18(3):430-3.
- Ayala, S.C. 1971b. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 18(3):433-6.

Ayala, S.C., Lee, D. 1970. Saurian malaria. Development of sporozoites in two species of phlebotomine sandflies. *Science* 167:891-892.

Ball G.H., Chao J., Telford S.R. 1969: *Hepatozoon fusifex* sp. n., a hemogregarine from *Boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. *Journal of Parasitology* 55:800–813.

Ball, H.G. 1967. Some Blood Sporozoans from East African Reptiles. *Journal of Parasitology* 14:198-210.

Bardsley, J., Harmsen, R. 1973. The trypanosomes of anura. *Advances in parasitology* 11:1-73.

Barta, J.R., Ogedengbe, J.D., Martin, D.S., Smith, T.G. 2012. Phylogenetic Position of the Adeleorinid Coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA Sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 171-180. doi: 10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x.

Barta, J.R. 2000. Suborder Adeleorina Léger, 1911. pp. 305-3018 in J.J. Lee, G.F. Leedale and P.C. Bradbury, eds. **An illustrated Guide to the Protozoa**. USA: Society of Protozoologists.

Barta, J.R., Dessler, S.S. 1989. Development of *Babesiosoma stableri* (Dactylosomatidae; Adeleina; Apicomplexa) in its leech vector (*Batrachobdella picta*) and the relationship of the dactylosomatids to the piroplasms of higher vertebrates. *The Journal of Protozoology* 36: 241–253.

Bartlett-Healy, K., Crans, W., Gaugler, R. 2009. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae) *Journal of Parasitology* 95:381–387

Bartlett-Healy, K., Crans, W., Gaugler, R. 2008. Temporal and spatial synchrony of *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae) with their amphibian hosts. *Journal of Medical Entomology* 45:1031–1038.

Bernal, X.E., Pinto, C.M. 2016. Sexual differences in prevalence of a new species of trypanosome infecting túngara frogs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5(1):40

Biasi, N.G., Ferreira, D.F. 2009. Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de K populações independentes. *Revista Brasileira de Biometria* 27: 301-323.

Brasil. 2008. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Introdução Normativa nº169 de 20 de fevereiro de 2008. *Categorias de uso e manejo da fauna silvestre em cativeiro em território brasileiro*.

Bashar, A.R., Abdel-Ghaffar, F.A., Shazly, M.A. 1991. Life cycle of *Hepatozoon mehlhorni* sp. nov. in the viper *Echis carinatus* and the mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 77:402-410.

Bernal, X.E., Pinto, C.M. 2016. Sexual differences in prevalence of a new species of trypanosome infecting tungara frogs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5: 40-47.

Bernard, P.S. 2012. **Anfíbios e Répteis – Introdução ao estudo da herpetofauna brasileira**. Anolis Books, Curitiba, 320pp.

Borghesan, T.C., Ferreira, R.C., Takata, C.S., Campaner, M., Borda, C.C., Paiva, F., Milder, R.V., Teixeira, M.M.G., Camargo, E.P. 2013. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanomastixidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist* 164: 129-152.

Borges-Nojosa, D.M., Borges-Leite, J.B., Maia, J.P., Zanchi-Silva, D., Braga, R.R., Harris, D.J. 2017. A new species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleirina) from the snake *Philodryas nattereri* Steindachner (Aquamata: Dipsadidae) in northeastern Brazil. *Systematic Parasitology* 94:65-72.

Bouer, A., André, A.R., Gonçalves, L.R., Luzzi, M.C., Oliveira, J.P., Rodrigues, A.C., Varini, A.M., Miranda, V.F.U., Perles, L., Wether, K., Machado, R.Z. 2017. *Hepatozoon*

caimani in *Caiman crocodilys yacare* (Crocodylia, Alligatoridae) from North Pantanal, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 26(3):352-358.

Campos-Brites, V.L., Ratin, F.T. 2004. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha river. *Environmental Monitoring and Assessment* 96:273-281.

Carini, A. 1947. Contribuição ao estudo de hemogregarinas de serpentes da família boideos. *Revista Arquivos do Instituto Biológico* 279: 61-63.

Carnaval, A.C.O.Q., Puschendorf, R., Peixoto, O.L., Verdade, V.K., Rodrigues, M.T. 2006. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth* 3:41-48.

Cavalier-Smith, T. 2016. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *European Journal of Protistology* 56:250-76.

Clarck, C.G., Martin D.S., Diamond, L.S. 1995. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42:92–96.

Coêlho, T.A., Souza, D.C., Kawashita-Ribeiro, R.A., Corrêa, L.L. 2021. First record of *Trypanosoma* sp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasiting *Rhinella major* in the Brazilian Amazon. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 93: e20190467. DOI 10.1590/0001-3765202120190467.

Coêlho, T.A., De Souza, D.C., Oliveira, E.C., Correa, L.L., Viana, L.A., Kawashita-Ribeiro, R.A. 2020. Haemogregarine of the genus *Dactylotoma* (Adeleorina: Dactylosomatidae) in species of *Rhinella* from the Brazilian Amazon. *Acta Parasitologica* <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00399-z>

Cook, C.A., Lawton, S.P., Davies, A.J., Smit, N.J. 2014. Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogreagrina fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasites morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. *Parasitology* 141: 1611-1620.

- Conradie, R., Cook, C.A., Preez, L.H., Jordaan, A., Netherlands, E.C. 2016. Ultrastructural Comparison of *Hepatozoon ixoxo* and *Hepatozoon theileri* (Adeleorina: Hepatozoidae), parasiting South African Anurans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 64: 193-203. doi:10.1111/jeu.12351
- Correa, J.K.C., Picelli, A.M., da Silva, M.R.L., Valadão, R.M., Hernández-Ruz, E.J., Viana, L.A. 2022. Phylogenetic analysis of chelonian hemogregarines reveals shared species among the Amazonian freshwater turtle *Podocnemis* spp. and provides a description of two new species of *Haemogregarina*. *Parasitology Research* 121:691–701 <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07405-3>
- Costa, S.C.G., Pessoa, S.B, Pereira, N.M., Colombo, T. 1973. The life history of *Hepatozoon leptodactyli* (Lesage, 19080) Pessoa, 1970: a parasite of the common laboratory animal – the frog of the genus *Leptodactylus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 71:1-18. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761973000100001>.
- Costa, H.C., Guedes, T., Bérnils, R.S. 2022. Lista de répteis no Brasil: Padrões e Tendências. *Herpetologia Brasileira*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5838950> DOI: 10.5281/zenodo.5838950.
- Cunha, A.M., Muniz, J. 1927. Sobre o cyclo endogeno da *Haemogregarina leptodactyli* Lésage 1908 (*Karyolysus*?). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 20(2):307-313
- Da Costa, S.C.G., Pereira, N.M. 1971. *Lankesterella alencari* n. sp., a *Toxoplasma*-like organism in the Central Nervous System of Amphibia (Protozoa, Sporozoa). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 69(3): 397–411
- Davies, A.J., Smith, N.J., Hayes, P.M., Seddon, A.M., Werthem, D. 2004. *Haemogregarina begemina* (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) – past, presente and future. *Folia Parasitologica* 51: 99-108.
- Davies, A.J., Johnston, M.R. 2000. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibian and reptiles. *Advances in Parasitology*, 45:1-107.
- De Biasi, P., Cardoso Junior, R.B., Santos, S.M.A. 1989. Presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) - Coccidia, Haemogregarinidae em exemplar de *Bothrops*

jararaca (Wied, 1984) - Serpentes, Viperidae, Crotalinae - mantido em cativeiro. *Memórias do Instituto Butantan*, 51: 117-121.

De Biasi, P., Pessoa, S.B., Belluomini, H.E. 1972. Novas observações sobre transmissão congênita de hemoprotozoários de serpentes peçonhentas vivíparas. *Memórias do Instituto Butantan* 36: 245-249.

De Biasi, P., Pessoa, S.B., Belluomini, H.E. 1971. Nota sobre a transmissão congênita de hemogregarinas em duas espécies de serpentes peçonhentas vivíparas. *Atlas da Sociedade Brasileira de Biologia do Rio de Janeiro* 15: 27-28.

Demoner, L.C., Rubini, A.S., Paduan, K.S., Metzger, B., Antunes, J.M.A.P., Martins, T.F., Mathias, M.I.C., O'Dwyer, L.H., 2013. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Diseases*. 4:542-546.

Desser, S.S. 2001. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of the trypanosomes. *Journal of Parasitology* 87: 152-160.

Desser, S.S., Hong, H., Martins, D.S. 1995. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbeianae* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algoquin Park, Ontario. *Journal of Parasitology* 81: 212-222.

Desser, S.S. 1993. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. pp. 247-272 in Levine, ed. **Parasitic Protozoa** v.4 Academic Press.

Devořalová, N., Kviceřová, J., Hostovský, M., Šiřoký, P. 2015. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. *Parasitology* 142: 816-826.

Devořalová, N., Kviceřová, J., Ppapousek, I., Javany-Bakht, H., Tiar, G., Kami, H., Šiřoký, P. 2013. Haemomogregarines from western Palearctic fresh turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are coespecific with *Haemogregarina stepanowi* Denilewsky, 1885. *Parasitology*. 141:522-530.

- Diamond, L.S. 1965. Studies on the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of Anura. *Journal of Wildlife Diseases* 44: 1–77
- Durigan, G., Siqueira, M.F., Franco, G.A.D.C. 2007. Threats to the Cerrado remnants of the State of São Paulo, Brazil. *Scientia. Agricola* 64:355-363.
- Durigan, G., Ratter, J.A. 2006. Successional changes in Cerrado and Cerrado/forest ecotonal vegetation in Western São Paulo State, Brazil, *Edinburgh Journal of Botany*. 63:119-130.
- Durham HE. 1902. **Report on the yellow fever expedition to Para of the Liverpool School of Tropical Medicine and Medical Parasitology**. Longmans, Breen and Co., London.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Eisen, R.J., Schall J.J. 2000. Life history of malaria parasite (*Plasmodium mexicanum*): independent traits and basis variation. *Proceeding of Royal Society* 267: 793-799.
- Eterovick, P.C., Carnaval, A.C.O.Q., Borges-Nojosa, D.M., Silvano, D.L.; Segalla, M.V.; Sazima, I. 2005. Amphibian declines in Brazil: An overview. *Biotropia* 37: 166-179.
- Fantham, H.B., Porter, A., Richardson, L.R. 1942. Some haematozoa observed in vertebrates in Eastern Canada, *Parasitology* 34: 199-226. <https://doi.org/10.1017/S0031182000016176>.
- Fermino, B.R., Paiva, F., Viola, L.B., Rodrigues, C.M.F., Garcia, H.A., C.D., Campaner, M., Sheferaw, D., Teixeira, M.M.G., Camargo. 2019. Shared species of crocodilian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South America, including the description of a new species from caimans, *Trypanosoma kaiowa* n. sp. *Parasites & Vectors* 12(1):225 doi: 10.1186/s13071-019-3463-2.
- Fermino, B.R., Paiva, F., Soares, P., Tavares, L.E.R., Viola, L.B., Ferreira, R.C., Botero-Arias, R., De Paula, C.D., Campaner, M., Takata, C.S.A., Teixeira, M.M.G., Camargo, E.P. 2015. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely

phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4:368-378.

Fermino, B.R., Viola, L.B., Paiva, F., Garcia, H.A., De Paula, C.F., Botero-Arias, R., Takata, C.S., Campaner, M., Hamilton, P.B., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. 2013. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasites & Vectors* 6:313. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-313>

Ferreira, J.I.G.S, Costa, A.P., Ramirez, D., Roldan, J.A.M., Saraiva, D., Founier, G.F.R., Sue, A., Zambelli, E.R., Minervino, A.H.H., Verdade, V.K., Gennari, S.M., Marcili, A. 2015. Anuram trypanosomes: phylogenetic evidence for new clades in Brazil. *Systematic Parasitology* 91:63-70.

Ferreira, R.C., Souza A., Freitas, R.A., Campaner, M., Takata, C.S.A., Barreti, T.V., Shaw, J.J., Teixeira, M.M.G. 2008. Phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (*Psychodidae*, *Diptera*) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 427–445.

Ferreira, R.C., Campaner, M., Viola, L.B., Takata, C.S.A., Taketa, G.F., Teixeira, M.M.G. 2007. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology* 134: 1623–1638.

Frost, D.R. 2022. Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural History, New York, USA. Electronic Database, Version 6.0, 2022 <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>

Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C.T. 2000. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience* 50:553-556.

Godfrey Jr., R.D., Pence, D.B., Fedynich, A.M. 1990. Effects of host and spatial factors on a haemoproteid community in mourning doves from western Texas. *Journal of Wildlife Disease* 26: 435-441.

Godfrey Jr., R.D., Fedynich, A.M., Pence, D.B. 1987. Quantification of haematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Disease* 23: 558-565.

Gonçalves, M.W., Carvalho, W.F., Melo e Silva, D., Bastos, R.P.; Da Cruz, A.D. 2014. Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do Cerrado goiano. *Estudos* 41: 89-104.

Gutiérrez-Liberato, G.A., Lotta-Arévalo, I.A., Rodríguez-Almonacid, C.C., Vargas-Ramírez, M. 2021. Molecular and morphological description of the first *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) species infecting a neotropical turtle, with an approach to its phylogenetic relationships. *Parasitology* 148: 747 - 759.

Hadziavdic, K., Lekang, K., Jonassen, I., Thompson, E.M., Troedsson, C. 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific oligonucleotídeos. *Plos One*. 9(2): e87624

Haklová-Kočiková, B., Hižňanová, A., Majláth, A., Račka, K., Harris, D.J., Földvári, G., Tryjanowski, P., Kokošová, N., Malčeková, B., Majláthová, V. 2014. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* - a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasite & Vectors* 7: 1-12.

Haklová, B., Makláthová, V., Majláth, I., Harris, D.J., Petrilla, V., Letschka-Koen, T., Oros, M., Petko, B. 2013. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* blood parasites found in snakes from Africa, America and Asia. *Parasitology*. 141: 389-398.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuclear Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hamilton, P.B., Gibson, W., Stevens, J. 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44(1):15-25.

Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gidley, J., Holz, P., Gibson, W.C. 2005. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology* 35(4):431-43.

- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., Gibson, W.C. 2004. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal of Parasitology* 34: 1393-1404.
- Hannaert, V., Blaauw, M., Kohl, L., Allert, S., Oppendoes, F.R., Michels, P.A. 1992. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology* 55(1-2):115-26.
- Harris, D.J., Borges-Nojosa, D.M., Maia, J.P. 2015. Prevalence and diversity of *Hepatozoon* in native and exotic geckos from Brazil. *Journal of Parasitology* 101:80-85.
- Harris, D.J., Maia, J. P. M. C., Pereira, A. 2011. Molecular Characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology* 97(1):106-110.
- Hayes, P.M., Lawton, S.P., Smit, N.J., Gibson, W.C., Davies, A.J. 2014. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasites & vectors*. 7:50-60
- Hernández, R., Cevallos, A.M. 2014. Ribosomal RNA gene transcripton in trypanosomes. *Parasitology Research*. 113(7): 2415-2424.
- Hernandez, L.M., Ballou, L., Ballou, C.E. 1990. Separation of yeast asparagine-linked oligosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydrate Research* 203:1-11.
- Hoare, C.A. 1972. **The Trypanosomes of Mammals**. Blackwell. Oxford.
- Hoare, C.A. 1932. On protozoal blood parasites collected in Uganda. With an account of the life cycle of the crocodile haemogregarine. *Parasitology* 24: 210-224.
- Holmes, J.C., Price P. 1986. Communities of parasites pp. 187-213 in D.J. Anderson and J. Kikkawa, eds. **Community ecology: patterns and processes**. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Homan, W.L., Limper, L., Verlaan, M., Borst, A., Vercammen, M., Van Knapen, F. 1997. Comparison of the internal transcribe spacer, ITS-1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitology Research* 83: 285–289.
- Hull, R.W., Camin, J. H. 1960. Haemogregarines in snakes: the incidence and identity of the erythrocytic stages. *Journal of Parasitology* 46:515-523.
- Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., Onish, T. 2002. Analysis of the 18S rDNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*, 106: 256-271.
- Jakowska, S., Nigrelli, R.F. 1956. *Babesiosoma* gen. nov. and other babesioids in erythrocytes of cold-blooded vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences* 64, 112–127.
- Jakowska, S., Nigrelli, R.F. 1955. A taxonomic re-evaluation of *Dactylosoma* Labbé 1894, a babesioid of cold-blooded vertebrates. *Journal of Protozoology*, 2(3):8.
- Johnson, R.N., Young, D.G., Butler, J.F. 1993. Trypanosome Transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the Green Treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae), *Journal of Medical Entomology* 30(5):918–921 <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.5.918>
- Junk, W.J., Wantzen, K.M. 2004. The Flood Pulse Concept: new aspects, approaches, and applications - an update. Pp 117-149 in R.L. Welcomme and T. Petr, eds. **Food and Agriculture Organization Regional Office for Asia and the Pacific**, 2nd International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries, Bangkok.
- Karadjian, G., Chavatte, J.M., Landau, I. 2015. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite* 22, 31. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015031>
- Kareshi, W.B., Cook, R.A., Bennett, E.L., Newcomb, J. 2005. Wildlife trade and global disease emergence. *Emerging Infectious Diseases Journal* 11: 1000-1002.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Sones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649

Kendall, G., Wilderspin, A.F., Ashall, F., Miles, M.A., Kelly, J.M. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *The EMBO journal*. 9(9):2751-8.

Khan, R.A., Forrester, T.M., Ross, C.A. 1980. A haemogregarine from the American alligator (*Aligator mississippiensis*). *Journal of Parasitology* 66(2): 324-328.

Kim, B., Smith, T.G., Desser, S.S. 1998. The life history and hos specificity of *Hepatozoon clamatae* (Apicomplexa: Adeleorina) an ITS-1 nucleotide sequence variation of *Hepatozoon* species of frog and mosquitoes from Ontario. *Journal of Parasitology* 84: 789–797.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7):1870-4.

Kvicerová, J., Pakandi, M.; Hypsa, V. 2008. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135: 443-452.

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

Lainson, R., Naiff, R. 1998. *Haemoproteus* (Apicomplexa: Haemoproteidae) of tortoises and turtles. *Proceedings of Royal Society B* 265:941-949

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

Landau, I., Michel, J.C., Chabaud, A.G., Brygoo, E.R. 1972. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de coccidie. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 38: 250-270.

Leal, D.D.M., Dreyer, C.S., Da Silva, R.J., Ribolla, P.E.M., Paduan, K.S, Bianchi, I., O'Dwyer, L.H. 2015. Characterization of *Hepatozoon* spp. in *Leptodactylus chaquensis* and *Leptodactylus podicipinus* from two regions of the Pantanal, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, *Parasitology Research* 114:1541-1549. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4338-x>.

Leal, D.D.M., O'Dwyer, L.H., Ribeiro, V.C., Silva, R.J., Ferreira, V.L., Rodrigues, R.B. 2009. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States – Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(2):199–206.

Lemos, M., Morais, D.H., Carvalho, V.T., D'Agosto, M. 2008. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Parasitology* 94:148–51.

Levine, N.D. 1988. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**. Flórida: CRC Press, Boca Raton.

Levine, N.D. 1971. Uniform Terminology for the Protozoan Subphylum Apicomplexa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 18 (2):352–5. [doi:10.1111/j.1550-7408.1971.tb03330.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03330.x).

Levine, N.D. 1970. Taxonomy of the Sporozoa. *Journal of Parasitology*. 56 (4): 208–209.

Leveille, A.N., Ogedengb, M.E., Hafeez, M.A., Tu, H.H., Barta, J.R. 2014. The complete mitochondrial genome sequence of *Hepatozoon catesbiana* (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina), a blood parasite of the green frog, *Lithobates* (formerly *Rana*) *clamitans*. *Journal of Parasitology*, 100: 651–656.

Lew, A.E., Anderson, G.R., Minchin, C.M., Jeston, P.J., Jorgensen, W.K. 2003. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1)

sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Veterinary Parasitology* 112: 33–50

Lima, L., Espinosa-Alvarez, O., Hamilton, P., Neves, L., Takata, C., Campaner, M., Attias, M., de Souza, W., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. 2013. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasites & vectors* 6(1):221-37.

Lima, L., Silva, F., Neves, L., Attias, M., Takata, C., Campaner, M., de Souza, W., Hamilton, P., Teixeira, M. 2012. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and allied species. *Protist* 163(6):856-72.

Lowick, A., Yaeger, R.G. 1987. Ecological aspects of snake heogregarine infections from two habitats in Southeastern Louisiana. *Journal of Parasitology* 73:1109-1115.

Lukes, J., Skalicky, T., Tyc, J., Votypka, J., Yurchenko, V. 2014a. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 195(2):115-22.

Lukes, J., Kuchta, R., Scholz, T., Pomajbikova, K. 2014b. (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in Parasitology*. 30(8):377-85.

Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Calvas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K., Steininger, M. 2004. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservation International do Brasil, Brasília, DF.

Machado, I.F, Maltchik, L. 2007. Check-list da diversidade de anuros no Rio Grande do Sul (Brasil) e proposta de classificação para as formas larvais. *Neotropical Biology and Conservation* 2: 101-116.

Madsen, T., Ujvari, B., Olsson, M. 2005. Old phytos stay fit: effects of haematozoan infections of life history traits of a large tropical predator. *Oecology* 142: 407-412.

Magro, N.M., DE Oliveira, A.T.; O'Dwyer, L.H. 2016. First report and description of a *Cyrlia* sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from a freshwater turtle Cururu Stingray

Potamotrygon cf. *histris* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) from the Amazon Region, Brazil. *Journal of Fish Diseases* 39:907-911. doi:10.1111/jfd.12425.

Maia, J.P.M.C., Harris, D.J., Pereira, A. 2011. Molecular survey of *Hepatozoon* species in lizards from North Africa. *Journal of Parasitology* 97: 513-517.

Maia Da Silva, F., Rodrigues, A.C., Campaner, M.; Yakata, C.S., Brigido, M.C., Junqueira, A.C., Coura, J.R., Takeda, G.F., Shaw, J.J., Teixeira, M.M. 2004. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and species-specific marker. *Parasitology* 128: 283-294.

Maia, J.P.M.C., Carranza, S., Harris, D.J. 2016. Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: are more data needed? *Journal of Parasitology* 102, 549–552.

Malysheva, M.N. 2014. Early stages of development of *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843) from peripheral blood and internal organs of Anurans *Bufo bufo* (Linnaeus) and *Rana* sp. (Anura). *Parazitologiya* 48(5):373-381. PMID: 25929108

Malvásio, A.M., Molina, F.B., Sampaio, F.A. 2003. Comportamento e preferência alimentar em *Podocnemis expansa* (Schweigger), *P. unifilis* (Troschel) e *P. sextuberculata* (Cornalia) em cativeiro (Testudines, Pelomedusidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 161-168.

Maneyro, R, Carreira, S. 2006. Herpetofauna de la costa uruguaya. pp. 233-246 in Menafría R *et al.*, eds., **Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya**. Montevideo: Vida Silvestre.

Marcili, A., Costa, A.P., Soares, H.S., Acosta, I.C.L., Lima, J.T.R., Minervino, A.H.H., Melo, A.T.L., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., Gennari, S.M. 2013. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. *Journal of Parasitology* 99: 1071–1076.

Marques, O.A.V., Abe, A.S., Martins, M. 1998. Estudo diagnóstico da diversidade de répteis do Estado de São Paulo. pp. 27-38 in R.M.C Castro, ed. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**, Editora Fapesp, São Paulo.

- Martin, D.S., Desser S.S. 1991. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron microscopic study. *Parasitology Research* 77(1): 18-26.
- Martinele, I., Tostes, R., Castro, R., D'Ágosto, M. 2016. Prevalence of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemoproteidae) in tortoises in Brazil and its molecular phylogeny. *Parasitology Research* 115:249-254.
- Martinsen, E.S., Perkins, S., Schall, J. J. 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 47: 261-273.
- Maslov, D.A., Oppendoes, F.R., Kostygov, A.Y., Hashimi, H., Lukes, J., Yurchenko, V. 2019. Recent advances in trypanosomatid research: genome, organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology*. 146(1): 1-27.
- Maslov, D., Votýpka, J., Yurchenko, V., Lukes, J. 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology* 29(1):43-52.
- Mathew, J.S., Van Den Bussche, R.A., Ewing, S.A., Malayer, J.R., Latha, B.R.; Panciera, R.J. 2000. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular morphologic, and life-cycle characters. *Journal of Parasitology* 86: 366–372.
- McCallister, C.T., King, A.W. 1980. Hemogregarines in the red-eared slider *Chrysemys scripta elegans* (Wied) from Arkansas. *Procariotic Arkansas Academy of Science* 34:124.
- McCaulliffe Jr. 1977. An hypothesis explaining variations of haemogregarine parasitemia in diferente aquatic turtles species. *Journal of Parasitology* 63(3): 580-581.
- Mihalca, A.D., Tacka, K., Gherman, C., Lonescu, D.T. 2008. Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles Romania. *Parasitology Research* 102(5): 1081-1083.

- Mihalca, A.D., Achelaritei, D., Popescu, P. 2002. Hemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Dragasani, Vâlcea country, Romania. *Science of Parasitology* 2(2): 22-27.
- Mittermeier, R.A., Gil, P.R., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, J., Mittermeier, C.G., Lamourux, J., Fonseca, G.A.B. 2005. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** Washington, DC: Cemex.
- Moço, T., Silva, R.J., Madeira, N.G., Paduan, K.S., Rubini, A.S., Menezes, D.D., Leal, D.D.M., O'Dwyer, L.H. 2012. Morphological, morphometric, and molecular characterization of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from naturally infected *Caudisoma durissa terrifica* (Serpentes, Viperidae). *Parasitology Research*. 110: 1393-1401.
- Moço, T.C., O'Dwyer, L.H., Vilela, F.C., Barrella, T.H., Silva, R.J. 2002. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97:1169–1176
- Moller, A.P. 1997. Parasitism and the evolution of host life history. *Journal of Ecology* 88:871-881.
- Molyneux, D. 1977. The attachment of *Trypanosoma grayi* in the hindgut of *Glossina*. *Protozoology* 3:83-86.
- Morrison, D.A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology*. 25 (8): 375–82. doi:10.1016/j.pt.2009.05.010. PMID 19635681.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nasiri, V., Mobedi, I., Dalimi, A., Mirakabadi, A.Z., Ghaffarifar, F., Teymurzadeh, S; Karimi, G.; Abdoli, A., Paykari, H. 2014. A description of parasites from Iranian snakes. *Experimental Parasitology* 147: 7-15.
- Negm-Eldin, M.M. 1998. Life cycle, host restriction and longevity of *Babesiosoma mariae* Hoare, 1930. Apicomplexa: Dactylosomatidae). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 105:367–374.

Netherlands, E.C., Cook, C.A., Du Preez, L.H., Vanhove, M.P.M., Brendonck, L., Smit, N.J. 2020. An overview of the Dactylosomatidae (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae), with the description of *Dactylosoma kermi* n. sp. parasiting *Ptychadena anchietae* and *Sclerophrys gutturalis* from South Africa. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 11, 246–260.

Netherlands, E.C., Cook, C.A., Du Preez, L.H., Vanhove, M.P.M., Brendonck, L., Smit, N.J. 2018. Monophyly of species of *Hepatozoon* (Adeleorina: Hepatozoidae) parasitizing (African) anurans, with the description of three new species from hyperoliid frogs in South Africa. *Parasitology*. 145: 1039 - 1050.

Netherlands, E.C., Cook, C.A., Kruger, D.J.D., du Preez, L.H., Smit, N.J. 2015. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(1): 135-141

Netherlands, E.C., Cook, C.A., Smit, N.J. 2014. *Hepatozoon* species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasiting three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). *Parasites & Vectors*, 7:552.

Netherlands, E.C., Cook, C.A., Du Kruger, D.J.D., Du Preez, L.H., Smit, N.J. 2007. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa, *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4:35-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.01.003>.

Nogueira, C.C. 2006. **Diversidade e padrões de distribuição da fauna de lagartos do Cerrado**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Novelli, I.A., Lucas, P.S., Carvalho, R.G., Santos, R.C., Souza, B.M. 2012. Lagartos de áreas de Cerrado na Reserva Biológica Unilavras-Bosqueirão, Ingaí, sul de Minas Gerais, Brasil. *Biota Neotropical* 12: 147-153.

Noyes, H., Stevens, J., Teixeira, M., Phelan, J., Holz, P. 2000. Corrigendum to “A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *International Journal for Parasitology* 29 (2): 331-339.

Nunes Da Cunha, C., Junk, W.J. 2010. A preliminary classification of habitats of the Pantanal of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, and its relation to nacional and international wetland classification systems. pp.127-141 in W.J. Junk, C.J. da Silva, C. Nunes da Cunha & K.M. Wantzen, eds. **The Pantanal: Ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland**. Pensoft, Sofia.

Nzelu, C.O., Kato, H., Puplampu, N., Desewu, K., Odoom, S., Wilson, M. D., Boakye, D.A. 2014. First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), e2630.

Oceguera-Figueroa, A. 2012. Molecular phylogeny of the new world bloodfeeding leeches of the genus *Haementeria* and reconsideration of the biannulate genus *Oligobdella*. *Molecular phylogenetic and Evolution* 62:508-514.

O'Dwyer, L.H., Moço, T.C., Paduan, K.S., Spenassatto, C., Silva, R.J., Ribolla, P.E.M. 2013. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae), from Rattlesnakes (*Crotallus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Experimental Parasitology* 135: 200-207.

O'Dwyer, L.H., Moço, T.C., Barrella, T.H., Vilela F.C., Silva, R.J. 2003. Prevalência de *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) em serpentes recém-capturadas no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(3) <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000300010>

O'Donoghue, P. 2017. Haemoprotozoa: Making biological sense of molecular phylogenies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 6:241-256.

Ogedengbe, M.E., Hafeez, M.A., Barta, J.R. 2013. Sequencing the complete mitochondrial genome of *Eimeria mitis* strain USDA 50 (Apicomplexa: Eimeriidae) suggests conserved start positions for mtCOI- and mtCOIII-coding regions. *Parasitology Research* 112: 4129–4136.

Oliveira, A.T., Araújo, M.L.G, Pantoja-Lima, J, Aride, P.H.R, Tavares-Dias, M.; Brinn, R.P; Mrcon, J.L. 2016. *Cyrylia* sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in the Amazonian freshwater stingray *Patomotrygon wallacei* (cururu stingray) in different hydrological

phases of the Rio Negro. *Brazilian Journal of Biology*. doi.org/10.1590/1519-6984.00416.

Oliveira, J.P., André, M.R., Alves Júnior, J.R.F., Lustosa, A.P.G., Werther, K. 2018. Molecular detection of hemogregarines and haemosporidians in Brazilian free-living testudines. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 7(1):75-84. doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.01.008.

Ortiz, P.A., Garcia, H.A., Lima, L., da Silva, F.M., Campaner, M., Pereira, C.L., Jittapalapong, S., Neves, L., Desquesnes, M., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. 2017. Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed Rattus-borne *Trypanosoma* (Herpetosoma) lewisi and its allied species in blood and fleas of rodents. *Infection, Genetics and Evolution* 63: 380-390. DOI: [10.1016/j.meegid.2017.09.001](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.001)

Pawlowski, J., Audic, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S.S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A.M., Gile, H.G, Holzman, M., Jahn, R., Jirku, M., Keeling, P.J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Lukes, J., Mann, D.G., Mitchell, E.A.D., Nitsche, M., Sauders, G.W., Simpson, A.G.B, Smirnov, A.V., Spouge, J.L., Stern, R.F., Stoeck, T., Zimmermann, J., Schindel, D., Vargas, C. 2012. CBOL Protist Working Group: Barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biology* 10: 1-5.

Peralta, A.S.L, MATOS, E.R., Serra-Freire, N. M..*Unoculubbranchiobdella expansa* gen. nov., sp. n. (Hirudinea:Ozobranchidae) parasito de *Podocnemis expansa* (Chelonia: Pelomedusidae). *Entomologia y Vectores*, 5(5): 161-177, 1998.

Pereira, G. R., Soares, P., Gomes, M. Q., Viana, L.A., Manso, P.P.A., Paiva, P., Oliveira, L.R. 2014. Are fish paratenic natural hosts os the caiman haemoparasite *Hepatozoon caimani*? *Parasitology Research* 13: 351-354.

Perkins, S.L., Keller, A.K. 2001. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotides. *Journal of Parasitology* 87: 870-876.

Perkins, S.L., Martin, J.M. 1999. Conserved oligonucleotídeos fail in the diagnosis of parasitic infection. *Journal of Parasitology* 85: 982-984.

- Pessoa, L.M.B., Scalon, M.C., Carneiro, F.T., Lota, M.G.M, Silva, T.F., Monteiro, R.V., Paludo, G.R. 2016. Ocorrência de hemogregarina em duas espécies de cágados brasileiros. *Acta Scitifica Veterinária* 44: 1381.
- Pessoa, S.B., De Biasi, P., Puerto, G. 1974. Nota sobre a freqüência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*. 38: 69-118.
- Pessoa, S.B., De Biasi, P. 1973. Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon* (Sporozoa: Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras. *Memórias do Instituto Butantan*, 37:291-298.
- Pessoa, S.B., De Biasi, P., Souza, D.M. 1972. Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909), parasita do jacaré-de-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex dolosus* (L. Arribálzaga). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 70: 379-383.
- Pessoa, S.B., Belluomini, H.E., Souza, D. M. 1971. Notas sobre hemogregarinas em serpentes brasileiras xiv- Esporogonia da hemogregarina dea *Bothrops moojeni* Hoje, 1965 no *Culex (Culex) dolosus* (L. Arribálzaga, 1891). *Revista Arquivos do Instituto Biológico* 38(4):253-258.
- Pessoa, S.B., Sacchetta, L., Cavalheiro, J. 1970. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras X – Hemogregarinas da *Hydrodynastes gigas* (Duméril et Bibron) e sua evolução. *Revista Latino Americana de Microbiologia* 12: 197-200.
- Phisalix, M. 1931. Les hémogrégarines de *Crotalus terrificus*. *Bulletin de la Société de Pahologie Exotique*. 24:190–194
- Phisalix, M., Laveran, A. 1913. Sur une hémogrégarine nouvelle de *Lachesis alternates*. *Bulletin de la Société de pahologie exotique* 6:330-332.
- Pierce, M.A., Adlard, R.D. 2004. Haemoparasites from clinical screening of reptiles in South-East Queensland, Australia. *The Veterinary Record* 155: 708-709.
- Picelli, A.M., Carvalho, A.V., Viana, L.A., Malvasio, A. 2015. Prevalence and parasitemia of *Haemogregarina* sp. in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) from the Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 42:191-197.

Pineda-Catalan, O., Perkins, S.L., Peirce, M.A., Esgstrand, R.; Garcia-Davila, C.; Pinedo-Vasquez, M.; Aguirre, A.A. 2013. Revision of Hemoproelid genera, description, and redescription of two species of chelonian hemoproelid parasites. *Journal of Parasitology* 99:1089-1098.

Portelinha, T.C.G., Malvasio, A., Piña, C.I., Bertoluci, J.A. 2013. Reproductive Allometry of *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) in Southern Brazilian Amazon. *Journal of Herpetology* 47(2):232-236..

Prado, C.P.D.A., Uetanabaro, M., Haddad, C.F.B. 2005. Breeding activity patterns, reproductive modes, and habitat use by anurans (Amphibia) in a seasonal environment in the Pantanal, Brazil. *Amphibia-Reptilia* 26:211-221.

Price, P.W. 1980. **Evolutionary biology of parasites**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A. 2018. Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67: 901–904. 10.1093/sysbio/syy032

Rambaut, A. (2012) FigTree v1.4.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed march 2022).

Ramos, B., Urdaneta-Morales, S. 1977. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. *Revista de Biología Tropical*, 25(2), 209-217.

Readel, A.M., Goldberg, T.L. 2010. Blood parasites of frogs from an equatorial African montane forest in western Uganda. *Journal of Parasitology* 96: 448–450.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>

Reilly, B.O., WOO, P.T.K. 1982. The ultrastructure of an anuran trypanosome, *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology* 60: 134–138.

Ribeiro, T.R., Nascimento, J.S., Madeira, J.A., Ribeiro, L.C. 2009. Aferição dos limites da Mata Atlântica na Serra do Cipó, MG, Brasil, visando maior compreensão e proteção de um mosaico vegetacional fortemente ameaçado. *Natureza e conservação* 7(1): 30-49

Ringuelet, R.A. 1985. **Fauna de agua dulce de la República de Argentina, Hirudinea**, FECIC, Buenos Aires, 321 p.

Ringuelet, R.A., 1981. Clave para el reconocimiento de los hirudíneos de México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma del México Serie Zoológica* 52, 89–97.

Ringuelet, R.A., 1976. Los caracteres endosomáticos de *Haementeria officinalis* De Filippi, diagnosis del género, y un estudio de antiguos ejemplares de *Nephelis mexicana* Dugès, 1876 (Hirudinea). pp.129–136 in R.A. Ringuelet 1985 eds. **Fauna de agua dulce de la República de Argentina, Hirudinea**, FECIC, Buenos Aires. 321p

RODRIGUES, M.T. 2005. The conservation of Brazilian reptiles: challenges for a megadiverse country. *Conservation Biology* 19: 659-664.

Rodrigues, M.S., Lima, L., Xavier, S.C.D.C., Herrera, H.M., Rocha, F.L., Roque, A.L.R., Teixeira, M.M.G., Jansen, A.M. 2019. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 8:171-181. doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.02.004

Rodrigues, A.C., Paiva, F., Campaner, M., Stevens, J.R., Noyes, H.A., Teixeira, M.M.G. 2006. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 132(2):215-24.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*. 2012;61(3):539-42.

Rossow, J.A., Hernandez, S.M., Summer, S.M., Altman, B.R., Crider, C.G., Gammage, M.B. 2013. Haemogregarine infections of three species of aquatic freshwater turtles from two sites in Costa Rica. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2:131-135.

Rubini, A.S., Paduan, K.S., Cavalcante, G.G., Ribolla, P.E.M, O'Dwyer, L. H. 2005a. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitology Research* 97: 91-93.

Sabino, J., Prado, P.I. 2000. Perfil do conhecimento da diversidade de vertebrados no Brasil. In: Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica no Brasil. Ministério do Meio Ambiente –MMA, 90f.

Santos, A.L.Q., Pereira, H.C., Silva, J.M.M., Hirano, L.Q.L. 2011. Hemoparasitas em jacaré-açu e jacaré-tinga capturados na APA meandros do rio Araguaia. *Arquivos do Instituto de Biologia* 78(3): 429-433.

Sawyer, R.T., 1986. **Leech Biology and Behavior**. Clarendon Press, Oxford

Segalla, M., Berneck, B., Canedo, C., Caramaschi, U., Cruz, C.A.G., Garcia, P.C.A., Grant, T., Haddad, C.F.B., Lourenço, A.C., Mangia, S., Mott, T., Nascimento, L., Toledo, L.F., Werneck, F., Langone, J.A. 2021. Herpetologia Brasileira vol. 10 n. 1 - Lista de Anfíbios do Brasil. DOI: 10.5281/zenodo.4716176

Sebben, A. 2007. Microdissecação fisiológica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e répteis. pp.301-325 in L.B. Nascimento and M.E. Oliveira eds. (Org.). **Herpetologia no Brasil II**. 1ed. Belo Horizonte - MG: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 1.

Schliep, K.P. 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27, 592–593.

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

Siddall, M.E., Desser, S.S. 2001. Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech, *Placobdella ornata*. *Journal of Parasitology* 87: 1217-1218.

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

Siddall, M.E., Desser, S.S. Prevalence and intensity of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in three turtles species from Ontario with observations on intraerythrocytic development. *Canadian Journal of Zoology* 70:123-128, 1992.

Silvano, D.L., Segalla, M.V. 2005. Conservação de anfíbios no Brasil. *Megadiversidade*, 1: 79-84.

Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V.F., Simpson, A.M., Feagin, J.E., Jasmer, D.P., Stuart, K. 1987. Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *The Journal of biological chemistry*. 262 (13):6182-96.

Simpson, A.G., Stevens, J.R., Lukes, J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*. 22(4):168-74

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

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

Smith, T. G., Desser, S.S., Martin, D.S. The development of *Hepatozoon sipedon* n. sp. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, The Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitology Research* 80:559-568., 1994.

- Soares, P., Borghesan, T.C, Luiz, E.R.T., Vanda, L.F., Marta, M.G.T.; Fernando, P. 2017. *Hepatozoon caimani* Carini, 1909 (Adeleina: Hepatozoidae) in wild population of *Caiman yacare* Daudin, 1801 (Crocodylia: Alligatoridae), Pantanal, Brazil. *Parasitology Research* 116:1907-1916.
- Soares, P., Brito, E.S., Paiva, F., Pavan, D., Viana, L.A. 2014. *Haemogregarina* spp. in wild population from *Podocnemis unifilis* Trschel, 1848 in Brazilian Amazonia. *Parasitology Research* 113: 4499-4503.
- Sogin, M.L., Elwood, H.J., Gunderson, J.H. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83(5):1383-7.
- Souza, M.A., Borriello Filho, A. 1924. Uma nova hemogregrina no sangue de *Bufo crucifer* Wied, 1821 do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 72:275-282.
- Spodereva, V.V., Grybchuk-Ieremenko, A., Losev, A., Votupýka, J., Lukes, J., Yurchenko, V., Krostygov, A.Y. 2018. Diversity and Evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. *Parasite & Vector* 11(1): 447
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21):2688-90
- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Schofield, C.J., Gibson, W. 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in parasitology* 48:1-56.
- Stevens, J.R., Gibson, W. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitology Today*. 15(11): 432-437.
- Su, Y., Feng, J., Jiang, J., Guo, Z., Liu, G., Xu, L. 2014. *Trypanosoma epinepheli* n. sp. (Kinetoplastida) from a farmed marine fish in China, the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Parasitology Research* 113(1):11-8.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis using Parsimony (and Other Methods). Version 4.0b10 (computer software). Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Tao, N., Richardson, R., Bruno, W., Kuiken C., 2008. Find Model. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html> FindModel input (lanl.gov)

Telford Jr., S.R. 2009. **Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text.** 1 ed. Florida: CRC Press.

Telford JR., S.R. 2009. A *Haemocystidium* species from the East African gecko *Lygodactylus capensis grotei*. *Journal of Parasitology* 91: 135-138.

Telford Jr., S.R., Ernest, J.A., Clarck, A.M., Butler, J.F. 2004. *Hepatozoon sauritus*: A polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome analysis. *Journal of Parasitology* 90: 352-358.

Telford Jr., S.R., Wozniak, E.J., Butler J.F. 2001: Haemogregarine specificity in two communities of Florida snakes, with descriptions of six new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) and possible species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Journal of Parasitology* 87: 890–905.

Terford Jr., S.R. 1984. Hemoparasites of reptiles. p. 385-517 in G. L. Hoff, F.L. Frey, and E.R. Jacobson eds. **Diseases of amphibians and reptiles**, Plenum Press. New York

Tomé, B., Maia, J.P., Dalvi, D., Brito, J.C., Carretero, M.A., Pereira, A., Meimberg, H., Harris, D.J. 2014. Patterns of genetic diversity in *Hepatozoon* spp. infecting snakes from North Africa and the Mediterranean Basin. *Systematic Parasitology* 87: 249-258.

Thral, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., De Nicola, D, Fettman, M.J., Lassend, E.D., Rebar, A., Weiser, G. 2007. **Hematologia e Bioquímica Clínica e Veterinária.** São Paulo: Roca.

Torres-Machorro, A.L., Hernández, R. Cavallos, A.M., López-Villasenor, I. 2010. Ribosomal RNA genes in eucaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *Microbiology Review.* 34(1): 59-86.

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

Úngari, L.P., Santos, A.L.Q.; O'Dwyer, L.H., Da Silva, M.R.L., Fava, N.N.M., Paiva, G.C.M., Pinto, R.M.C.; Cury, M.C. 2018a. *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* 117:1535-1548.

Úngari, L.P., Santos, A.L.Q., O'Dwyer, L.H., da Silva, M.R.L., Rodrigues Santos, T.C., da Cunha, M.J.R., de Melo, C.P.R., Cury, M.C. 2018b. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. *Parasitology Research* 117(12):3857-3865. doi: 10.1007/s00436-018-6092-3.

Ursula, H., Korbel, R., Mutschmann, F., Rinder, M. 2014. Blood parasites in reptiles imported to Germany. *Parasitology Research* 113: 4587-4599.

Valdujo, P.H., Silvano, D.L., Colli, G., Martins, M. 2012. Anuran species composition and distribution in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. *Brazilian Society of Herpetology* 7: 63-78.

Valkiūnas, G. 2005. **Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Velasco, A, Colimine, G., Sola, R., Villarroel, G. 2009. Effects of sustained harvests on wild populations of *Caiman crocodilus corocodilus* in Venezuela. *Interchange* 28: 544-548.

Verdade, L. M. *Caiman latirostris*. Pp.18-20 in J.P. Ross ed. **Crocodiles: Status Survey and Conservation Action Plan**. 2^a ed. IUCN.

Viana, L. A., Soares, P., Paiva, F., Silva, J.E., Coutinho, M. E. 2012. Anurans as paratenic hosts in the transmission of the *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. *Parasitology Research* 110: 883-886

Viana, L.A., Paiva, F., Coutinho, M.E., Oliveira, L.R. 2010. *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wildcaiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal region, Brazil. *Journal of Parasitology* 96: 83-88.

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

Vickerman, K. 1976. **The diversity of the kinetoplastid flagellates in: Biology of the Kinetoplastida**. Pp. 1-34 W.H.R. Lumsden & D.A. Evans eds. Academic Press, London/New York/San Francisco.

Viola, L.B., Attias, M., Takata, C.S.A., Campaner, M., Souza, W., Camargo, E.P., Teixeira, M.M. 2009. Phylogenetic Analyses based on small subunit rRNA and Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 594-602.

Viola, L.B., Campaner, M., Takata, C.S., Ferreira, R.C., Rodrigues, A.C., Freitas, R.A., Duarte, M.R., Grego, K.F., Barrett, T.V., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G. 2008. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology* 135(5):595-605.

Vogt, R.C. 2008. **Tartarugas da Amazônia**. Peru: Gráfica BibloS.

Votypka, J., Obornik, M., Volf, P., Svobodova, M., Lukes, J. 2002. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology* 125(3):253-63.

Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Ostman, O. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 191-194.

Wang, E., Ferreira, V.L., Hilmmlstein, J.A. 2005. **Amphibians and Reptiles of the Southern Pantanal**. in Annual Report Pantanal Conservation Research Initiative. Eartwatch Institute.

Wozniak, E.J., Telford Jr., S.R., Gerald, L.M. 1994. Employment of the polymerase chain reaction in the molecular differentiation of reptilian hemogregarines and its application to preventive zoological medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 23: 538-547.

Young, B.E., Lips, K.R., Reaser, J.K., Ibáñez, R., Salas, A.W., Cedeño, J.R., Colomba, L.A., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J.R., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G., Romo, D. 2001. Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15: 1213-1223.

Zippel, K.C., Lillywithe, H.B., Mlandnich, C.R.J. 2001. New vascular system in reptiles: Anatomy and postural hemodynamics of vertebral venomous lexus in snakes. *Journal of Morphology* 250: 1

Capítulo 1

Capítulo 1

Is the leech *Unoculubranchiobdella* sp. a possible vector of turtle's hemogregarines in Brazil?

Manuscrito padronizado nas normas da revista ***Brazilian Journal of Biology***

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Alejandro Ocegüera-Figueroa, Geraldo Torres-Carrera, Edward Charles Netherlands, André Luiz Quagliatto Santos, Reinaldo José da Silva e Lucia Helena O'Dwyer.

**Is the leech *Unoculubbranchiobdella* sp. a possible vector of turtle's hemogregarines
in Brazil?**

**Será a sanguessuga *Unoculubbranchiobdella* sp. um possível vetor de
hemogregarinas em quelônios no Brasil?**

L. P. Úngari^{a*}, A. Ocegüera-Figueroa^b, G. Torres-Carrera^b, E. C. Netherlands^c, A. L. Q.
Santos^d, R. J. da Silva^a and L. H. O'Dwyer^a

^aSetor de Parasitologia, DBBVPZ, Instituto de Biociências, Universidade Estadual
Paulista- UNESP, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil

^bLaboratorio de Helminología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma
de México –UNAM, Tercer circuito s//n, Ciudad Universitaria, Copilco Mexico.

^cDepartment Zoology and Entomology, University of the Free State, PO Box 339,
Bloemfontein, 9300, South Africa.

^dLaboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres, Faculdade de Medicina
Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

*Corresponding author: letsprungari@hotmail.com

ORCID:

Letícia Pereira Úngari: 0000-0002-2982-9336

Alejandro Ocegüera-Figueroa: 0000-0002-5514-9748

Edward Charles Netherlands: 0000-0003-1856-0586

André Luiz Quagliatto Santos: 0000-0002-2807-4592

Reinaldo José da Silva: 0000-0002-3426-6873

Lucia Helena O'Dwyer: 0000-0002-9367-368X

Abstract

Haemogregarina spp. have a heteroxenous life cycle, with vertebrate hosts such as fish and turtles, and vectors such as gnathiid isopods and leeches. In turtles, *Haemogregarina balli* has the best-described life cycle in the genus. However, in Brazil, there are no studies concerning a possible *Haemogregarine* vector. Therefore, in the present study, we bring new insights on a possible vector of *Haemogregarina* found attached to two species of freshwater turtles, *Podocnemis unifilis* and *Podocnemis expansa*, through morphological and molecular analyses. In 2017 and 2019, 33 freshwater turtles were collected from Goiás State, Brazil. During the containment, the animals were inspected for ectoparasites. In two *P. expansa* and nine *P. unifilis* was possible to collect leeches (ten per specimens) attached to them, and they were identified as belonging to the Ozobranchidae family, genus *Unoculubbranchiobdella*. The leeches histological slides revealed hemogregarines structures similar to post-sporogonic merogony found close to the gills and posterior sucker. Moreover, the molecular analysis was able to identify three *Haemogregarina* species, *Haemogregarina embaubali*, *Haemogregarina goianensis* and *Haemogregarina brasiliiana* in the DNA extracted from the leeches. Therefore, the diagnostic set of morphology and PCR amplification revealed new insights on *Haemogregarina* life-cycle's from Brazilian turtles, with leeches belonging to the genus *Unoculubbranchiondella* as possible vectors.

Keywords: Leech, hemoparasite, Brazil, turtles, life cycle, PCR

Resumo

Haemogregarina spp. têm um ciclo de vida heteroxeno, com hospedeiros vertebrados, como peixes e tartarugas, e vetores, como isópodes gnatídeos e sanguessugas. Nas tartarugas, *Haemogregarina balli* tem o ciclo de vida mais bem descrito no gênero. No

entanto, no Brasil, não há estudos sobre um possível vetor da *Haemogregarina*. Portanto, no presente estudo, trazemos novas informações sobre um possível vetor de *Haemogregarina* encontrado aderido a duas espécies de tartarugas de água doce, *Podocnemis unifilis* e *Podocnemis expansa*, através de análises morfológicas e moleculares. Em 2017 e 2019, 33 tartarugas de água doce foram coletadas no estado de Goiás, Brasil. Durante a contenção, os animais foram inspecionados quanto à presença de ectoparasitas. Em duas *P. expansa* e nove *P. unifilis* foi possível coletar sanguessugas aderidas, aproximadamente dez por espécime, identificadas pertencentes à família Ozobranchidae, gênero *Unoculubbranchiobdella*. As lâminas histológicas das sanguessugas revelaram estruturas semelhantes à hemogregarinas, nos estágios de merogonia pós-esporogônica, encontradas próximas às brânquias e ventosa posterior. Além disso, a análise molecular foi capaz de identificar três espécies de *Haemogregarina*, *Haemogregarina embaubali*, *Haemogregarina goianensis* e *Haemogregarina brasiliiana* no DNA extraído das sanguessugas. Portanto, o conjunto diagnóstico de morfologia e amplificação por PCR, revela novos dados sobre a transmissão de *Haemogregarina* em tartarugas brasileiras, com sanguessugas pertencentes ao gênero *Unoculubbranchiobdella* como possíveis vetores.

Palavras-chave: Sanguessuga, Brasil, PCR, hemoparasito, ciclo de vida, tartarugas.

1. Introduction

The wild animals are exposed to a large number of pathogens and parasites, such as ectoparasites and endoparasites (Thrall et al., 2007). Regarding the ectoparasites, about 700 species of leeches have been described around the world, with approximately 100 - 150 belonging to the families Piscicolidae Johnston, 1865 (Burrenson, 2007; Sket and Trontelj, 2008) and Ozobranchidae Pinto, 1921 (Sawyer, 1986).

The ozobranhids are distinguished by the presence of lateral digitiform gills (MacCallum and MacCallum, 1918), being the only non-piscicolid leeches to live in the sea, but they are unique in being permanent ectoparasites of sea turtles (Sawyer, 1986; Christoffersen, 2008). In addition, the ozobranhids feeds exclusively on the blood of aquatic turtles (Oceguera-Figueroa, 2021). Pinto (1921) originally described the family Ozobranhidae, with *Ozobranhus* Pinto, 1921 as the only genus representative at the time. Richardson (1969) redefined the family and added one more genus, *Bogabdella* Richardson, 1969. Both are genera with the presence of a pair of gills per gill segment. In addition, Peralta et al. (1998) introduced one more genus and species, *Unoculubranhiobdella expansa* Peralta, Matos and Serra-Freira, 1998, to the family Ozobranhidae. Therefore, only three species, *B. diversa*, *O. papillatus* and *U. expansa*, are known to infect freshwater turtles (Peralta et al., 1998; Christoffersen, 2008; Oceguera-Figueora, 2021). The first occurring in Lake Boga, Australia, the second in northern India and the *U. expansa* described associated with *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1842), known as the Amazon freshwater turtle, from Belem city, State of Pará, Brazil.

The most common hemoparasite found in chelonians (Reptilia: Testudines) are obligatory intracellular parasites of the Phylum Apicomplexa (Levine, 1970), from hemogregarine group. Four families constitute this group: the Dactylosomatidae Jakowska and Negrelli, 1955, Karyoylidae Labbé, 1894, Hepatozoidae Miller, 1908 and Haemogregarinidae Léger, 1911 (Telford Jr., 2009; Netherlands et al., 2022)

Regarding the Haemogregarinidae three genera, *Haemogregarina* Danilewsky, 1885, *Cyrlia* Lainson, 1981 and *Desseria* Siddall, 1995 can be cited Siddall, 1995. The *Haemogregarina* spp. have a heteroxenous lifecycle (Levine 1988), with vertebrate hosts such as fish and turtles, and vectors such as gnathiid isopods and leeches of the families Glossiphonidae, Ozobranhidae, and Piscicolidae (Siddall 1995; Siddall and Desser

2001; Davies et al. 2004). In turtles, *Haemogregarina balli* Patterson and Desser, 1976 has the best-described life cycle in the genus. This parasite is reported from Ontario province, Canadá, in *Chelydra serpentina* (Linnaeus, 1758) and has the leech *Placobdella ornata* (Verrill, 1872) as vector (Siddall and Desser, 1991).

The transmission occurs through gamonts being ingested by leeches fed on an infected turtle. The gamonts undergo gametogenesis and intracellular sporogony within intestinal cells of the leech (Telford Jr., 2009). According to Siddall and Desser (1991), the sporozoites can also infect tissues outside intestine, as anastomosing lacunae of the circulatory system, producing the primary meronts. That may contain up to 250 merozoites. These meronts release merozoites, considered the infective stage to the vertebrate host, which concentrate in the proboscis of the leech. In the turtle, the parasite can lodge in organs including the lungs, spleen, and liver and can be located at the peripheral blood with intraerythrocytic developmental stages such as merozoites, premeronts, meronts, immature and mature gamonts (Siddall and Desser, 1991, 1992; Davies and Johnston, 2000; Telford Jr., 2009).

In Brazil, some papers about *Haemogregarina* infection in chelonids were related to prevalence, morphological and molecular data (Soares et al., 2014; Picelli et al., 2015; Úngari et al., 2018; Correa et al., 2022). However, although leeches are considered a potential vector to *Haemogregarina* transmission to freshwater turtles, no analyses for these haemoparasites have been made in Brazil. The only information reported in literature is regarding the attachment of some *Unoculubranchiobdella* leeches in the Brazilian chelonids (Peralta et al., 1998; Armond, 2008; Christoffersen, 2008; Iwama, 2017).

Therefore, in the present study, we bring new insights on a possible leech vector of *Haemogregarina*, *Unoculubranchiobdella* sp. found attached to two species of freshwater

turtles, *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) and *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812).

2. Material and Methods

2.1 Specimen collection

The study was submitted and authorized by the “Ethics Committee on Animal Use” of the Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, (CEUA – UNESP, protocol number 1061) and by the Authorization and Information System in Biodiversity (SISBIO, process no. 61940).

The field works were carried out in Brazil, in 2017 and 2019, as reported in the table 1.

The fresh-water turtles were physically restrained with appropriate equipment following adequate norms (Portelinha et al., 2013). The animals were captured by fishing with barbless fishing hooks (Portelinha et al. 2013) and immobilized by the physical containment captured (Picelli et al., 2015). Then, the animals were visually inspected for ectoparasites. In eleven fresh-water turtles, two *P. expansa* and nine *P. unifilis*, it was possible to collect leeches attached to them (Table 1).

2.2 Morphological analyses

At least ten leeches were collected from each freshwater turtle. Of this total, some were stored in buffered formalin for histological analysis, others in 70% alcohol for morphological analysis and the remainder in absolute alcohol for molecular studies.

For scanning electron microscopy (SEM), the leeches were dehydrated in critical point dry with CO₂, and then assembled on a stub with carbon tape, gold overlaid, and observed in a Hitachi model s-2460N SEM (Hitachi, Tokyo, Japan). The type material has been

deposited in the National Helminth Collection (CNHE), Institute of Biology, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico.

For histopathological analysis, the leeches were cut longitudinally and transversally (the measurements can vary according to the position of the histological cut), fixed in 4% buffered neutral formalin, and stained with Hematoxylin-eosin Method (Eisen and Schall, 2000).

Leech specimens were identified using taxonomic keys and descriptions (Ringuelet, 1976, 1981, 1985; Sawyer, 1986) and through the comparison with voucher, specimens deposited in the *Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*.

For morphological analysis of the parasite stages, digital images were captured and measured using a compound microscope at 1000× magnification with the Leica software application suite LAS V3.8 (Leica Microsystems). Measurements are in micrometres (μm) comprising the parasite's length, width, and area (μm^2), with mean and standard deviation (means $\pm$ standard deviation) given. The morphology of hemogregarine developmental stages in the leeches was analyzed based on previous descriptions (Siddall and Dessler, 1991, 1992; Davies and Johnston, 2000; Davies et al., 2004; Telford Jr., 2009).

2.3 Molecular analysis

DNA was extracted from the leeches, individually, and from the blood and tissue samples of the turtles, following the blood protocol of the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The PCR assays were performed targeting the 18S rDNA of apicomplexan parasites using the HepF300 and Hep900 pair of primers, which amplifies 600 bp (Ujvari and Marques, 2005).

PCR amplification reactions were carried out in a final volume of 25 μ L, containing 1 μ L each of 10 pmol primers, 12.5 μ L of Master Mix MyFi™ Mix Bioline®, and 5 μ L of extracted DNA, with nuclease-free water accounting for the remaining volume. PCR amplification was performed on a Peltier 200 Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA) following the conditions of O'Dwyer et al. (2013). PCR products were subjected to gel electrophoresis at 80 V in a 1.5% agarose gel, stained with Gel Red, and observed using an ultraviolet transilluminator.

The amplified DNA fragments were then cloned using the TOPO™ TA Cloning™ (Invitrogen™) vector and used to transformation of dH10 β cells. Next, five to ten clones from each sample were amplified by PCR, with the same protocol, purified using KIT Wizard Plus SV Minipreps (Promega), and sequenced using the Big Dye Terminator Kit v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommendations. The sequencing reactions were carried out using the 3500 Genetic Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems). A consensus sequence was created from the forward and reverse assembled electropherograms using Geneious version 7.1.3 (Kearse et al., 2012).

The sequences from this study were compared with other isolates from hemogregarine parasites available on GenBank. The newly generated sequences of partial 18S rDNA were aligned using Geneious version 7.1.3 (Kearse et al., 2012) with MUSCLE algorithm implemented from within Geneious version 7.1.3 (Biomatters, www.geneious.com) and default settings with related sequences that appeared on Blastn search. The phylogenetic analyses were performed using both alignments using the Bayesian inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) methods. The ML analyses were performed using RAxML v.2.2.3 (Stamatakis, 2006) as described previously (Ferreira et al., 2008; Borghesan et al., 2013). The general time reversible (GTR) model of nucleotide substitution with a

proportion of invariable sites and gamma distribution was selected for the gene data sets. The GTR model was used in individual analysis of each gene as well as in the combined Bayesian analysis. The analysis was run for 1,000,000 generations with trees sampled every 100 generations using 4 chains and 25% of the early sample trees discarded as “burn-in”.

The isolates from adeleorinid parasites (Haemogregarinidae, Hepatozoidae, Karyolysidae, and Dactylosomatidae) available from GenBank were used to construct both trees. The resultant phylogenetic trees for both BI and ML analysis were edited in FigTree v1.4 (Rambaut, 2012). *Isospora wiegmanna* (KU180242) and *Laskesterella minima* (AF080611) were selected as outgroups. A pair-wise distance (p-distance) matrix was used to compare the interspecific divergence between species of *Haemogregarina* from turtles and leeches.

3. Results

Eleven fresh-water turtles, *P. unifilis* and *P. expansa*, were found positive for leeches (Figure 1). The leeches were identified as belonging to the genus *Unoculubranchiobdella* Peralta, Matos and Serra-Freire 1988, using taxonomic keys and descriptions (Ringuelet, 1976, 1981, 1985; Sawyer, 1986; Peralta et al., 1998). The main characteristic of this leech genus is the presence of five pair of simple digitiform gills, one anterior sucker and one large posterior sucker (Peralta et al. 1998). The same morphological structures were found in the leeches from this study (Figure 2).

The turtles, where the leeches were attached on, were screened for *Haemogregarina* parasites in an earlier study developed by Úngari et al. (2023). Through morphological and molecular analysis, the authors identified *Haemogregarina embaubali* Correa, Picelli, da Silva, Valadão, Hernández-Ruz and Viana, 2022, and six new species:

224 *Haemogregarina araguaiensis* Úngari, Silva and O'Dwyer 2023, *Haemogregarina*
225 *goianensis* Úngari, Silva and O'Dwyer 2023, *Haemogregarina brasiliiana* Úngari, Silva
226 and O'Dwyer 2023, *Haemogregarina unifila* Úngari, Silva and O'Dwyer 2023,
227 *Haemogregarina rubra* Úngari, Silva and O'Dwyer 2023 and *Haemogregarina tigrina*
228 Úngari, Silva and O'Dwyer 2023 (Table 2).

229 Besides, in six leeches it was possible to observe structures similar to post-esporogonic
230 meronts of hemogregarines located close to the gills and in the posterior sucker of the
231 animals, near to the circulatory system (Figure 3). The post-sporogonic meronts have a
232 rounded shape, with the mass of merozoites stained purplish and a well-developed
233 parasite's capsule evidenced. The morphometric values are available at table 2.

234 Moreover, some structures resembling to *Haemogregarina* stages were found in the
235 digestive cavity. It is possible to observe developmental stages similar to blood meronts
236 and gametocytes (Figure 4).

237 Regarding molecular diagnosis, from the total of leeches analyzed, three DNA of
238 haemogregarines were successfully amplified and sequenced targeting 18S rRNA gene.
239 Each sequence amplified with Hep300/Hep900 (~600) was compared with the others
240 from this study and with the sequences available on GenBank. Through gene similarity
241 comparison, it was possible to identify *Haemogregarina embaubali* Correa, Picelli, da
242 Silva, Valadão, Hernández-Ruz and Viana, 2022 with 99.80% of similarity with isolate
243 MW540607 and 100% of similarity with isolate OQ377233; *Haemogregarina goianensis*
244 with 99.80% of similarity with isolate OQ377555; and *Haemogregarina brasiliiana* with
245 100% of similarity with isolate OQ377129. In addition, the cloning process did not reveal
246 *Haemogregarina* mixed – infections in the leeches, proving that each leech was infected
247 by only one *Haemogregarina* species.

The phylogenetic analyses executed by Maximum Likelihood method and Bayesian inference (Figure 5) revealed well-supported branches. The isolates from this study clustered with *Haemogregarina* isolates from turtles of Neotropical Region, with the recently described species, *H. embaubali* [MW540607], *H. goianensis* [OQ377555] and *H. brasiliiana* [OQ377129]. The genus *Haemogregarina* is considered paraphyletic, and is divided in two main clades. One comprising two subclades, the subclade of *Haemogregarina* from Brazilian fishes and the subclade of *Haemogregarina* from South Africa, Canada, United States of America and Europe turtles. The second main clade comprises also two subclades, one of *Dactylosoma* isolates (basal subclade) from anurans and the other comprising *Haemogregarina* isolates of turtles from Neotropical Region and now, leeches from Brazil.

4. Discussion

It is known that the vectors of *Haemogregarina* are leeches, which are extremely susceptible to environment changes and pollution (Streit and Peter, 1978). The exposure of leeches to pesticides has negative effects on egg production, growth, feed and survival rate (Streit and Peter, 1978).

In Brazil, Campos-Brites and Ratin (2004) studied the presence of turtles and leeches in the Rio Uberabinha River in two areas, urban and agricultural. They reported a higher prevalence (37.5%) of *Haemogregarina* infecting *Phrynosoma geoffroanus* in an urban area, where leeches were found, in comparison to an agricultural area (15.4%), where no leeches were found attached to the turtles. Thus, the *Haemogregarina* prevalence can be related to the presence of leeches and the water quality of the environment.

In addition, hemogregarine infections may occur continuously, maintaining high levels of parasitaemia, with an environment amenable for the existence of the leeches (Picelli et

al., 2015). Besides, Siddal and Desser (1991), studying the prevalence and intensity of *Haemogregarina balli* on three species of turtles from Ontario, reported that the interval of significantly higher intensity of gamonts coincided with the major period of blood feeding by the vector, the leech *Placobdella ornata*.

Although there are some studies associating Brazilian leeches and tortoises, the authors only cited the presence or absence of this ectoparasite attached to the chelonians. Therefore, there is no description of hemogregarine developmental stages in the vector. Peralta et al. (1998) recorded *Unoculubranchiobdella* parasitizing *P. expansa* in Amazon region. Oliveira et al. (2018), during containment of the chelonians, reported no ectoparasite (leeches) found in the freshwater turtles. Picelli et al. (2015) also did not find any leeches attached to the freshwater turtles. On the other hand, Soares et al. (2014) reported the presence of leeches in *P. unifilis*, but no further analysis was performed. However, it is important to emphasize that the size of this genus of leeches is very small (3mm) and translucent, being easily camouflaged on the surface of the host. Therefore, when inspecting the host for the presence of these ectoparasites, all attention and caution is necessary, as they can easily go unnoticed.

The most well known *Haemogregarina* life cycle was described by Siddall and Desser (1991). The authors reported *H. balli* Paterson and Desser, 1976 infecting *Chelydra s. serpentina* and *P. ornata* from Ontario. In the leech, the post-sporogonic meront was formed in the endothelial tissues close to the circulatory system, with 250 merozoites observed. The meronts were similar to the ones found in this study.

Moreover, Telford Jr. et al. (2009) described a new hemogregarine, *Haemogregarina macrochelysi*, infecting the alligator snapping turtle, *Macrochelys temminckii* (Testudines: Chelydridae) from Georgia and infecting the *Placobdella* spp. leech. From the 8 sectioned leeches, no sporogonic stages were found, corroborating this study, but

two leeches have shown post-sporogonic meronts in the anterior third of the leech, also known as anastomosing lacunae of the circulatory system. The post-sporogonic meronts reported in this study have similar morphology to the description of *H. macrochelysi* in *Placobdella*.

Regarding the molecular data, the three successfully amplified sequences from the leeches were identified as *H. embaubali*, *H. goianensis* and *H. brasiliiana*, from *P. unifilis*, and the cloning process did not revealed *Haemogregarina* mixed – infections in the invertebrate host. In addition, the hosts (fresh-water turtles), where the leeches were found attached to, were also positive for the same *Haemogregarina* species. We cannot discard the possibility of amplification of the haemogregarines present inside the ingested host blood, instead of the parasites developed in the leeches. Nevertheless, our data can be considered as a strong indication of how the life cycle of hemogregarines occurs in Brazil, with freshwater turtles, *P. expansa* and *P. unifilis*, and leeches of the genus *Unoculubbranchiobdella*, their intermediate hosts (vertebrates) and definitive hosts (vectors), respectively. However, experimental transmission studies should be developed to confirm *Unoculubbranchiobdella* as *Haemogregarina* vector, with the identification of the other developmental stages in the leeches.

Therefore, this study brings the first report of *Haemogregarina* spp, infecting Brazilian leeches of the genus *Unoculubbranchiobdella* from Brazil, with morphological and molecular data.

5. Conclusion

Therefore, though morphological and molecular analyses, this study brings the first report of *Haemogregarina* spp, infecting Brazilian leeches of the genus *Unoculubbranchiobdella*, with post-sporogonic meronts found in the posterior sucker and close to the gills.

Statements and Declarations

'Declarations of interest: none'

Competing of Interests:

Compliance with ethical standards: All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed (IBAMA license 60640-1; CEUA-UNESP 1061). Financial assistance: R.J.S. is supported by FAPESP (2016/50377-1); CNPq (309125/2017-0); CNPq-PROTAX (440496/2015-2). L.P.U is supported by FAPESP (2018/00754-9; 2018/09623-4). L.H.O is supported by FAPESP (2018/09623-4).

Acknowledgments

We thank the team of the Laboratory for Teaching and Research in Wild Animals (LAPAS) and Non-governmental organization for the preservation of wild animals in Brazil (ONG PAS). We thank the team at the Laboratory of Helminthology (UNAM), especially Geraldo Torres-Carrera and Omar Lagunas-Calvo, for all their support with the identification of leeches.

6. References

- ARMOND, F.N., 2008. *Aspectos alimentares e do parasitismo em Podocnemis expansa de ambiente natural e criatório comercial do estado de Tocantins*. Universidade Federal do Tocantins (UFT), 167p. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente.
- BURRESON, E.M., 2007. Class Hirudinea. In: J. T. CARLTON, ed. *The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from central California to Oregon*. Berkeley: University of California Press, 303 - 309 pp.
- CAMPOS-BRITES, V.L. and RATIN, F.T., 2004. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha river. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol.96, pp. 273-281.
- CORREA, J.K.C., PICELLI, A.M., DA SILVA, M.R.L., VALADÃO, R.M., HERNÁNDEZ-RUZ, E.J. and VIANA, L.A., 2022. Phylogenetic analysis of chelonian hemogregarines reveals shared species among the Amazonian freshwater turtle *Podocnemis* spp. and provides a description of two new species of *Haemogregarina*. *Parasitology Research*, vol. 121, pp. 691–701 <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07405-3>
- CRISTOFFERSEN, M.L., 2008. A Catalogue of the Piscicolidae, Ozobranchidae, and Arhynchobdellida (Annelida, Clitellata, Hirudinea) from South America. *Neotropical Biology and Conservation*, vol.3, n.1, pp.39 – 48.

369 DAVIES, A.J., SMITH, N.J., HAYES, P.M., SEDDON, A.M. and WERTHEM, D.,
 370 2004. *Haemogregarina begemina* (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) – past, presente
 371 and future. *Folia Parasitologica*, vol.51, pp. 99-108.

372 DAVIES, A.J. and JOHNSTON, M.R., 2000. The biology of some intraerythrocytic
 373 parasites of fishes, amphibian and reptiles. *Advances in Parasitology*, vol.45, pp.1-107.

374 EISEN, R.J. and SCHALL J.J., 2000. Life history of malaria parasite (*Plasmodium*
 375 *mexicanum*): independent traits and basis variation. *Proceeding of Royal Society*, vol.267,
 376 pp. 793-799.

377 IWAMA, R.E., 2017. *Sanguessugas parasitas da ordem Rhycobdellida (Clitellata:*
 378 *Hirudinida) do território Brasileiro*. Instituto de Biociências da Universidade de São
 379 Paulo, pp. 134. Dissertação.de Mestrado do Instituto de Biociências.

380 KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., SONES-HAVAS, S., CHEUNG, M.,
 381 STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C.,
 382 THIERER, T., ASHTON, B., MEINTJES, P. and DRUMMOND, A., 2012. Geneious
 383 basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and
 384 analysis of sequence data. *Bioinformatics*, vol. 28, pp.1647–1649

385 MACCALLUM, W.G. and MACCALUM, G.A., 1918. On the anatomy of *Ozobranchus*
 386 *branchiatus* (Menzies). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol.38, pp.
 387 395-408

388 NETHERLANDS, E.C., COOK, C.A., DU PREEZ, L.H., VANHOVE, M.P.M.,
 389 BRENDONCK, L. and SMIT, N.J., 2020. An overview of the Dactylosomatidae
 390 (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae), with the description of *Dactylosoma*
 391 *kermi* n. sp. parasiting *Ptychadena anchietae* and *Sclerophrys guttaralis* from South

392 Africa. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, vol. 11, pp. 246–
 393 260.

394 OCEGUERA-FIGUEROA, A., 2012. Molecular phylogeny of the new world
 395 bloodfeeding leeches of the genus *Haementeria* and reconsideration of the biannulate
 396 genus *Oligobdella*. *Molecular phylogenetic and Evolution*, vol. 62, pp.508-514.

397 O'DWYER, L.H., MOÇO, T.C., PADUAN, K.S., SPENESSATTO, C., SILVA, R.J. and
 398 RIBOLLA, P.E.M., 2013. Description of three new species of *Hepatozoon*
 399 (Apicomplexa: Hepatozoidae), from Rattlesnakes (*Crotallus durrissus terrificus*) based
 400 on molecular, morphometric and morphologic characters. *Experimental Parasitology*,
 401 vol.135, pp. 200-207.

402 OLIVEIRA, J.P., ANDRÉ, M.R., ALVES JUNIOR, J.R.F., LUSTOSA, A.P.G. and
 403 WERTHER, K., 2018. Molecular detection of hemogregarines and haemosporidians in
 404 Brazilian free-living testudines. *International Journal for Parasitology: Parasites and*
 405 *Wildlife*. vol. 7, n. 1, pp.75-84. doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.01.008.

406 PERALTA, A.S.L, MATOS, E.R. and SERRA-FREIRE, N. M., 1998.
 407 *Unoculubranchiobdella expansa* gen. nov., sp. n. (Hirudinea:Ozobranchidae) parasito de
 408 *Podocnemis expansa* (Chelonia: Pelomedusidae). *Entomologia y Vectores*, vol.5, n.5,
 409 pp.161-177, 1998.

410 PICELLI, A.M., CARVALHO, A.V., VIANA, L.A. and MALVASIO, A., 2015.
 411 Prevalence and parasitemia of *Haemogregarina* sp. in *Podocnemis expansa* (Testudines:
 412 Podocnemididae) from the Brazilian Amazon. *Brazilian Journal of Veterinary*
 413 *Parasitology*, vol.42, pp.191-197.

414 PINTO, C., 1921. Classificação dos hirudíneos. *Brasil Médico*, vol.35, n.12, pp.169- 179

415 PORTELINHA, T.C.G., MALVASIO, A., PIÑA, C.I. and BERTOLUCI, J.A., 2013.
 416 Reproductive Allometry of *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) in
 417 Southern Brazilian Amazon. *Journal of Herpetology*, vol.47, n.2, pp.232-236.

418 RAMBAUT, A., 2012. FigTree v1.4.2. Available at:
 419 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed march 2022).

420 RICHARDSON, L.R., 1969. The family Ozobranchidae redefined, and a novel
 421 Ozobranchform leech Murray River Turtles (Class Hirudinoidea: Order
 422 Rhynchobdelliformes). *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, vol.94,
 423 pp.61-80

424 RINGUELET, R.A., 1985. *Fauna de agua dulce de la República de Argentina*,
 425 *Hirudinea*, Buenos Aires: FECIC. 321 p.

426 RINGUELET, R.A., 1981. Clave para el reconocimiento de los hirudíneos de México.
 427 *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma del México Serie*
 428 *Zoología*, vol.52, pp.89–97.

429 RINGUELET, R.A., 1976. Los caracteres endosomáticos de *Haementeria officinalis* De
 430 Filippi, diagnosis del género, y un estudio de antiguos ejemplares de *Nephelis mexicana*
 431 Dugès, 1876 (Hirudinea). In: R.A. RINGUELE, eds. *Fauna de agua dulce de la*
 432 *República de Argentina, Hirudinea*. Buenos Aires: FECIC, pp.129–136.

433 SAWYER, R.T., 1986. *Leech Biology and Behavior*. Clarendon Press, Oxford

434 SIDDALL, M.E. and DESSER, S.S. 2001. Transmission of *Haemogregarina balli* from
 435 painted turtles to snapping turtles through the leech, *Placobdella ornata*. *Journal of*
 436 *Parasitology*, vol.87, pp.1217-1218.

437 SIDDALL, M.E., 1995. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic
 438 revision of the haemogregarina complex. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol.42,
 439 pp.116-125

440 SIDDALL, M.E. and DESSER, S.S., 1992. Prevalence and intensity of *Haemogregarina*
 441 *balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in three turtles species from Ontaro
 442 with observations on intraerythrocytic development. *Canadian Journal of Zoology*,
 443 vol.70, pp.123-128.

444 SIDDALL, M.E. and DESSER, S.S., 1991. Merogonic development of *Haemogregarina*
 445 *balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregaridae) in the leech *Placobdella ornatta*
 446 (Glossiphoniidae), its transmission to a chelonian intermediate host and phylogenetic
 447 implications. *Journal of Parasitology*, v.77, n. 3, p. 426- 436.

448 SOARES, P., BRITO, E.S., PAIVA, F., PAVAN, D. and VIANA, L.A. 2014.
 449 Haemogregarina spp. in wild population from *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848 in
 450 Brazilian Amazonia. *Parasitology Research*, vol.113, pp.4499-4503.

451 SKET, B. and TRONTELJ, P. 2008 Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater.
 452 *Hydrobiologia*, vol.595, pp. 129— 137.

453 STAMATAKIS, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic
 454 analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, vol.22, n.21, pp.2688-
 455 90

456 STREIT, B. and PETER, H.M., 1978. Long-term effects of atrazine to selected freshwater
 457 invertebrates. *Archiv fur Hydrobiologie*. vol.55, pp.62-77.

THRALL, M.A., BAKER, D.C., CAMPBELL, T.W., DE NICOLA, D, FETTMAN, M.J.,
 LASSEND, E.D., REBAR, A. and WEISER, G., 2007. *Hematologia e Bioquímica*
Clínica e Veterinária. São Paulo: Roca.

TELFORD JR., S.R. 2009. *Hemoparasites of the Reptilia. Color Atlas and Text*. Florida:
 CRC Press.

UJVARI, B., MADSEN, T., OLSSON, M., 2004. High prevalence of *Hepatozoon* spp.
 (Apicomplexa: Hepatozoidae) infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) from Tropical
 Australia. *Journal of Parasitology*, vol.90, pp. 670-672.

ÚNGARI, L.P., SANTOS, A.L.Q.; O'DWYER, L.H., DA SILVA, M.R.L., FAVA,
 N.N.M., PAIVA, G.C.M., PINTO, R.M.C. and CURY, M.C. 2018. *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*,
 vol.117, 1535-1548.

Table 1: Data on fresh water turtles with leeches attached to them, collected from Goiás State, in 2017 and 2019.

Fresh-water turtles	N	Locality – City (State)	Coordenates	Year
<i>Podocnemis expansa</i>	1	Red River - Britânia (GO)	15°10'44.82"S, 51°9'58.48"O	2017
	1	Hotel São Pedro - Britânia (GO)	15° 14'30.80"S, 51°9'27.05"O	2019
<i>Podocnemis unifilis</i>	9	Red River - Britânia (GO)	15°10'44.82"S, 51°9'58.48"O	2017

*N: number of turtles with leeches attached to them.

Table 2: Measurements (mean $\pm$ standard deviation) of post-esporogonic meronts from Brazilian leeches, *Unoculubranchiobdella* spp., found attached to fresh-water turtles, *P. unifilis* and *P. expansa* specimens.

Turtle	Leeches <i>Haemogregarina</i>	Host <i>Haemogregarina</i> (Úngari et al. 2023) *	N	PL (μ m)	PW (μ m)	PA (μ m ²)
1. <i>P. expansa</i>	<i>H. embaubali</i>	<i>H. embaubali</i>	10	36.61 $\pm$ 10.27	22.04 $\pm$ 7.71	756.8 $\pm$ 50.03
2. <i>P. unifilis</i>	ND	<i>H. unifila</i>	7	15.10 $\pm$ 2.57	11.42 $\pm$ 2.17	125.45 $\pm$ 44.05
3. <i>P. unifilis</i>	ND	<i>H. rubra</i>	6	10.32 $\pm$ 0.71	6.95 $\pm$ 0.67	49.78 $\pm$ 3.80
4. <i>P. expansa</i>	<i>H. goianensis</i>	<i>H. goianensis</i>	10	18.28 $\pm$ 4.02	20.36 $\pm$ 5.63	272.33 $\pm$ 52.20
5. <i>P. unifilis</i>	ND	<i>H. tigrina</i>	6	22.94 $\pm$ 5.73	13.32 $\pm$ 1.66	307.37 $\pm$ 37.96
6. <i>P. unifilis</i>	<i>H. brasiliana</i>	<i>H. brasiliana</i>	10	43.35 $\pm$ 9.32	16.84 $\pm$ 3.28	586.9 $\pm$ 136.34

* ND: no DNA amplified by PCR. The same freshwater turtles specimens were screened for *Haemogregarina* through morphological and molecular diagnosis in the previously study developed by Úngari et al. (2023). Here it is possible to see which *Haemogregarina* species was found in the same turtle with the leech examined by this study. N: number of post-sporogonic meronts measured; PL: parasite length; PW: Parasite width; PA: Parasite area

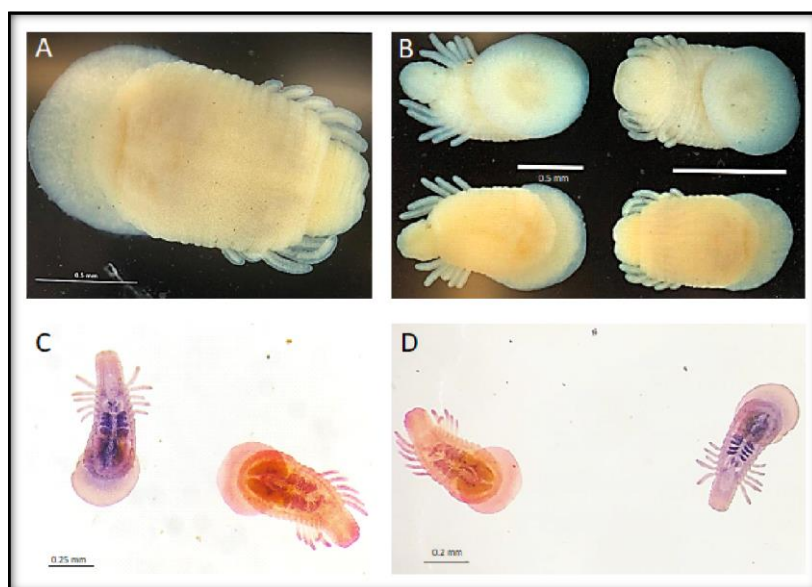


Figure 1. Leeches found attached to the fresh-water turtles, *P. unifiis* and *P. expansa*, from Goiás State Brazil. A,B) Morphological data on leeches, analyzed by conventional microscopy. C,D) Leeches stained by Delafield's Paracarmin - Hematoxylin Method.

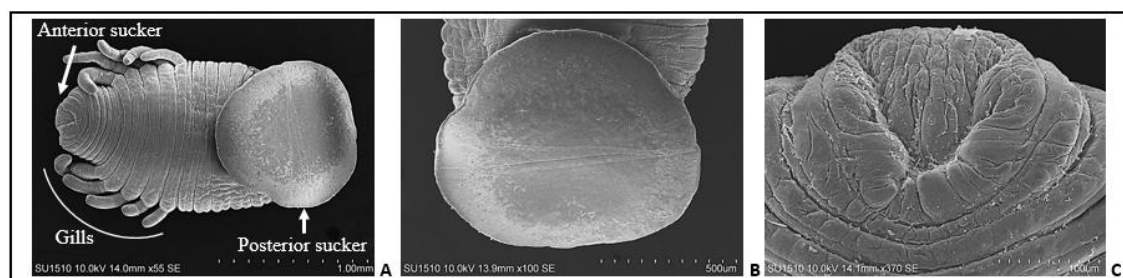


Figure 2. Leech's scanning electron microscopy (SEM). A) Leech analyzed ventrally. B) Posterior sucker of the leech. C) Anterior part of the leech, with emphasis on the oral sucker.

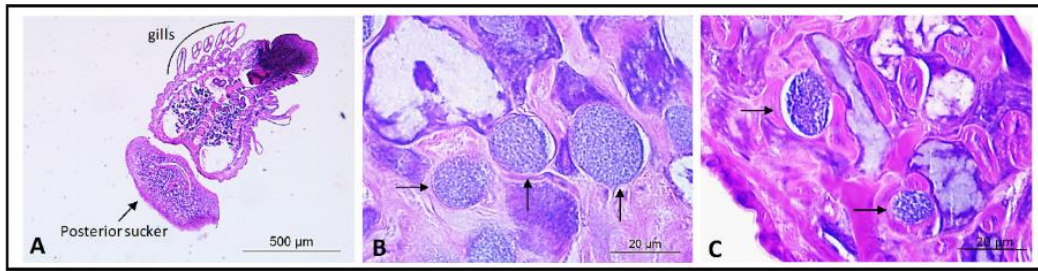


Figure 3. Histological slides of the leeches, stained in Hematoxylin –Eosin Method. A) Leech's anatomy showing the posterior sucker and gills. B,C) The presence of hemogregarine post-sporogonic merogony (arrows) found in the leech's gills and posterior sucker.

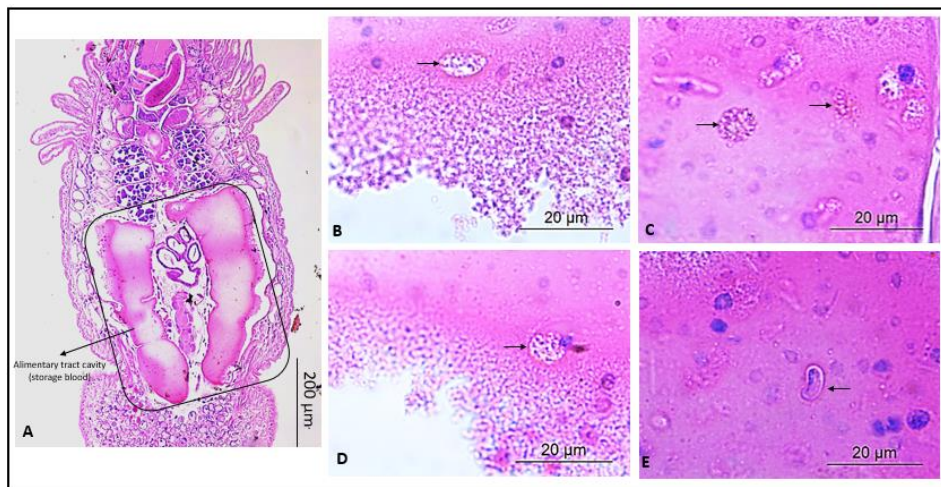


Figure 4. Histological slides of the leeches, stained in Hematoxylin –Eosin Method. A) Leech's anatomy showing the alimentary tract cavity with storage blood evidenced. B and C) The presence of *Haemogregarina* spp. developmental stages (arrows) found in the leech's alimentary tract. A-D) Developmental stages similar to blood merogony. E) Blood gametocyte.

Capítulo 2

Capítulo 2

IS THERE ONLY ONE SPECIES OF *Hepatozoon* INFECTING BRAZILIAN CAIMANS? INTEGRATIVE TAXONOMY UNVEILING THE PARASITE'S DIVERSITY

Manuscrito padronizado para as normas da revista *Parasitology Research*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Edward Charles Netherlands, Lúcio André Viana, André Luiz Quagliatto Santos, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

IS THERE ONLY ONE SPECIES OF *Hepatozoon* INFECTING BRAZILIAN CAIMANS?
INTEGRATIVE TAXONOMY UNVEILING THE PARASITE'S DIVERSITY

Letícia Pereira Úngari^{1*}, Edward Charles Netherlands², André Luiz Quagliatto Santos³, Lúcio André Viana⁴, Reinaldo José da Silva¹ and Lucia Helena O'Dwyer¹

¹Setor de Parasitologia, Departamento de Biodiversidade e Bioestatística, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista- UNESP, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Department of Zoology and Entomology, University of the Free State, PO Box 339, Bloemfontein, 9300, South Africa.

³Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁴Laboratório de Estudos Morfofisiológicos e Parasitários, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, AP, Brazil.

*Corresponding author: letspungari@hotmail.com

Acknowledgments

We thank the team of the Laboratory for Teaching and Research in Wild Animals (LAPAS) and Non-governmental organization for the preservation of wild animals in Brazil (ONG PAS).

Statements and Declarations

Declarations of interest: none

Abstract

Hepatozoon spp. are the most common haemoparasites reported from reptiles around the world, however, only six species have been described infecting crocodilians. In Brazil, *Hepatozoon caimani* Carini, 1909 is currently the only recognized species from the caiman hosts. This study provides new data on the diversity of species of *Hepatozoon* infecting *Caiman crocodilus* using molecular data and phylogenetic analysis,

with additional support provided through morphological data of developmental stages from host blood and tissue samples. Forty-four individuals were collected and screened for haemogregarines, and blood and tissue samples were analysed by light microscopy, with 31 (70.45%) infected. *Hepatozoon* spp. blood developmental stages included immature gamonts, mature gamonts and free gamonts. Additionally, merogonic developmental stages were found in the liver and spleen of infected hosts. Based on the morphological and molecular data, four species of *Hepatozoon* were identified. The first is *H. caimani*, and the others are three undescribed species.

Keywords: *Hepatozoon*, caimans, Brazil, diversity, PCR, taxonomy

Introduction

Haemogregarines (Apicomplexa: Adeleorina) are the most common and widely distributed reptilian haemoparasites (Telford Jr. 2009). These heteroxenous apicomplexan parasites (Apicomplexa: Adeleorina) are found infecting the blood cells of a wide range of vertebrate and invertebrate hosts and are known to parasitize reptiles from all orders (Telford 1984; Smith 1996; Telford 2008). Haemogregarines are currently divided into the families Dactylosomatidae Jakowska and Nigrelli, 1955, Haemogregarinidae Léger, 1911, Hepatozoidae Miller, 1908, and Karyolysidae Labbé, 1894 (Netherlands et al. 2018). Concerning crocodilian hosts, for many years all haemogregarines recorded were assigned to the genus *Haemogregarina* Danilewsky, 1885 (Apicomplexa: Adeleoria). However, Smith (1996) reassigned these species to the genus *Hepatozoon* (Miller, 1908), except for *Haemogregarina brasiliensis* Di Primo, 1925 from *Caiman yacare* found in Mato Grosso State, Brazil (Smith 1996; Duszynski et al. 2020).

Currently, the genus *Hepatozoon* has the highest number of species (Smith, 1996). However, according to a recent revision on coccidian parasites infecting crocodilians of the world (Duszynski et al. 2020), there are currently only six species described in crocodilian hosts, as follows: *Hepatozoon hankini* Simond, 1901 described from *Gavialis gangeticus* (Gmelin) in Asia (India); *Hepatozoon serrei* Phisalix, 1914 reported from *Paleosuchus trigonatus* (Schneider) in South America; *Hepatozoon petiti* (Thiroux, 1910) Hoare 1932 infecting *Crocodylus niloticus* Laurent in Africa; *Hepatozoon sheppardi* Santos Dias, 1952 found parasitizing *C. niloticus* in Africa; *Hepatozoon crocodilorum* (Borner, 1901) Smith, 1996 infecting *Alligator mississippiensis* (Daudin, 1801) and *Osteolaemus tetraspis* Cope from Europe and North America; and *Hepatozoon caimani* Carini, 1909, from Brazilian caimans, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802), *Caiman yacare* (Daudin, 1802), and *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758).

In Brazil, *H. caimani* is the only valid species of *Hepatozoon* in Brazilian caimans, with studies mainly focused on morphological descriptions, parasite life history, and occurrence. High prevalence of *H. caimani* has been reported, for example, 76.7% in *C. crocodilus* from the Amazon region and 71.4% of *C. yacare* were infected, and 76% – 79.5% of caimans from southeastern Pantanal (Viana & Marques 2005; Viana et al. 2010; Soares et al. 2017). This high prevalence could be related to the number of transmission routes available for *H. caimani* to its hosts. It was demonstrated that caimans could acquire *H. caimani* via both ingestion of infected mosquitoes (vector) or infected intermediate hosts, frog and fishes (Lainson et al. 2003; Pereira et al. 2014).

Telford et al. (2004) proposed the use of molecular tools as the best way to detect species of *Hepatozoon* and infer taxonomic relationships among the species that infect a wide range of caiman species. To date, only two studies (Bouer et al. 2017; Soares et al. 2017) targeting the 18S rRNA gene, have molecularly characterised species of *Hepatozoon* from caimans in Brazil, however, the sequences data from the two respective studies were not compared.

Therefore, this study aimed to compare available data with the new data collected during the present study, to highlight the diversity of species of *Hepatozoon* in Brazilian caimans, using molecular, phylogenetic, morphological, and morphometric analyses.

Material and Methods

Host collection

During fieldworks conducted from 2017 to 2020, Brazilian caimans were collected from Mato Grosso State, Brazil, in two localities: Boa Esperança Farm (14°46'44.82" S, 51°32'50.86" W) and Amado Batista Farm (14°28'39.27" S, 51°36'31.95" W) both in the municipality of Cocalinho, Mato Grosso state, Brazil.

The animals were submitted to physical restraint with the appropriate equipment, following standard procedure for this group of animals. The crocodilians were captured by active sampling using the hands or fishing rods with steel gut wire. Restraint was performed by sealing the eyes and mouth with transparent tape and tying the paws with rope (Viana et al. 2010; Santos et al. 2011). Before the blood collection, the animals were submitted to sexing, measured, and weighed for classification of the crocodilian age group, according to Velasco et al. (2009). They were subdivided into new hatchlings (length $\leq$ 25cm), juveniles (25-50cm), young adults (51-80cm), and adults ($\geq$ 80cm).

Blood samples were collected by puncture of the cervical paravertebral sinus using sterile and disposable syringes and needles (Zippel et al. 2001). Three thin blood smears were made and the remaining blood sample was stored in EDTA tubes and frozen at -10°C for further molecular analysis. The blood smears were fixed with absolute methanol and stained with 10% Giemsa Methylene Blue Eosin Merck® diluted in distilled water (pH 7.0) for 50 min, according to Einsen and Schall (2000). For histological slides, six caimans were euthanized using 50 mg/kg sodium thiopental (Tiopentax®) administered intracerebrally, following the guidelines of Sebben (2007) and the Animal Ethics Committee of Veterinary Medicine. The liver, spleen, heart, and kidney were fixed in 4% buffered neutral formalin and stained with hematoxylin-eosin (Eisen & Schall 2000).

All applicable international, national, and institutional guidelines for the ethical handling of animals were followed (SISBIO license 60640-1; CEUA-UNESP 1061).

Morphological study of the parasites

For morphological analysis of the blood and tissue parasite stages, digital images were captured and measured using a compound microscope at 100x magnification with the Leica software application suite LAS V3.8 (Leica Microsystems). Measurements are in micrometres (µm) comprising the parasite's length and width, with mean and standard deviation (means ± standard deviation) given. Parasitaemia was calculated with ~10⁴ erythrocytes examined per blood smear following Cook et al. (2009).

Molecular analyses

DNA was extracted from blood samples following the DNeasy Blood & Tissue Kit standard protocol (Qiagen, Valencia, CA, USA). Two PCR assays were performed targeting two different regions of the parasites 18S rDNA using the HepF300 and Hep900 pair of primers, which amplifies 600 bp (Ujvari and Marques 2005) and Hemo1 and Hemo2 pair of primers, which amplifies 900 bp (Perkins and Keller 2001). PCR amplification reactions were carried out in a final volume of 25 µL, containing 1 µL each of 10 pmol primers, 12.5 µL of Master Mix MyFiTM Mix Bioline®, and 5 µL of extracted DNA, with nuclease-free water accounting for the remaining volume. PCR amplification was performed on a Peltier 200 Thermocycler (MJ Research, Watertown, MA) (O'Dwyer et al. 2013). PCR products were subjected to gel electrophoresis at 80 V in a 1.5% agarose gel, stained with Gel Red, and observed using an ultraviolet transilluminator. The products of interest were purified by adding 2 µL

of ExoSAP-IT® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) to 5 µL of PCR product according to the manufacturer's recommendations. Amplicons were then sequenced, using PCR primers on a 3,500 Genetic Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems) and after BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1 (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. A consensus sequence was created from the forward and reverse-assembled electropherograms using Geneious version 7.1.3 (Kearse et al. 2012). For each positive animal, the newly generated sequences from HepF300/Hep900 and Hemo1/Hemo2 contigs were concatenated using Geneious version 7.1.3 (Kearse et al. 2012), forming a longer sequence of ~1200 bp.

The sequences from this study were compared with other isolates from haemogregarine parasites available at GenBank. The newly generated sequences of partial 18S rDNA were aligned using Geneious version 7.1.3 (Kearse et al. 2012) with the Muscle algorithm implemented from within Geneious version 7.1.3 (Bomatters, www.geneious.com) and default settings with related sequences that appeared on Blastn search. Phylogenetic reconstructions were performed using the Bayesian inference (BI) and Maximum Likelihood (ML) methods. The BI analysis was carried out using MrBayes implemented from the computational resource CIPRES (Miller et al. 2010), and the analysis was run with the nucleotide substitution model GTR+I+G. The Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm was run with 10,000,000 generations, saving one tree every 1000 generations. The first 25% of the trees were discarded as burn-in, and the consensus trees were estimated using the remaining trees. Bayesian posterior probabilities (BPP) cut-off was considered > 50%. The trees were visualized and edited using the FigTree v1.4 software program (Rambaut 2012). For the ML method, based on the Akaike information criterion (AIC) the Transitional model (Posada 2003), a discrete Gamma distribution (TVM+G) was selected. Phylogenetic analysis was inferred using PhyML (Guindon and Gascuel 2003) with 1,000 bootstrap replicates (>50%).

Sequences from other adeleorinid parasites (Haemogregarinidae, Hepatozoidae, Karyolysidae, and Dactylosomatidae) available from GenBank were used to construct both phylogenetic trees. The obtained phylogenetic trees for the BI and ML analyses were edited in FigTree v1.4 (Rambaut 2012). *Lankesterella minima* (Chaussat 1850) (GenBank: AF080611) and *Isospora wiegmanniana* Megía-Palma et al., 2015 (GenBank: KU180242) from the Order Eucoccidiorida were selected as out-group. A pair-wise distance (p-distance) matrix was used to compare the interspecific divergence between species of *Hepatozoon* sequences isolated from caimans hosts (Table 2).

Results

A total of 44 *Caiman crocodilus* was screened and 31 (70.45%) were infected with species of *Hepatozoon* spp., based on morphological screening of the blood smears. The parasitaemia ranged from 0.01% - 6% in the infected caimans. No ectoparasites, such as leeches, were observed infesting the animals. With regards to the prevalence and sex of the crocodilians, 75.86% (22/29) of the males and 63.63% (7/11) of the females were positive. The sex of four caimans was undetermined; of these, two were positive. Regarding age, 70.31% (23/29) of adults, 55.50% (5/9) of juvenile adults, and 50% (3/6) of juvenile crocodilians were found positive.

Molecular data

All 31 infected specimens had *Hepatozoon* spp. DNA successfully amplified using PCR and sequencing targeting the 18S rRNA gene. The newly generated and concatenated sequences were compared to each other and with other *Hepatozoon* isolates from crocodilians available on GenBank. An intraspecific identity of 98.35% – 100% was obtained for species of *Hepatozoon* isolated from caiman hosts in the present study and compared with sequences downloaded from GenBank (Table 1).

In the phylogenetic tree, two main clades were observed (Fig. 1). The first comprised species of *Dactylosoma* Labbé, 1894 and *Haemogregarina*, and the second comprised *Hemolivia* Petit, Landau, Beccam and Lainson, 1990, *Karyolysus* Labbé, 1894 *Hepatozoon* (mammals) and *Hepatozoon* (reptiles and amphibians) clades. Regarding the latter clade, two subclades were observed; one with species of *Hepatozoon* from snake hosts formed a sister group with the second larger subclade comprising isolates from crocodilian hosts and one isolate from a turtle host (MW246123).

The crocodilian clade forms a monophyly that represents a polytomy with seven-well supported branches (A-G). Branch A comprises sequences of *H. caimani* (MF322539, MF322538) downloaded from GenBank from *Caiman crocodilus yacare* Wermuth & Mertens, 1977, one isolate (MW246123) of the freshwater turtle, *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848, from Colombia, and two isolates from the present study (R46, R71) with 100% of gene similarity. Branch B is composed of two *H. caimani* isolates (KU495924, KU495925) from *C. yacare*, with 99% similarity between these isolates. Branches C and D comprise a single clade with 99.74% of similarity among them. In addition, Branch C comprises two identical isolates from the present study (R66, R117) forming a polytomy with branch D, that recovered 12 identical genotypes also from the present study. Branch E contains three isolates of *Hepatozoon* sp. (KJ413115,

KJ413113, and KJ413114) from *C. yacare* with 99.6% similarity (18S rDNA) among them. Furthermore, Branch F comprises 11 isolates from the present study with 100% gene identity. Branch G consists of four isolates from the present study with similarities ranging from 99.8% – 100%. Thus, the molecular data analysis revealed the presence of *H. caimani* and three unidentified species of *Hepatozoon* in Brazilian caimans from the present study. The first species and genotype (Branches C and D) contained intraspecific gene similarity of 99.74% (pair-wise distance of 0.006) and an interspecific gene similarity ranging between 98.35% – 98.96% as compared to the other genotypes from Brazilian crocodilians. The second species and genotype (Branch F) with an interspecific gene similarity ranging from 98.45% - 99.30% (pair-wise distance of 0.018 – 0.006) compared to the other isolates from crocodilians. The third species and genotype (Branch G) had an interspecific gene similarity ranging between 98.70% – 99.30% (pair-wise distance of 0.006 – 0.0014) as compared to the other isolates of Brazilian crocodilians.

Morphological data

The morphological data obtained from the blood smears of the different collected specimens revealed diverse morphological characteristics (Fig. 2 – 5). Moreover, initial merogonic developmental stages were detected in the histological slides of the spleen and liver, from the five-euthanized caimans (Fig. 3 and 4). The morphometric data are reported in Table 2.

***Hepatozoon caimani* (Carini 1909) Lainson, Paperna and Naiff 2003**

The morphological characteristics of *H. caimani* observed in the present study were: immature (small) gamonts with vacuoles, mature (larger) gamonts with vacuoles, mature gamonts, and gamonts with slender nuclear chromatin with a whitish cytoplasm (Fig. 2). Some of these characteristics were consistent with the original description by Carini (1909), for example, the elongated and slender mature gamonts and nuclei at midbody that may extend into the first quarter of the gamont. In addition, the immature and mature gamonts enclosed in a capsule with a sausage-like appearance, which was described by Lainson et al. (2003) were also reported in the present study. Parasitaemias were 0.5% and 6% in the two infected individuals. Furthermore, molecular characterisation supports the morphological data with the two isolates from the present study (R46, R71) sharing a 100% similarity (18S rDNA) with sequences of *H. caimani* (MF322539, MF322538) downloaded from GenBank from *C. crocodilus yacare*.

Hepatozoon n. sp. 1

Type-host: *Caiman crocodilus* (Linnaeus) (Reptilia: Crocodylia: Aligatoridae)

Type locality: Boa Esperança Farm, municipality of Cocalinho, Mato Grosso state (14°46'44.82" S, 51°32'50.86" W)

Other locality: Amado Batista Farm, municipality of Cocalinho, Mato Grosso state (14°28'39.27" S, 51°36'31.95" W).

Site of infection: Peripheral blood and tissue fragment of the liver and spleen.

Prevalence: The total prevalence found was 31.81% (14/44).

Parasitaemia: The parasitaemia ranged from 0.1% - 1%

Gene sequence: The fourteen 18S rDNA gene sequences obtained were deposited at GenBank with the number Accession of: [TO BE ADDED].

Type-material: 3 hapantotypes (1 blood smear, 1 histological slide from the liver, and 1 histological slide from the spleen) were deposited in the collection of the National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil [TO BE ADDED].

Note: The authors of the new taxon are different from the authors of this paper. Article 50.1 and Recommendation 50A of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN 1999).

Morphological and morphometric analysis (Fig. 3, Table 2)

All measurements of the different parasite stages are given in Table 2.

Free-gamonts (Fig. 3A): Long and thin parasites with nuclei located centrally. Nuclei present dense purplish chromatin.

Immature gamonts (Fig. 3B - E): three different morphological stages were observed: Stout immature gamonts (Fig. 3B) present cytoplasmic vacuoles, always displacing cell nuclei to one side, with rounded and dense nuclei located centrally of the parasite's body. In the other morphology, the gamonts have cytoplasmic and nuclei chromatin granules loosely arranged across the parasite cytoplasm (Fig. 3C) with or without vacuoles. The nuclear chromatin is stained in purple, while the granules are dark blue. It is possible to observe that the cell nuclei are always dislocated to one extremity. The third kind of immature gamonts (Fig. 3D), is characterized by gamonts with slender and spread chromatin nuclear through the cytoplasm, with vacuoles and whitish cytoplasm. A dark purple stain can be observed through the parasite's membrane and nuclei.

Mature gamonts (Fig. 3E-F): Two morphotypes could be evidenced; one with widespread nucleus (Fig. 3E) takes 2/3 of the parasite's body, with slender nuclear chromatin stained in purple. The parasite's membrane is stained in dark purple and vacuoles can or cannot be observed. The parasite's body ends are rounded and always displacing the cell nuclei to one side. A slightly bigger parasite's body characterizes the second morphotype (Fig. 3F), with smaller, rounded, and dense nuclei always dislocated to the curved extremity of the parasite's body. It is possible to observe a significant displacement of the nuclei cell and damaged structures of the erythrocyte in this case. The parasite's membrane is stained in the same color of the cytoplasm.

Meronts in the spleen and liver (Fig. 3G-I): The meronts were in different stages of development and it was possible to observe from the earlier stage, with only an internal mass reported (G), to a mature stage with merozoites (H, I). All the meronts presented an oval and rounded body, with the capsule stained in dark purple (H) or whitish (G, I).

Remarks 1

Hepatozoon n. sp. 1 contains gamonts with cytoplasmic granules and nuclear chromatin spread across the parasite's cytoplasm, and gamonts with slender and dispersed nuclear chromatin through a whitish cytoplasm and a capsule stained in dark purple. These characteristics were not reported for *H. caimani*, currently, the only recognised species of *Hepatozoon* described infecting Brazilian caimans so far.

According to Lainson et al. (2003), the gamonts of *H. caimani* are characterized by no sexual dimorphism and restricted to mature erythrocytes with extracellular parasites (free-gamonts) occasionally found. Also, they reported *H. caimani* in *C. crocodilus crocodilus* with free-gamonts measuring 20.7 µm long x 3 µm wide (16.2 x 2.5 µm – 25 x 4 µm). In addition, Soares et al. (2017) reported free-gamonts infecting *C. yacare* from the Pantanal region with both ends tapered and nucleus at the middle to the second quarter of the parasite's body. The measurements were: 23.891 ± 3.378 µm long $\times$ 2.809 ± 0.650 µm wide and area 50.689 ± 7.159 µm²; with nuclei measuring 7.027 ± 1.627 µm long $\times$ 2.752 ± 0.721 µm wide with an area of 18.002 ± 3.917 µm². *Hepatozoon* n. sp. 1 has different morphological characters, with the cytoplasm staining in light purple and nuclei always located at the centre of the parasite. Besides, the parasite's measurements differ from *H. caimani*, being longer and wider.

The other commonly found developmental stage is the mature gamonts. According to some authors (Viana et al. 2010; Lainson et al. 2003; Bouer et al. 2017; Soares et al. 2017) some plasticity can be observed (morphology variation), mainly regarding the nuclei and the parasite size. Bouer et al. (2017) reported

infection with *H. caimani* in *C. crocodilus* from the Pantanal region with gamonts showing rounded ends, with capsule, and nuclei centrally located or slightly dislocated by one end varying on sizing. The measurements were $12.9 \times 4.81 \mu\text{m}$ in length with an area of $53.2 \mu\text{m}^2$, and the nuclei measured $4.71 \times 5.67 \mu\text{m}$ in length with an area of $13.1 \mu\text{m}^2$. The gamonts reported by Soares et al. (2017) presented elongated morphology and were not curved with nuclei positioned terminally or centrally to the parasite's body, a parasitophorous vacuole (PV), could or could not be seen. The measurements size reported are $12.44 \pm 1.797 \times 4.11 \pm 1.00 \mu\text{m}$ in length and an area of $29.922 \pm 4.588 \mu\text{m}^2$ with nuclei of $5.895 \pm 1.674 \times 3.080 \pm 1.038 \mu\text{m}$ in length and an area of $16.150 \pm 3.445 \mu\text{m}^2$. According to Lainson et al. (2003), two types of gamonts were observed, a smaller one with evident parasitophorous vacuole evident and both ends rounded, with nuclei located centrally; and the longer and thinner one with dense nuclei located at the lateral of the parasite's body or, less frequently, with a widely dispersed reticulum. The larger intracellular gamont measured $12.15 \times 4.3 \mu\text{m}$. In the present study, *Hepatozoon* n. sp. 1 has two mature gamonts morphologies; the gamonts with spread nuclei occupying 2/3 of the parasite's body, with slender nuclear chromatin stained in purple can be related to the less frequently found reported by Lainson et al. (2003). The other morphotype from this study presents different nuclei, smaller, rounded, and always dislocated to the more curved size. In addition, the mature gamonts from *Hepatozoon* n. sp. 1 are longer with a larger average surface area as compared to the studies cited above.

Therefore, it is possible to notice that *Hepatozoon* n. sp. 1 has the most diverse morphological characteristics observed in the blood smears, and some of these developmental stages had never been reported in infect Brazilian caimans.

***Hepatozoon* n. sp. 2**

Type-host: *Caiman crocodilus* (Linnaeus) (Reptilia: Crocodylia: Aligatoridae)

Type-locality: Boa Esperança farm, municipality of Cocalinho, Mato Grosso state ($14^{\circ}46'44.82''$ S, $51^{\circ}32'50.86''$ W)

Other locality: Amado Batista farm, municipality of Cocalinho, Mato Grosso state ($14^{\circ}28'39.27''$ S, $51^{\circ}36'31.95''$ W), a road at the municipality of Araguaiana, Mato Grosso state ($14^{\circ}33'16.46''$ S, $51^{\circ}40'52.44''$ W), and Pindaíba river, municipality of Araguaiana, Mato Grosso state ($14^{\circ}35'47''$ S, $51^{\circ}43'9.59''$ W).

Site of infection: Peripheral blood and tissue fragment of the liver.

Prevalence: The total prevalence found was 27.27% (12/44).

Parasitaemia: The parasitaemia ranged from 0.01% - 6%

Gene sequence: The twelve 18S rDNA gene sequences obtained were deposited at GenBank with the number Accession of [TO BE ADDED].

Type-material: 2 hapantotypes (1 blood smear and 1 histological slide from the liver) were deposited in the collection of the National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil [TO BE ADDED].

Note: The authors of the new taxon are different from the authors of this paper; Article 50.1 and Recommendation 50A of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN 1999).

Morphological and morphometric analysis (Fig. 4 A-H)

All measurements of the different parasite stages are available in Table 2.

Immature gamonts (Fig. 4C): Encased in a visible PV, with nuclear chromatin loosely spread across the parasite's cytoplasm, or located to one side of the parasite (probably dependent on the timing of development), with a dark purple nuclear chromatin. Sometimes, cytoplasmic vacuoles could be observed. The gamonts have both ends rounded with one slightly more curved than the other. Displacement of the cell nuclei is always present.

Stout immature gamont (Fig. 4B): Characterized by lighter-purple nuclear chromatin loosely arranged and located towards one side of the parasite with the presence of cytoplasmic vacuoles. Both ends of the parasite rounded. The host cell nucleus displaced to one side of the erythrocyte. In some cases, it is possible to observe cytoplasmic granules.

Mature gamonts (Fig. 4D): Shape and size consistent with an evident parasitophorous vacuole. Both sides of the parasite are rounded, with one more arched than the other. The nuclei are always located on the arched side of the parasite, staining purple with an oblong shape, occupying half of the parasite's body. The parasite-curved side is always located close to the displaced host cell nucleus. The parasite's cytoplasm is stained light purple.

Free-gamonts (Fig. 4A): Long and thin body with cytoplasmic vacuoles and granules, nuclei staining purple and located centrally to the parasite's body.

Meronts (Fig. 4E-H): Different merogonic stages were observed in the liver and spleen tissues, such as micromeronts (E, F), meronts with granule-mass structure, considered as an early-stage development (G), and macromeronts (H). In the micromeronts and macromeronts, merozoites could be observed. Oval to rounded shapes were presented with a capsule not always evidenced.

Remarks 2

Hepatozoon n. sp. 2 has gamonts with nuclei spread through the cytoplasm. This morphological characteristic was not reported in *H. caimani*.

The free-gamonts of *Hepatozoon* n. sp. 2 are bigger than the ones reported by Lainson et al. (2003), measuring $20.7 \times 3 \mu\text{m}$ ($16.2 \times 2.5 \mu\text{m} - 25 \times 4 \mu\text{m}$), and Soares et al. (2017), measuring $23.891 \pm 3.378 \times 2.809 \pm 0.650 \mu\text{m}$ and area $50.689 \pm 7.159 \mu\text{m}^2$; with a longer parasite's body and nuclei. In addition, it is possible to observe cytoplasmic granules, a characteristic not commonly observed in *H. caimani*.

Bouer et al. (2017) reported infection of mature gamonts of *H. caimani* in *C. crocodilus*, with rounded ends, capsule present, and nuclei centrally located or slightly dislocated to one end, varying on size ($12.9 \times 4.81 \mu\text{m}$ with an area of $53.2 \mu\text{m}^2$, and the nuclei measured $4.71 \times 5.67 \mu\text{m}$ with an area of $13.1 \mu\text{m}^2$). Soares et al. (2017) detected gamonts with elongated morphology, not curved with nuclei positioned terminal or centrally to the parasite's body, a parasitophorous vacuole could or could not be seen ($12.449 \pm 1.797 \times 4.111 \pm 1.001 \mu\text{m}$ and an area of $29.922 \pm 4.588 \mu\text{m}^2$ with nuclei of $5.895 \pm 1.674 \times 3.080 \pm 1.038 \mu\text{m}$ and an area of $16.150 \pm 3.445 \mu\text{m}^2$). The mature gamonts of *Hepatozoon* n. sp. 2 are similar to those reported by Bouer et al. (2017) and Soares et al. (2017), only differing in measurements, being those from this study slightly bigger in parasites body and nuclei length comparison.

In comparison with the other newly described species in the present study, *Hepatozoon* n. sp. 1, some differences can be cited. First, *H. n. sp. 1* has many diverse morphological characteristics, being some of these characteristics not evidenced in *H. n. sp. 2*, as follows: gamonts with slender and dispersed nuclear chromatin through a whitish cytoplasm and a capsule stained in dark purple.

Regarding *Hepatozoon pettiti* (Thiroux, 1910) Hoare, 1932, two developmental stages were observed in the blood smears. Immature gamonts with $\sim 3\text{-}5 \mu\text{m}$ wide slightly ovoidal and mostly ungranulated, and mature gamonts with $8.3 \mu\text{m}$ long $\times 3.3 \mu\text{m}$ wide, refolded on themselves with the nuclei at one end. The presence of granules may slightly be related to the species from this study, but the measurements are different with no other reported gametocyte morphology reported. Moreover, Thiroux (1913) observed large meronts measuring $15\text{-}25 \mu\text{m}$ with eight merozoites, different from *Hepatozoon* n. sp. 2 meronts that measured $14 - 29 \mu\text{m}$ with 5 to 7 merozoites that were identified as macromeronts.

Hepatozoon n. sp. 3

Type-host: *Caiman crocodilus* (Linnaeus) (Reptilia: Crocodylia: Aligatoridae)

Type-locality: Boa Esperança farm, municipality of Cocalinho, Mato Grosso state (14°46'44.82" S, 51°32'50.86" W)

Site of infection: Peripheral blood and tissue fragment of the liver.

Prevalence: The total prevalence found was 9.09% (4/44).

Parasitaemia: The parasitaemia ranged from 0.03% - 0.9%

Gene sequence: The four 18S rDNA gene sequences obtained were deposited at GenBank with the number Accession of [TO BE ADDED].

Type-material: 1 hapantotype (1 blood smear) was deposited in the collection of the National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil [TO BE ADDED].

Note: The authors of the new taxon are different from the authors of this paper; Article 50.1 and Recommendation 50A of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN 1999).

Morphological and morphometric analysis (Fig. 5A-D)

All measurements of the different parasite stages are available in Table 2.

Trophozoite (Fig. 5B): small with one side more tapered than the other. The rounded purple nucleus is located at the center of the parasite. A slight displacement of the nuclei cell could be observed in some cases.

Stout immature gamont (Fig. 5C): characterized by the presence of cytoplasmic vacuoles, and in some cases, it is possible to observe some granules. The purple and round nuclei are dislocated to one side of the parasite, which has both extremities rounded. The displacement of the nuclei cell to one side of the erythrocyte is also evidenced.

Mature gamonts (Fig.5D): dense and rectangular nuclei, slightly displaced to one side of the parasite body, stained in dark purple. Sometimes, a small, rounded, stained-in-purple structure located at the opposing side of the parasite's nuclei was observed. The parasite has both ends rounded with a thin capsule evidenced, and always located close to the cell nuclei.

Free-gamonts (Fig. 5A): Thin and long, with both ends rounded. Granules and cytoplasmic vacuoles may be presented. The nuclei are oval and located in the middle of the parasite's body with dark-purple chromatin stained. Sometimes, it was possible to observe this type of gamont inside the erythrocyte.

Remarks 3

Hepatozoon n. sp. 3 has shown immature gamonts with rounded nuclei located at the center of the parasite with cytoplasmic vacuoles; and mature gamonts with dark-purple nuclei slightly dislocated to one side of

the body. These characters cited above were not reported in *H. caimani*, currently, the only recognised species of *Hepatozoon* described infecting Brazilian caimans so far.

In comparison to *H. caimani* described by Lainson et al. (2003) and Soares et al. (2017), the free-gamonts of *Hepatozoon* n. sp. 3 are smaller with a body length of 12.83 μm (n=25), characterized by oval nuclei located at the centre of the parasite, with cytoplasmic granules spread across the parasite cytoplasm.

The *Hepatozoon* n. sp. 3 mature gamonts have the smallest length, with similar morphology, despite the rounded and small structure located at the end opposite from of the nucleus.

In addition, gamonts with cytoplasmic vacuoles were commonly observed in the three new species and *H. caimani* reported in this study. In *Hepatozoon* n. sp. 1, the gamonts with vacuoles have cytoplasm stained in purplish and rounded nucleus centrally positioned at the parasite's body, stained in purple, while *Hepatozoon* n. sp. 2 have gamonts with a larger size, and nuclei displaced to one side of the parasite's body, and *Hepatozoon* n. sp. 3 is the smaller one and presents cytoplasmic granules.

Besides *H. caimani*, another haemogregarine species was described infecting Brazilian caimans, *Haemogregarina brasiliensis* Di Primio (1925), with only the description of intra-erythrocytes gamonts. Although most of the haemogregarines described from crocodiles worldwide were eventually transferred to *Hepatozoon* (Siddall 1995; Smith 1996), Lainson et al. (2003) suggested that this species should remain as *Haemogregarina* until its sporogonic cycle could be observed, because only the presence of oocysts with sporocysts with sporozoites could characterize the genus *Hepatozoon*. However, Pessoa et al. (1972) and Pessoa and De Biasi (1973), studying *H. caimani*, noted morphometric and morphological similarities between this species and *H. brasiliensis*, and raised the possibility that they may represent the same species, due to their hosts being conspecific. Moreover, *H. brasiliensis* gamonts (18-22 μm in length) have ellipsoidal, straight, and thin shapes and regular ends, and the nuclei are located to one side with ovoid shape, differing from the three newly described species by its longer gamonts and, also, the gamonts reported here have always curved-shaped with one end more pronounced than the other in some cases. Besides, the free-gamonts are 13-22 x 2-3 μm , with no morphological information about them.

Another morphological characteristic found in the three newly described species is the cytoplasmic granules, in some cases in the free gamonts and in other cases in the intraerythrocytic gamonts. The cytoplasmic granules were also reported in intraerythrocytic gamonts of *Hepatozoon crocodilinum* (Borner, 1901) Smith, 1996 from *Alligator mississippiensis* (Daudin) with two developmental stages observed, immature gamonts measuring $\sim 4.75 \mu\text{m}$ long and mature gamonts measuring $\sim 7-7.5 \mu\text{m}$ long,

both smaller than the gamonts observed from this study. In addition, according to Duszynski et al. (2020), although Smith (1996) transferred *H. crocodilorum* from the genus *Haemogregarina*, the presence of merogonic development in the peripheral blood of the reptiles and sporogonic development in leeches from the same host cannot be dismissed. Thus, suggesting that *H. crocodilorum* may still in fact belong to the genus *Haemogregarina* as regarded by Lainson et al. (2003) and Telford Jr. (2009). However, this requires further investigation.

Hepatozoon sheppardi (Santos Dias, 1952) Smith, 1996 was described in the Nile crocodile, from Africa. The gamonts were ovoid with capsules evidenced in some cases, measuring 8.3–9.9 x 2.3–3.0 µm, with elongated, narrow central, or dislocated to one side nuclei. The free-forms were also observed, with 22.4 x 1.8–2.7 µm measure. No merogonic and sporogonic development was reported. Thus, based on the blood smears stages, *H. sheppardi* differs from this study by the smaller gamont, although the morphology resembles some mature gamonts from this study.

The description of *Hepatozoon hankini* (Simond, 1901) Smith, 1996, unfortunately, gave very little information about measurement parameters and there has never been a photomicrograph or line drawing of any stage of this parasite in the literature, and it has not been reported since its original mention by Simond (1901). Thus, according to Duszynski et al. (2020), it must be relegated to a species inquired, as there is no proof it truly exists.

Hepatozoon serrei (Phisalix, 1914) Smith, 1996 described in *Paleosuchus trigonatus* (Schneider, 1801) from Bahia State, Brazil, has gamonts with a vermicular slightly curved form, equally rounded at both ends and measuring 12 x 5 µm. However, Duszynski et al. (2020) suggested that this species should be relegated to a species *inquirenda*, since there has never been a photomicrograph or line drawing of any stage of this parasite in the literature, and it has not been reported since its original mention by Phisalix (1914).

Therefore, since the only valid *Hepatozoon* species described in Brazilian caimans is *H. caimani* and the blood and tissue development stages were not similar to these species described in this paper, it is possible to affirm that they are three undescribed *Hepatozoon* species infecting *C. crocodilus*.

Discussion

Crocodylians are large, long-lived predators, with a generalist predatory behavior, being able to accumulate various trophically transmitted parasites through the consumption of a variety of prey over an extended

period (Tellez 2013; Duszynski et al. 2020). This ability can be related to the easy habitat transition to aquatic and terrestrial during their lifetime, increasing the variety of pathogens and their vectors' contact (Tellez 2013). Therefore, the understanding of the ecological and host-prey relationship among caimans during their life timing is essential for the parasite's prevalence and parasitaemia correlation. It is known that young animals, in their first year of life, feed essentially on invertebrates, particularly arthropods (Uetanabaro 1989; Viana et al. 2010). From the second year on, juvenile caimans start to feed on anurans and fishes, which form an important transmission phase through predation of intermediate hosts (Santos et al. 1996, Viana et al. 2010).

Viana et al. (2010) studying the prevalence and parasitaemia of *Hepatozoon* in a wild population of Brazilian caimans from the Pantanal biome, observed a significant variation between prevalence and age, with a greater prevalence in adults (100%) than juveniles (63%). Although without statistical analysis, this study corroborated with Viana et al. (2010), with adult caimans (70.31%) being more positive in comparison with juvenile caimans (50%). According to the authors, this can be related to the potential repeated infections throughout the life of these animals.

Moreover, the high prevalence of *Hepatozoon* in caiman populations from Brazil is usually reported. The prevalence of *Hepatozoon* spp. found in this study based on blood smears screening (70.45%) among *C. crocodilus* from Mato Grosso State was similar to *C. crocodilus yacare* (70.45%) from North-Pantanal, *C. crocodilus* (76.7%) in the Amazon region (Lainson, 1977), and *C. yacare* in western (71.4%) and southeastern (76-79.5%) Pantanal in Brazil (Bouer et al. 2017; Viana and Marques 2005; Viana et al. 2010; Soares et al. 2017).

According to Viana et al. (2010), *H. caimani* infection can persist in the animal for a long time, more than six months of monitoring. In this study, all animals were collected, inspected for ectoparasites, measured, weighed and identified (following the Brazilian identification standards for crocodilians imposed by IBAMA). Interestingly, in the present study, an adult male *C. crocodilus*, measuring 1.8 m, was collected (2017), and blood was extracted and released at the site of capture and one year later (2018), that same individual was randomly collected and had its blood extracted. Both sampling events revealed the infection with *H. caimani*, supporting the observations of longevity made by Viana et al. (2010); although it is not possible to confirm if the infection persisted for the entire year, or if the caimans had been reinfected in the wild.

The variety of morphological and morphometric forms of blood developmental stages and tissue merogony observed here, emphasizes the need and effectiveness of molecular confirmation and characterisation of hemogregarines revealing the presence of more than one species of *Hepatozoon*. In addition, some morphological characters that have never been described before for *Hepatozoon* in caimans were highlighted. In the literature, there are some reports of these morphological variations. According to Telford (2009), the plasticity of the blood developmental stages might be related to the host species. Other explanations were the adaptation of *Hepatozoon* species to different environments and hosts, or having low host specificity (Smith 1996; Telford 2009). However, with the use of molecular data, it was possible to observe significant intragenotypic variation among the isolates of *Hepatozoon* spp. in the present study, that could be linked to the morphological differences observed. Furthermore, the use of various phylogenetic tools (Maximum Likelihood method and Bayesian inference) has confirmed and shown sufficient and consistent separation of the various genotypes of the *Hepatozoon* spp. isolates from Brazilian caimans in the present study.

Therefore, this paper brings new insights into the diversity of *Hepatozoon* infecting caimans from Brazil, *Caiman crocodilus*, with the identification of three undescribed species, including the identification of *Hepatozoon caimani*.

Funding and ethics approval

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed (IBAMA license 60640-1; CEUA-UNESP 1061). R.J.S. is supported by CNPq (311635-2021-0). L.P.U. is supported by FAPESP (2018/00754-9; 2018/09623-4). L.H.O. is supported by FAPESP (2018/09623-4).

References

- Bouer A, André MR, Gonçalves LR, Luzzi MC, Oliveira JP, Rodrigues AC, Varani AM, Miranda VFO, Perles L, Werther K, Machado RZ (2017). *Hepatozoon caimani* in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia, Alligatoridae) from North Pantanal, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 26(3):352-358. doi: 10.1590/S1984-29612017041
- Cook CA, Smit NJ, Davies AJ (2009). A redescription of *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias, 1953 and some comments on *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) from Southern African tortoises (Cryptodira: Testudinidae) with new host data and distribution records. Folia Parasitol 56:173–179. doi: 10.14411/fp.2009.021
- Di Primo R (1925). Contribuição para o conhecimento das hemogregarinas do Brasil (Contributions to our knowledge of Hemogregarinas of Brazil). Sci Medic 3:574–576.
- Duszynski DW, McAllister CT, Tellez M (2020). The coccidian (Apicomplexa) of the Archosauria (Crocodylia: Eusuchia) of the world. J Parasitol 106:190-122. doi: 10.1645/19-73
- Eisen RJ, Schall JJ (2000). Life history of malaria parasite (*Plasmodium mexicanum*): independent traits and basis for variation. Proc R Soc Biol Sci 267:793–799. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1073>.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52:696-704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- Huson DH, Bryant D (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. Mol Biol and Evol 23 (2):254–267. doi:10.1093/molbev/msj030. PMID 16221896.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A, (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. J Bioinform 28: 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Lainson R, Paperna I, Naiff R D (2003). Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, de Biasi e de Souza, 1972 in the caiman *Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:103–113
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. GCE10 1–8. doi:10.1109/GCE.2010.5676129
- O'Dwyer LH, Moço TC, Paduan Kdos S, Spenassatto C, Da Silva RJ, Ribolla PE (2013). Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. Exp Parasitol 135: 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013>.
- Perkins SL, Keller AK (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific oligonucleotides. J Parasitol 87:870–876. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0870:PONSSR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0870:PONSSR]2.0.CO;2)

543 Pessoa SB, De Biasi P, De Souza D (1972). Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909), parasita
544 de jacaré-do-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex dolosus* (L. Arribáizaga). Mem Inst
545 Oswaldo Cruz 70:379-383.

546 Pessoa SB, De Biasi P (1973). Nota taxoⁿomica sobre cistos esporogônicos de algumas espécies de
547 *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasitas de serpentes brasileiras (Taxonomic note on
548 sporogonic cysts of some species of *Hepatozoon* (Sporozoa, Haemogregarinidae) parasites of Brazilian
549 snakes). Mem Inst Butantan 37:299–307.

550 Phisalix M (1914). Sur une hemogregarine nouvelle et ses kystes de multiplication chez *Caiman trigomatus*
551 Gray (On a new hemogregarine and its multiplication cysts in *Caiman trigomatus* Gray). Bull Mus Nat Hist
552 Natl (Paris) 7:97–98

553 Posada D (2003). Using MODELTEST and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. Cur Protoc
554 Bioinformatics 6:6.5.1 – 6.5.14. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0605s00>.

555 Rambaut A (2012). FigTree v1.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Edinburgh:
556 University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> .
557 Accessed 20 november 2022

558 Santos SA, Stoll MN, Pinheiro MS, Campos Z, Magnusson WE, Mourão G (2011). Diets of *Caiman*
559 *crocodilus yacare* from diferente habitats in Brazilian Pantanal. Herpetol J 6:111-117.

560 Sebben A (2007). Microdissecação fisiologica a fresco: uma nova visão sobre a anatomia de anfíbios e
561 répteis. In: Nascimento LB, Oliveira ME (ed) Herpetologia no Brasil II, 1st edn. Sociedade Brasileira de
562 Herpetologia, Belo Horizonte, pp. 311–325.

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

565 Simond PL (1901). Sur un he^matozoaire endoglobulaire, *Haemogregarina hankini*, parasite du gavial (On
566 an endoglobular Hematozoa, *Haemogregarina hankini*, parasite of the Gavial). C R Seances Soc Biol
567 (Paris), 53:183–185.

568 Smith TG (1996). The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J Parasitol 82:565-585.

569 Soares P, Borghesan TC, Tavares LER, Ferreira VL, Teixeira MMG, Paiva F (2017). *Hepatozoon caimani*
570 Carini 1909 (Adeleina: Hepatozoidae) in wild population of *Caiman yacare* Daudin, 1801 (Crocodylia:
571 Alligatoridae), Pantanal, Brazil. Parasitol Research 116(7):1907-1916. DOI: [10.1007/s00436-017-5467-1](https://doi.org/10.1007/s00436-017-5467-1)

572 Telford Jr SR (1984). Haemoparasites of reptiles. In Huff GI, Frye F, Jacobson ER (eds) Diseases of
573 amphibians and reptiles. Plenum Press, New York, pp.385-517. doi:10.1007/978-1-4615-9391-1_20

574 Telford Jr SR, Ernst JA, Clark AM, Butler JF (2004). *Hepatozoon sauritus*: a polytopic hemogregarine of
575 three genera and four species of snakes in northern Florida, with specific identity verified from genome
576 analysis. J Parasitol 90:352–358

- Telford Jr SR (2009). Hemoparasite of the Reptilian: Color Atlas and Text. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Tellez M (2013). A checklist of host parasite interactions of the order Crocodylia. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- Thioux A (1913). Les forms de reproduction par schizogonie et sporogonie d'*Haemogregarina pettiti* (Thioux 1910) chez *Crocodilus niloticus* (The forms of schizogony and sporogony reproduction of *Haemogregarina pettiti* (Thioux 1910) in *Crocodilus niloticus*). Bul Soc Pathol Exot 6:327–330.
- Uetanabaro M (1989) Hábito alimentar de *C. c. yacare* (Crocodylia, Alligatoridae) no Pantanal do Sul Matogrossense. Dissertação de Mestrado, Unesp, Rio Claro.
- Ujvari B, Marques EJ (2005). High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia, J Parasitol 90:670-672.
<https://doi.org/10.1645/GE-204R>.
- Velasco A, Colimine G, Sola R, Villarroel G (2009). Effects of sustained harvests on wild populations of *Caiman crocodilus crocodilus* in Venezuela. Interciencia 28 (9):544-548.
- Viana LA, Marques EJ (2005). Haemogregarine parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Caiman crocodilus yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) from Pantanal, Corumba, MS, Brazil. Braz J Vet Parasitol 14:173– 175.
- Viana LA, Paiva F, Coutinho ME, Lourenço-de-Oliveira R (2010). *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in wild caiman, *Caiman yacare*, from the Pantanal Region, Brazil. J Parasitol 96:83–88.
- Zippel KC, Lillywhite HB, Mladinich CR (2001). New vascular system in reptiles: anatomy and postural hemodynamics of the vertebral venous plexus in snakes. J Morphol 250:173–184.

Table 1 The shaded matrix (lower) shows the percentage of similarity of the 18S rDNA nucleotide sequences and the non-shaded matrix (upper) shows the p-distance (pair-wise distance) between the species of *Hepatozoon* sequences isolated from caiman hosts and compared to sequences available on GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7
1. Subclade A		0.010	0.006	0.006	0.014	0.013	0.010
2. Subclade B	98.98%		0.009	0.011	0.012	0.011	0.011
3. Subclade C	99.39 %	99.39%		0.002	0.016	0.018	0.014
4. Subclade D	99.48 %	99.47%	99.74%		0.016	0.015	0.012
5. Subclade E	98.78%	98.45%	98.54%	98.78%		0.014	0.010
6. Subclade F	98.78%	98.78%	98.35%	98.61%	98.61%		0.006
7. Subclade G	99.13%	99.13%	98.70%	98.96%	99.13%	99.30%	

613 **Table 2:** *Hepatozoon* spp. measurements (mean $\pm$ standard deviation) of blood and tissue stages in crocodilians, *Caiman crocodilus*, from Brazil.

<i>Hepatozoon</i>	Developmental stages	N	C (μm)	PL (μm)	PW (μm)	PA (μm^2)	NL (μm)	NW (μm)	NA (μm^2)
<i>H. caimani</i> (Fig. 3)	IGV	15		9.82 ± 2.01	5.45 ± 0.56	47.08 ± 2.53	3.74 ± 0.55	5.41 ± 0.38	11.02 ± 0.85
	GV	15		13.85 ± 0.99	5.10 ± 0.79	61.95 ± 3.99	5.35 ± 0.21	4.14 ± 0.61	12.67 ± 0.97
	MG	25		14.75 ± 1.85	5.71 ± 1.33	59.64 ± 2.14	4.18 ± 0.74	3.79 ± 1.00	16.01 ± 1.00
	GS	2		17.51 ± 0.58	6.43 ± 0.44	94.11 ± 1.80	5.85 ± 1.01	5.04 ± 0.92	18.07 ± 1.32
<i>H. n. sp. 1</i> (Fig. 4)	FG	25		24.71 ± 1.06	3.42 ± 0.96	59.40 ± 6.01	6.41 ± 0.42	3.09 ± 0.61	12.07 ± 1.33
	IGV	30		13.95 ± 1.21	4.77 ± 1.00	62.53 ± 8.05	5.45 ± 0.98	3.93 ± 0.76	12.75 ± 2.03
	IGG	15		13.87 ± 1.21	5.02 ± 0.99	64.78 ± 0.86	6.78 ± 1.72	4.87 ± 1.01	16.78 ± 3.05
	LIG	50		13.59 ± 1.43	3.54 ± 0.86	55.64 ± 13.36	5.98 ± 1.26	3.20 ± 0.48	13.30 ± 2.99
	MG1			15.57 ± 1.72	5.84 ± 0.98	77.93 ± 5.01	4.67 ± 0.87	4.05 ± 1.23	14.54 ± 2.00
	Mi	15	3.82 ± 0.41	9.26 ± 0.85	9.90 ± 1.30	73.58 ± 19.55			
	Miz	10		4.80 ± 0.94	1.20 ± 0.22	5.36 ± 1.02	0.82 ± 0.68	1.06 ± 0.41	1.67 ± 0.55
<i>H. n. sp. 2</i> (Fig. 5)	FG	15		25.28 ± 0.70	2.73 ± 0.56	61.38 ± 5.10	8.77 ± 0.65	2.73 ± 0.56	14.60 ± 1.75
	IG	20		14.70 ± 2.01	5.12 ± 3.0	70.88 ± 2.74	4.44 ± 0.71	4.77 ± 0.97	16.08 ± 2.54
	MG	40		13.47 ± 0.46	4.55 ± 0.40	55.75 ± 3.91	6.75 ± 0.62	2.79 ± 0.36	15.43 ± 1.78
	Mi	16	1.75 ± 0.31	10.81 ± 2.00	9.69 ± 1.68	76.93 ± 9.41			
	Ma (R109)	2	N - 4.45	$14.05 - 13.32$	$16.20 - 19.16$	$142.60 - 169.12$			
	Maz	5		7.56 ± 0.40	1.82 ± 0.25	11.03 ± 1.55	2.60 ± 0.38	1.68 ± 0.25	3.67 ± 0.59
	Ma (R115)	1		29.39	22.35	366.06			
	Maz	7		9.27 ± 0.65	3.39 ± 0.20	18.90 ± 3.20	3.80 ± 0.63	2.15 ± 0.19	9.22 ± 1.31
<i>H. n. sp. 3</i> (Fig. 6)	FG	25		12.83 ± 1.51	4.35 ± 0.33	51.66 ± 0.62	6.37 ± 0.92	3.33 ± 0.54	12.01 ± 1.85
	T	25		10.19 ± 0.83	3.88 ± 1.02	42.81 ± 3.78	5.93 ± 1.24	2.86 ± 0.91	12.04 ± 0.79
	IG	50		12.83 ± 1.51	4.35 ± 0.33	51.66 ± 4.02	6.37 ± 0.92	3.35 ± 0.54	14.97 ± 2.00
	MG	50		12.84 ± 0.34	4.88 ± 0.17	61.12 ± 2.09	6.46 ± 0.62	4.24 ± 0.43	15.04 ± 1.22

614 C: meront's capsule; N: number of parasites PL: parasite length; PW: Parasite width; PA: Parasite area; NL: Parasite nuclei length; NW: Parasite nuclei width; NA: Parasite
615 nuclei area. FG: free-gamonts. IGV: immature gamonts with cytoplasmic vacuoles. GS: gamonts with slender nuclear chromatin and whitish cytoplasm. GV: gamonts with
616 cytoplasmic vacuoles. MG: mature gamonts. LIG: Mature gamonts with a bigger nuclei and parasite's membrane stained in dark purple. MG1: slightly bigger gamont with
617 smaller nuclei. IGG: immature gamonts with cytoplasmic granules and nuclear chromatin sparse through the parasite's body. IG: immature gamont. T: trophozoites. Mi:
618 micromeront. Miz: micromerozoite. Ma: macromeront. Maz: macromerozoite. N: meronts capsule non-evidenced.

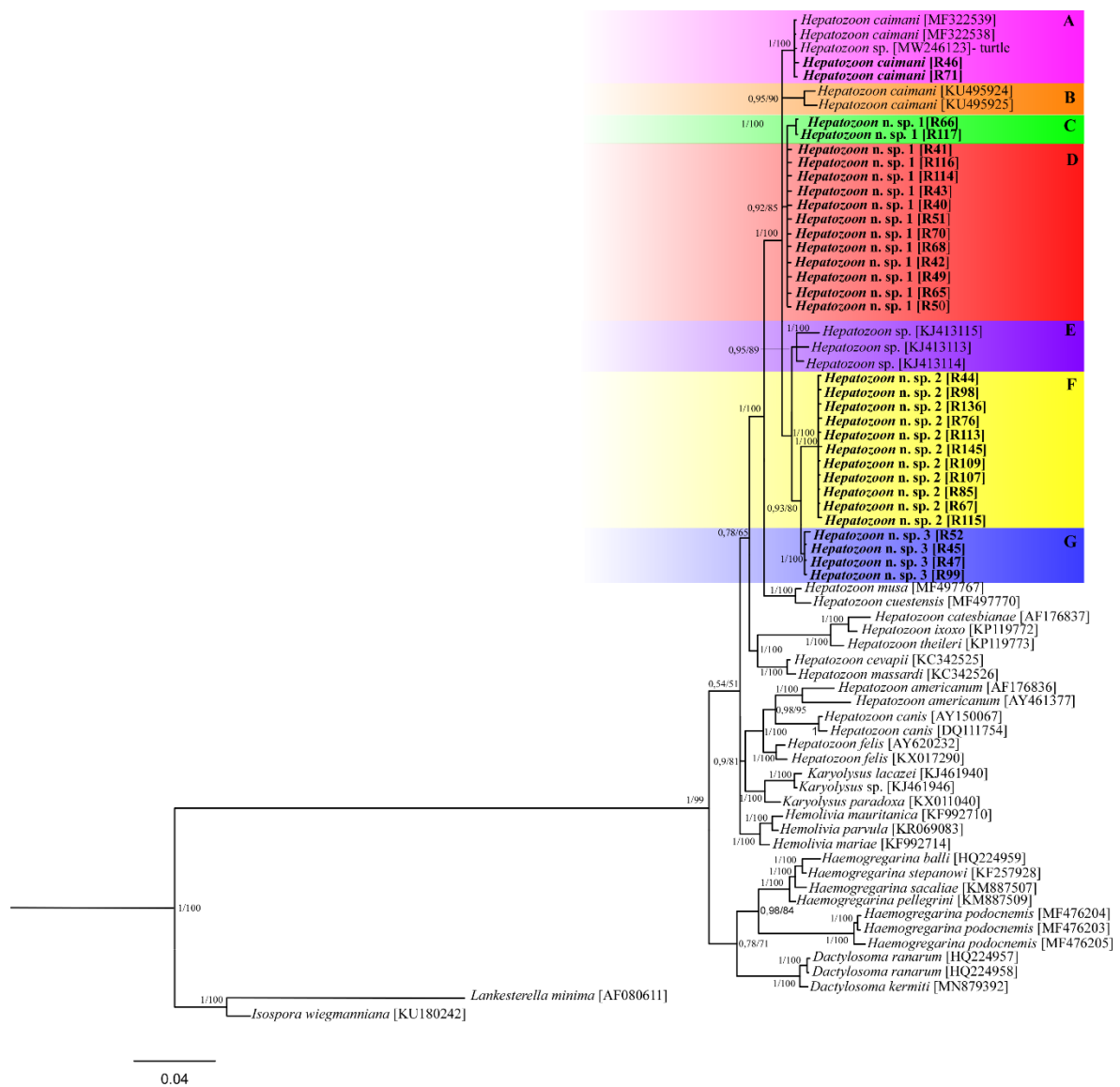


Fig. 1 Consensus phylogram of hemogregarines based on 18S rDNA sequences. The topology trees were inferred by Bayesian (BI) and Maximum Likelihood (ML) methods (represented by ML tree). The isolates *Isospora wiegmanni* (KU180242), *Lankesterella minima* (AF080611) and *Klossia helicina* (HQ224955) were used as an out-group.

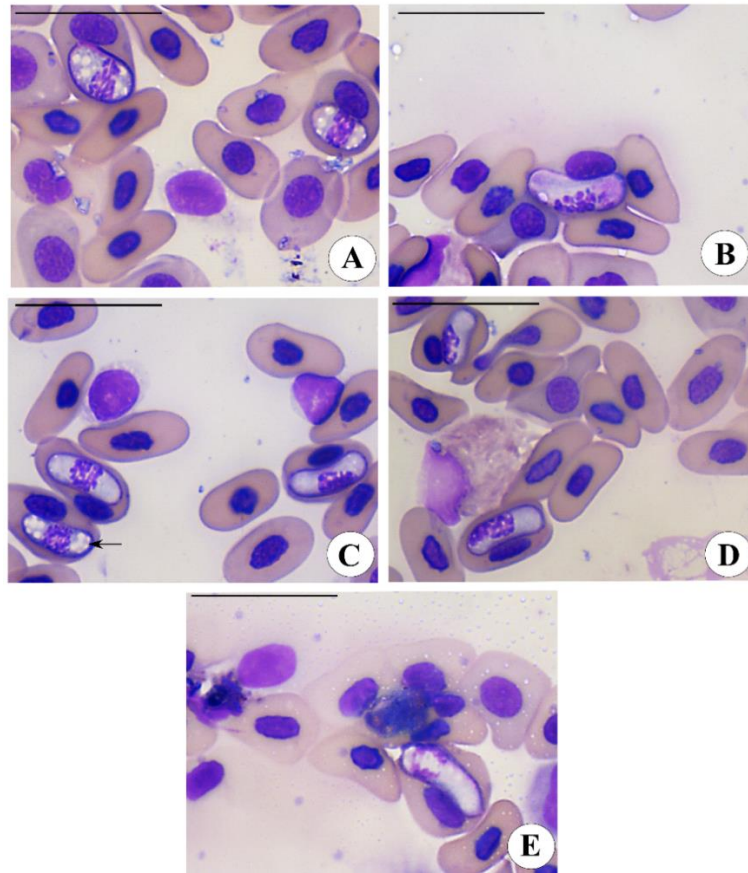


Fig. 2 A-E Morphological data on *Hepatozoon caimani* in two caimans blood smears from Mato Grosso State, Brazil. **A-B)** Gamonts with cytoplasmic vacuoles; **C-D)** Mature gamonts and gamonts with cytoplasmic vacuoles (arrow); **D)** Gamonts; **E)** Gamont with whitish cytoplasm and capsule stained in dark-purple. Scale bar: 20μm

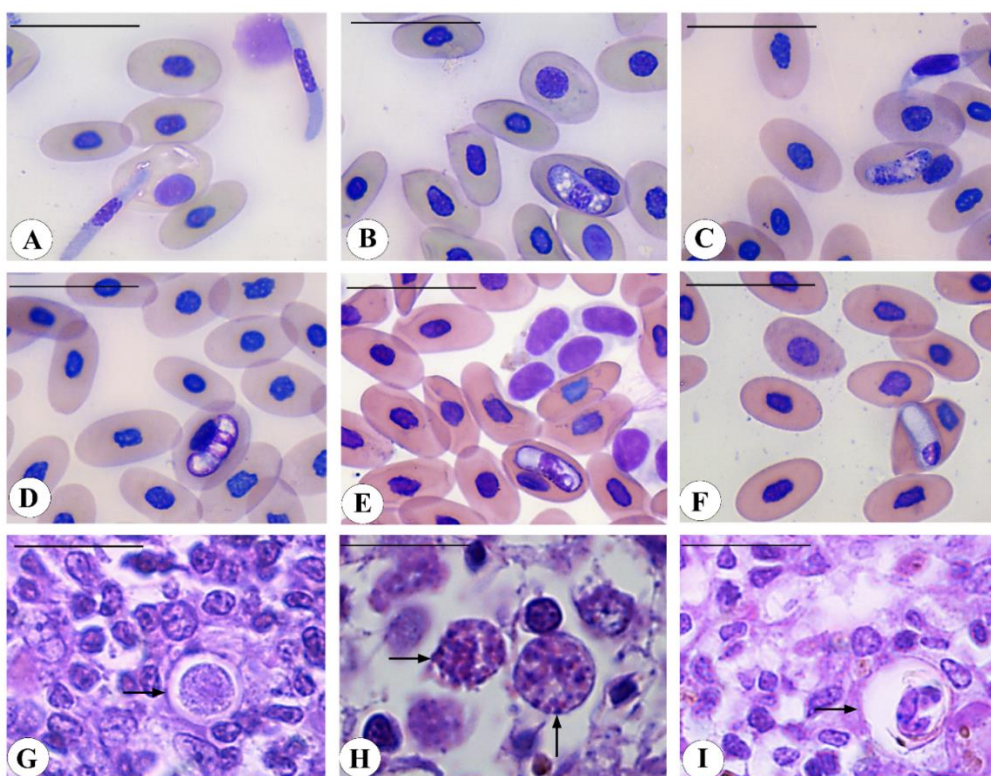


Fig. 3 A-I Morphological data on *Hepatozoon* n. sp. 1 in 14 caimans blood smears from Mato Grosso State, Brazil. **A)** Free-gamonts; **B)** Stout immature gamonts; **C)** Immature gamonts with cytoplasmic and nuclei chromatin granules loosely arranged across the parasites cytoplasm; **D)** Late immature gamonts with slender and spread chromatin nuclear through the cytoplasm; **E-F)** Mature gamonts; **G)** Early-stage meront in the caiman's spleen; **H-I)** Meronts with merozoites in the spleen. Scale bar 20µm.

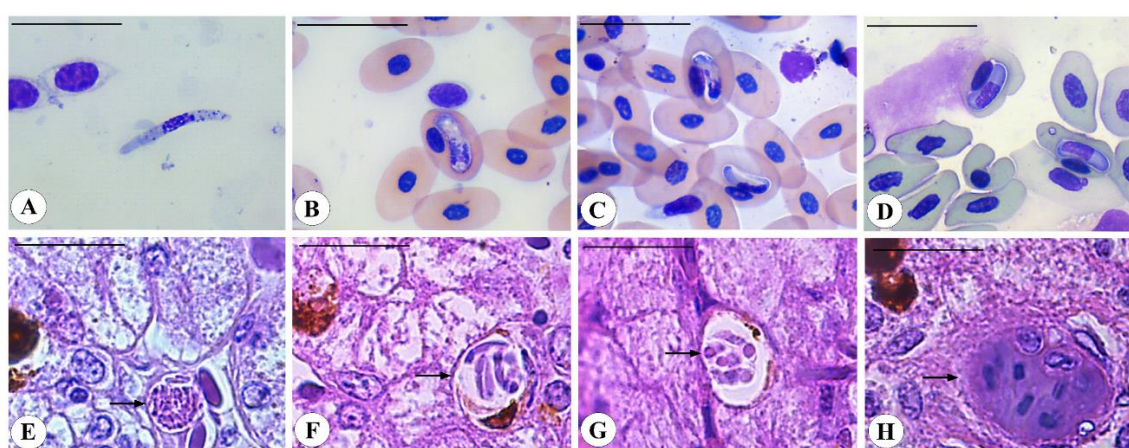


Fig. 4 A-H Morphological data on *Hepatozoon* n. sp. 2 in 11 caimans blood smears from Mato Grosso State, Brazil. **A)** Free-gamonts; **B)** Stout immature gamonts with cytoplasmic vacuoles; **C)** Immature gamont with dispersed nuclear chromatin; **D)** Mature gamonts; **E)** Micromeronts in the liver; **F)** meronts with merozoites in the liver; **G)** granule-mass structure meront, considered as an early stage of development; **H)** macromeronts with macromerozoites in the spleen. Scale bar 20µm

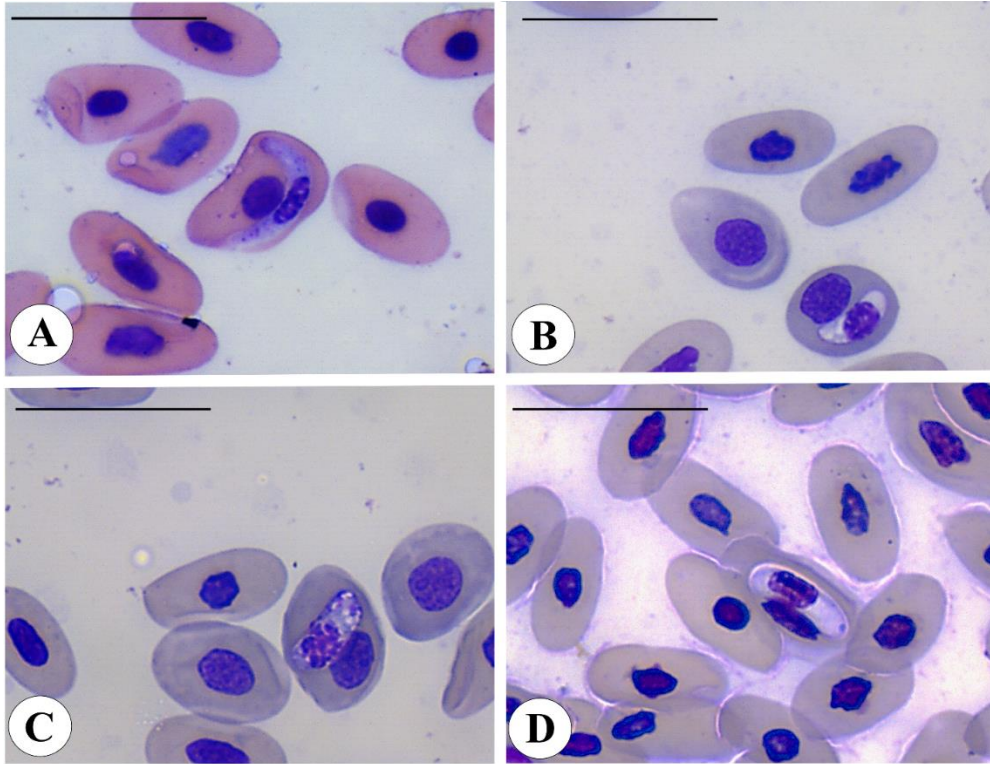


Fig. 5 A-D Morphological data on *Hepatozoon* n. sp. 3 in four caimans blood smears from Mato Grosso State, Brazil. **A)** Free-gamont infecting the erythrocyte; **B)** Trophozoite; **C)** Immature gamonts with cytoplasmic granules; **D)** Mature gamonts; Scale bar 20 μm.

Capítulo 3

Capítulo 3

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DIVERSITY OF *Trypanosoma* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDA: TRYPANOSOMATIDAE) INFECTING BRAZILIAN ANURANS.

Manuscrito padronizado para as normas da revista *Parasitology Research*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Lyslaine Hatsue Sato, Bruno Rafael Fermino, Carmen Silva de Almeida Takata, Marta Campaner, Erney Plessmann Camargo, Marta Maria Geraldine Teixeira, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer.

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR DIVERSITY OF *Trypanosoma* (KINETOPLASTEA:
TRYPANOSOMATIDA: TRYPANOSOMATIDAE) INFECTING BRAZILIAN ANURANS.**

Letícia Pereira Úngari^{1*}, Lyslaine Hatsue Sato², Bruno Rafael Fermino², Carmen Silva de Almeida Takata²,
Marta Campaner², Erney Plessmann Camargo², Marta Maria Geraldine Teixeira², Reinaldo José da Silva¹
and Lucia Helena O'Dwyer¹

¹Setor de Parasitologia, Departamento de Biodiversidade e Bioestatística, Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista- UNESP, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo,
Brasil.

*Corresponding author: letsprungari@hotmail.com

Acknowledgments

We thank the team of the Laboratory for Teaching and Research in Wild Animals (LAPAS) and Non-
governmental organization for the preservation of wild animals in Brazil (ONG PAS). We thank the Prof.
Dr. Robson Waldemar Ávila for the assistance with anurans correct identification.

Statements and Declarations

'Declarations of interest: none'

Abstract

Brazil is considered the most diverse country in the world in respect of anuran species. The Order Anura
has long been known to be infected with trypanosomes that are considered the most common hemoparasite
found in this group of vertebrates. Thus, this study aimed to bring morphological and molecular data on
Trypanosoma spp. infecting Brazilian anurans from Cerrado and Atlantic Forest. From 2018 to 2020,
Brazilian anurans from Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul and São Paulo States were screened for
hemoparasites. Blood samples were collected by cardiac puncture or by the cervical paravertebral sinus.

Three thin blood smears were made, fixed with absolute methanol and stained with 10% Giemsa. A part of the remaining blood sample was inoculated in tubes containing a biphasic medium (BAB-LIT) for hemoculture analysis. Then, the rest of the samples was stored in EDTA tubes and frozen at -10°C for further molecular analyses, targeting SSU rRNA and gGAPDH genes of Trypanosomatidae. From the 309 Brazilian anurans screened, 90 (29.12%) were positive for *Trypanosoma* spp.. In addition, this study recorded, for the first time, *Trypanosoma* spp. infection in eight anuran species. From the blood smears analysis, twelve morphotypes of *Trypanosoma* were observed and, in most cases, more than one morphotype was found per blood smears. Six hemocultures were able to be analyzed in vitro with Hi-5 cells, simulating the vector. Through phylogenetic analysis (ML and BI) it was possible to identify a great diversity of trypanosome species infecting the anurans from this study, the vast majority of the samples being mixed. Some isolates grouped into two pre-existing subclades (An03 and An01) and the rest were arranged into new clades that were named as Clade A to Clade D. The inclusion of our isolates in the phylogenetic analyses reinforces the complexity of evolutionary history of anuran trypanosomes. This study brings new data on positivity and diversity of anuran trypanosomes, including morphological and molecular data, with new species to be described in the future.

Keywords: *Trypanosoma*, gGAPDH, SSU rRNA, diversity, anurans, morphology.

Introduction

Trypanosomes are protozoan haemoparasitic flagellates that infect all classes of vertebrates (fish, amphibians, reptiles, birds and mammals) with lifecycles involving alternation between vertebrate and invertebrate hosts (Gruby 1843; Hoare 1972; Vickerman 1994; Stevens et al. 2001; Cavalier-Smith 2004; Hamilton et al. 2005; Simpson et al. 2006; Hamilton et al. 2007). These parasites have been recorded in several families of the order Anura throughout the world, with leeches and hematophagous dipterans as the vectors (Anderson and Ayala 1968; Bardsley and Harmsen 1973; Bartlett-Healy et al. 2009; Dessler 2001; Ferreira et al. 2007, 2008).

Anuran trypanosomes have the highest morphological plasticity within the genus *Trypanosoma* (Ferreira et al. 2007; Attias et al. 2016; Spodareva et al. 2018). In the review carried out by Bardsley and Harmsen (1973), around 60 species of anuran trypanosomes were recognized based on traditional parameters. In general, these parameters are vertebrate host, geographic origin and morphology (Dessler 2001; Zickus 2002; Lemos et al. 2008; Leal et al. 2009). Although the number of species descriptions of anuran

trypanosomes is high, most have not been cultivated and cryopreserved, thus preventing comparative molecular studies of new isolates with existing species.

Traditionally, the phylogenies of *Trypanosoma* spp. based on SSU rRNA and gGAPDH genes segregated species into different clades, which exhibit associations with hosts, geographical origin or host biology (Stevens et al. 2001; Hamilton et al. 2004; Marcili et al. 2013). Phylogenetic inferences have shown the clustering of all anuran trypanosomes in the most basal lineage of the genus *Trypanosoma*, the “Aquatic clade”. This clade includes trypanosome species isolated from fish, amphibians, turtles and platypus that are generally transmitted by leeches and phlebotomines (Stevens et al. 2001; Hamilton et al. 2004; Simpson et al. 2006; Ferreira et al. 2007, 2008).

In addition, phylogenetic studies based on SSU rDNA sequences of trypanosomes from Brazil, Europe, North America and Africa have shown that anuran trypanosomes constitute a monophyletic assemblage comprising distinct lineages of isolates (An01 – An08) associated with both host species and geographic origin, a finding that indicates that these trypanosomes have a complex evolutionary history. Also, molecular studies revealed great genetic diversity and complex phylogenetic relationships among the trypanosomes from Brazilian anurans, uncovering major phylogenetic lineages: An01, An02, An03, An05, An06 and An07 (Martin and Dessler, 1992; Lun and Dessler 1996; Viola et al. 2009; Lima et al. 2012; Fermino et al. 2013, 2015; Lemos et al. 2015; Votypka et al. 2015; Sato 2021). Some of these clades are related to host-parasite relationship. For example, in the clade An03, isolates from sandflies and anurans are positioned together (Ferreira et al. 2007; Sato 2021).

Therefore, anuran trypanosomes are excellent models for biogeographic and phylogeographic studies due to the wide distribution and biodiversity of their hosts as well as the high level of endemism, with different species living in distinct biomes and inhabiting specific habitats and niches. This study aimed to bring new data on *Trypanosoma* spp. diversity infecting Brazilian anurans from Cerrado and Atlantic Forest Biomes, based on morphological and molecular data.

Material and Methods

Ethical approval

All applicable international, national, and institutional guidelines for the ethical handling of animals were followed (SISBIO license 60640-1; CEUA-UNESP 1061).

Collection sites and anurans datas

During fieldworks conducted from 2018 to 2020, Brazilian anurans were collected from Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, e Goiás States, Brazil (Table 1).

The anurans were submitted to physical restraint. Before blood collection the animal were measured and weighted. Blood samples were collected by cardiac puncture or by the cervical paravertebral sinus using sterile and disposable syringes and needles (Zippel et al. 2001; Lemos and Souto-Padrón 2014). Three thin blood smears were made, fixed with absolute methanol and stained with 10% Giemsa Methylene Blue Eosin Merck® diluted in distilled water (pH 7.0) for 50 min, according to Einsen and Schall (2000).

A part of the remaining blood sample was inoculated in tubes containing a biphasic medium (BAB-LIT) consisting of 15% rabbit red blood cells mixed with 4.0% of Blood Agar Base overlaid with liquid LIT (Liver Infusion Tryptose) medium supplemented with 10% FBS. All positive cultures were transferred to monolayers of Hi-5 insect feeder cells (*Trichoplusia*) overlaid with Grace's medium, and incubated at 25 °C (Viola et al. 2008). After successive passages in Hi-5 cell cultures, the trypanosomes were seeded in LIT medium and incubated at 25 °C aiming mass cultivation for cryopreservation and DNA preparation. Then, the rest of the blood samples was stored in EDTA tubes and frozen at -10°C for further molecular analysis. Growth behavior and development in cultures were investigated using monolayers of Hi-5 cells cultivated in TC100 medium (supernatant and cells adhered to cover slides) as reported in previous studies (Lima et al. 2015; Zanetti et al. 2016). Smears were examined from logarithmic and stationary phase cultures, obtained with or without the monolayers of Hi-5 insect cells of eight selected isolates from anurans.

Light microscopy of trypanosomes

For morphological analysis of the blood parasite stages, digital images were captured and measured using a compound microscope at 100x magnification with the Leica software application suite LAS V3.8 (Leica Microsystems). Measurements are in micrometres (µm) comprising the parasite's length and width, with mean and standard deviation (means ± standard deviation) given.

Molecular analysis

DNA extraction was obtained from the blood, tissue or anurans cultures samples, all preserved in absolute ethanol. The DNA extraction used 100 µl of the samples, centrifuged to remove the excess ethanol, and suspended in 200 µl of DIGSOL solution containing 400 ng of pronase and 200 ng of RNase. The

preparation was incubated at 37°C overnight and the DNA precipitated with 400µl of ammonium acetate 4M, washed in ethanol, dried and suspended in 80µl of TE. The nested-PCR of SSU rRNA and gGAPDH sequence of trypanosomes was performed using primers and PCR conditions exactly as described previously (Noyes et al., 1999). Sequences from 5 - 6 clones of each PCR amplified sample were determined, screened for chimera by the RDP4 package (Martin et al. 2015), and compared to selected sequences representative of genetic diversity, deposited at GenBank.

SSU rRNA sequences were aligned using the Clustal W program, and alignment of gGAPDH was done using the Muscle program. Two alignments were created, one consisting of the SSU rRNA sequences and the other comprising gGAPDH sequences, both using *Trypanosoma* isolates from anurans, with the aquatic clade (fish clade) as an outgroup. Phylogenetic analyses were performed using two methods: Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI), using the programs RAxML v8.2 (Stamatakis, 2014), Mr. Bayes (Ronquist et al. 2012) and PAUP version 4.0a (Wilgenbusch and Swofford 2003).

Evolutionary relationships among isolates and their clades were performed by Network phylogenetic analysis, with support values of 500 replicates. The Mega 5.05 program (Kumar et al. 2016) was used to perform genetic distance analyzes using the Neighbor Joining method. The trees resulting from each analysis were visualized using the program FigTree v.1.3.1 (Rambaut 2012) and edited in Canvas.

Results

Positivity

From the 309 Brazilian anurans screened for *Trypanosoma* spp., belonging to 4 families, 13 genera and 34 species, 90 (29.12%) were found positive by blood smears analysis (Table 2).

Among the positive species, the highest number of positive individuals per species was for *Boana raniceps* (20) within the Hylidae Family, and *Leptodactylus latrans* (29) within the Leptodactylidae Family. Moreover, this study recorded, for the first time, *Trypanosoma* spp. infection in eight anuran species, six from Hylidae: *Boana caiapo* Pinheiro, Cintra, Valdujo, Silva, Martins, Silva & Garcia, 2018, *Boana lundii* (Burmeister, 1856), *Dendropsophus aff microcephalus*, *Dendropsophus anataliasiasi* (Bokermann, 1972), *Pseudis platensis* Gallardo, 1961, *Scinax x-signatus* (Spix, 1824); and two from Leptodactylidae: *Leptodactylus petersii* (Steindachner, 1864) and *Leptodactylus pustulatus* (Peters, 1870).

Morphological data

From the blood smears analysis, twelve morphotypes of *Trypanosoma* were observed, with more than one morphotype found per blood smears in most cases (Figure 1, table 3).

All morphotypes had one nucleus and one kinetoplast evident. The flagellum and the undulating membrane were not always visible, which may be related to the position of the trypanosome in the blood smear, the stage of development in which the parasite was found, or the characteristic of the species.

In this study, the morphotypes were divided into two groups (I and II). Group I includes morphotypes 1 to 3 that have an elongated shape and tapered ends, free flagellum, undulating membrane and kinetoplast located near the posterior end. Therefore, the group I is the one that most closely resembles the descriptions of classic trypomastigotes by Diamond (1965). Group II comprises morphotypes 5 to 12. They are characterized by round, elliptical, "ameboid" or leaf-shaped trypanosomes, with a kinetoplast adjacent to the nucleus, or within it, and an undulating membrane located externally or internally to the body of the parasite. In addition, the dimensions of group II can vary from small and rounded dimensions (morphotype 8: *T. tsunetzomiytai* - like), to giant and pleomorphic forms (morphotype 12).

According to Diamond's (1965) identification criteria, morphotype 1 (Fig. 1A, B – Group I) is similar to *Trypanosoma karyozenkon*-like, with the largest measurements of group I. The body is roller-shaped with longitudinal striations, evident undulating membrane and large free flagella. The second morphology (Fig. 1C, D – Group I) is considered the thinnest trypomastigote, with the kinetoplast located at the end of the posterior extremity, long free flagellum and slightly wavy membrane. The third morphotype (Fig. 1E, F) is *T. leptodactyly*-like, with S-shaped or roller-shaped bodies, multi-pleated wavy membranes, and the kinetoplast at the posterior end.

Morphotype 4 presents characteristics of both groups, being elongated roll-shaped body with ellipsoidal striations, bulging both ends, external undulating membrane, flagella not visible and kinetoplast always located at the most rounded end.

In relation to group II, morphotype 5 (Fig. 1 I, J) has an elongated shape, with one end more rounded than the other does. Ellipsoidal nucleus positioned in the center of the parasite, with an evident kinetoplast at the posterior end, external or internal undulating membrane, and absence of flagellum. The morphotype 6 (Fig. 1K, L) has a small dark-staining forms with rounded anterior end and a small free flagellum. The morphotype 7 (Fig. 1M, N), *Trypanosoma rotatorium*-like, is represented by large and wide bodies, fusiform nucleus, and with internal undulating membrane. The morphotype 8 (Fig. 1, O, P) was identified

as *Trypanosoma tsunetzomiytai*-like, although it also resembles *Trypanosoma chattoni* with smaller measurements and an ellipsoidal shape with clear and regular edges. The morphotype 9 (Fig.1Q) is similar to *Trypanosoma chattoni*-like, differing from the morphotype 8 by the rounded, irregular and larger body shape. In addition, the morphotype 9 has clear borders, central and small spherical nucleus with kinetoplast attached to it. Morphotype 10 (Fig. 1 R, S) has large and irregular shape. Morphotype 11 (Fig. 1T) is similar to *Trypanosoma loricatum*-like, with elliptical shape and only nucleus and kinetoplast evidenced, absent flagellum and undulating membrane. Morphotype 12 (Fig.1 U, V) has the largest size among the 12 morphotypes, with an elongated body, without a well-defined shape, and the kinetoplast is often located within the nucleus.

Regarding the blood samples added in biphasic medium for cell culture, 10 samples were positive and showed effective development in the initial phase of multiplication, being cryopreserved for later analysis. From this total (10), six (TCC 3227; TCC 3228; TCC 3229; TCC 3230; TCC 3232 and TCC 3233) were able to be analyzed in vitro with Hi-5 cells, simulating the vector, with initial multiplicative phase, logarithmic-phase and stationary phase observed. From all cultures, the initial multiplicative phase was characterized by trypomastigotes, from recently collected blood, and small-rounded bodies, sometimes clustered into rosettes. The log-phase was characterized by the presence of pleomorphic epimastigotes varying in shape, body size and flagellum size, sometimes, with the small-rounded bodies present. In the last phase (stationary phase), it was possible to observe the trypomastigotes and larger epimastigotes, both with a well-developed undulant membrane.

Molecular data

Of the 90 anurans previously diagnosed positive by the analysis of blood smears, it was possible to extract DNA from 80 samples, since some individuals were too small and/or it was not possible to collect the blood and tissue for molecular analysis, being only blood smears available. From the 80 samples with DNA extracted, 50 were successfully amplified with the gGAPDH gene, and 20 with the SSU rRNA gene. In addition, up to six clones were sequenced for each sample. Through phylogenetic analysis (ML and BI) it was possible to identify a great diversity of trypanosome species infecting the anurans, the vast majority of the samples being mixed.

From the gGAPDH gene, some isolates grouped into two pre-existing subclades (An03 and An01) and the rest were able to arrange into new clades, of which were named as Clade A to Clade D (Figure 2). In regard

of cultures, one isolate of *L. latrans* from Cerrado (TCC 3230) clustered in Clade An03 along with vector isolates (sandflies). The cultures of two *L. latrans* and one *L. labyrinthicus* samples (TCC 3228, TCC 3232 and TCC 3233, respectively) have shown 99.8% - 100% genetic similarity among them and clustered in the new Clade D. Cultures from two *L. latrans* samples (TCC 3227 and TCC 3229) clustered in Clade An01. The TCC 3231 culture from *T. typhoni* clustered in the new Clade B. Lastly, the cloning of the *T. typhoni* (TCC 3226) culture was shown to be mixed through cloning, with isolates located in Clade D and An01. The new clade A was arranged with only isolates amplified directly from blood samples, without observed cultures. Regarding the SSU rRNA gene, PCR and cloning resulted in similar results. Although with less amplified isolates, one isolate (A270) grouped in Clade An05, performed directly from blood without culture cultivation; and no samples from the Clades A and C were detected.

From the eight species in which *Trypanosoma* spp. were detected for the first time in the blood smears, in only three the DNA could be extracted directly from the blood samples to perform the phylogenetic analysis. The tripanosomes from four *P. platensis* specimens (A82, A83, A85 and A119) had their DNA amplified and grouped in the clades An03, D and An01. One isolate (A119) had mixed-infection, with clones clustering in An03 and D clades; and the clones from another one (A85) clustered in D and An01 clades. From Two *S. x-signatus* specimens (A230 and A241) the trypanosomes had their DNA amplified and grouped in the clades A, D, An01 and An03, being one isolate with mixed-infection, with clones clustering in A, D and An01 clades. In One *L. pustulatus* specimen the DNA was successfully amplified and all the clones grouped in the B clade.

Integrative taxonomy

• *An03 Clade*

The An03 clade harbors *Trypanosoma* isolates from Brazilian anurans (Leptodactylidae, Bufonidae and Hylidae) and sandflies. From this study, 14 isolates (13 directly amplified from blood samples and one from cell culture –TCC 3230) clustered in this Clade (Table 4). The phylogenetic analyses targeting gGAPDH (Figure 3) and SSU rRNA (Figure 4) genes revealed close results, with two main-clades formed. The first comprising sandflies isolates from the Amazonia Biome (TCC120, TCC101 and TCC887), anura isolate, *L. chaquensis* (TSC250), from Atlantic Forest biome; and the isolates from this study (Leptodactylidae and Hylidae anurans) from the Atlantic Forest and Cerrado biomes, of which the genetic similarity and pairwise distance matrix are available in table 5.

The other clade gathered anurans (Bufonidae and Leptodactylidae) and sandflies isolates, all from Amazonian Biome. Moreover, in the both genes analyses, the TCC 103 was located in an isolated branch from An03 clade.

In regards to SSU rRNA phylogenetic analysis, an external branch into An03 Clade was observed comprising two anuran isolates (Hylidae) from Pantanal Biome. In addition, one isolate from this study (A270), directly amplified from the blood sample, clustered into An05 Clade. This clade is characterized by the presence of isolates from *Corethrella* sp. insect, *Trypanosoma chattoni* isolate from anuran (Ranidae), and other anurans isolates from United States of America, Colombia, Panama and Brazil.

Regarding the trypomastigotes morphologies found in the anuran's blood smears that clustered in this group, six were observed with mixed infections per anuran: morphotype 1 (Fig. 5D), morphotype 2 (Fig. 5E), morphotype 3 (Fig. 5F, G), morphotype 7 (Fig. 5B), morphotype 9 (Fig. 5A) and morphotype 12 (Fig. 5C). The morphotype 9 (*T. chattoni*-like) was observed in the blood smears of *Leptodactylus latrans* from Cerrado biome, identified as isolate A270, that clustered in An05 clade with SSU rRNA gene. This An05 Clade is recognized by harbors the species *T. chattoni* (KT765865). Moreover, from each anuran specimens, at least two morphologies were observed.

In addition, one hemoculture (TCC 3230) clustered in the An03 clade, and the morphological data observed during the cell culture development were spheromastigotes, which often clusters into rosettes, epimastigotes and two trypomastigotes morphologies. In the primary phase of the culture (Fig. 5H), small rounded bodies, known as spheromastigotes, were observed free, in rosettes or inside Hi-5 cells, and some remaining trypomastigotes stages from the anuran's blood. The log-phase (Fig. 5B) with epimastigotes (24.22 ± 2.03 μ m long, 3.36 ± 0.44 μ m wide and area of 13.10 ± 4.83 μ m²) and the small rounded forms. The last phase, stationary phase (Fig. 5J, K), with trypomastigotes (38.09 ± 5.77 μ m long, 4.60 ± 1.03 μ m wide and area of 27.99 ± 9.30 μ m²) and epimastigotes.

● **Clade A**

The clade A harbors five *Trypanosoma* isolates from this study, directly amplified from blood samples. The isolates are from Hylidae anurans that were collected from Cerrado and Atlantic Forest biomes (Table 6). In the phylogenetic analyses with gGAPDH gene, the Clade A clustered after An04 and before Clade B. This clade A has shown great branch support (88 / 0.92). The pair-wise distance among the five isolates ranged from 0.02 – 0.00 (Figure 6 and Figure 7).

Although the blood smears from this Clade A presented three morphotypes, morphotype 5 (Fig. 8A-C), morphotype 8 (Fig. 8F) and morphotype 9 (Fig. 8 D, E), only the morphotype 5 (Fig. 8A, B) was observed in all the blood samples. Therefore, perhaps this morphotype can be considered as the type morphology for this clade.

No isolates from hemoculture were obtained in this clade.

• **Clade B**

The Clade B comprises isolates of Hylidae, Microhylidae and Leptodactylidae anurans from Amazônia, Cerrado, Pantanal and Atlantic Forest biomes, with the great majority of isolates from Hylidae (Table 6). This clade is well supported and subdivided in four subclades, named as B1 – B4, with pair-wise distance ranging from 0.05 to 0.03 among the subclades (Figure 6 and 7). The B1 clade contains only three isolates of Hylidae anurans from Pantanal, Amazonia and Atlantic Forest biomes, with pair-wise distance ranging from 0.01 – 0.00. The second subclade B2 consists of 12 identical isolates (0.00 pair-wise distance) of Hylidae anurans from Pantanal. The subclade B3 comprises three identical (0.00 pair-wise distance) isolates of Hylidae anurans from Amazonia Biome. The last subclade (B4) contains 11 isolates, being seven from this study and belonging to Hylidae, Leptodactylidae and Microhylidae anurans from Amazonia, Pantanal and Atlantic Forest biomes, with pair-wise distance ranging from 0.02 – 0.00. In addition, one hemoculture isolate (TCC 2321) from this study was identical to four isolates from Pantanal biome, clustering in the same branch.

Regarding the anuran's blood smears of this Clade B, two morphotypes, morphotype 5 (Fig. 9A) and morphotype 7 (Fig. 9B-D), were observed. However, it is worth mention that in all blood extensions analyzed, the morphotype 7 (*T. rotatorium*-like) was present. Therefore, perhaps this morphotype can be considered as the type morphology for this clade.

• **Clade C**

The clade C comprises five isolates, with pair-wise distance of 0.02 – 0.00. These isolates were amplified from one Hylidae and four Leptodactylidae anurans (Table 6). The three isolates from this study (A209, A219 and A224), all from *L. podicipinus* specimens and collected at the Atlantic forest biome, clustered in the same branch; and the other two isolates, from Pantanal (TCC2252) biome and Venezuela (TCC2379), clustered in another branch (Figures 6 and 7).

The blood smears revealed trypomastigotes similar to *T. rotatorium*-like (morphotype 7) (Figure 10).

- **Clade D**

The Clade D contains a great amount of Leptodactylidae, Microhylidae and Hylidae isolates from Pantanal, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest biomes (Table 7). Through phylogenetic analysis it was possible to observe four subclades with isolates from this study, named as D1 – D4, with a pair-wise distance ranging from 0.07 – 0.03 among them (Figures 11 and 12). The D1 subclade comprises only two isolates (pair-wise distance of 0.02) being both from this study and amplified from a mixed hemoculture (TCC 3226) from *T. typhoni* (Hylidae) specimen collected at Cerrado biome. The subclade D2 harbours only isolates from this study with pair-wise ranging from 0.01 – 0.00. The Hylidae, Leptodactylidae and Microhylidae samples from this subclade were collected at Atlantic Forest and Cerrado biomes. The Subclade D3 comprises four isolates, two identical (100% similarity) of Hylidae samples collected at Cerrado biome, from this study; and two Leptodactylidae samples collected at Caatinga and Pantanal biomes. The pair-wise distance among them was 0.02. The subclade D4 includes isolates from Hylidae and Leptodactylidae samples, all from this study, with pair-wise distance ranging from 0.01 – 0.00. In Addition, three hemocultures (TCC 3228, TCC 3232 and TCC 3233) clustered in this clade, with 99.8% - 100% of gene similarity among them. It is worth to mention that the hemocultures TCC 3228 and TCC 3232 were two aliquots of the same culture, cryopreserved in the initial phase for further analysis. These three hemocultures belongs to Leptodactylidae samples, being two from *L. latrans* (TCC 3232 and TCC 3228) and one from *L. labyrinthicus* (TCC 3233) the three from Cerrado biome.

The anuran's blood smears from Clade D revealed eight morphotypes: Morphotype 1, *T. karyozenkton*-like (Fig. 13A); morphotype 2 (Fig. 13B); morphotype 3, *T. leptodactily*-like (Fig. 13C); morphotype 6 (Fig. 13D); morphotype 9, *T. chattoni*-like (Fig.13E); morphotype 11, *T. loricatum*-like (Fig. 13G); morphotype 12 (Fig. 13H).

In addition, four hemocultures (TCC 3226, TCC 3228, TCC3232 and TCC3233) clustered in the Clade D. The TCC 3226 is a mixed-culture, with three species identified through molecular analysis, and with two of them clustered in D.1 subclade, and the other one clustered in An01 clade. The method used to separate mixed cultures is called culture cloning. This process takes time and has several steps, which are still under development in the laboratory. However, three possible morphologies, one for each species, have been identified and monitored in culture (Figure 14). The three possible species morphology were named as M1,

M2 and M3. The TCC 3226 M1 has a slow development, with small rounded bodies, known as spheromastigotes, observed free, in rosettes or inside Hi-5 cells, and small trypomastigotes stages. The TCC 3226 M2 have shown spheromastigotes, free and inside Hi-5 cells, and a morphological variety of epimastigotes. These morphologies ranged from the classic one, small and thin epimastigote to coin-shaped morphology, with a long and thin body with the anterior side in coin-shape with a flagellum; and the third morphology, the longer one, with large and long body, with the anterior end curved with the flagellum visible. The TCC 3226 M3 is considered the most complicated one, complex to maintain during the days, with growth difficulty. However, we were able to identify this morphology as the smallest one, with free spheromastigotes and epimastigotes dated until now.

For the TCC 3228 hemoculture that clustered in the D.4 subclade, the stages observed during the culture development were spheromastigotes, two epimastigotes and two trypomastigotes morphologies. In the primary phase of the culture (Fig. 14D), small rounded bodies, known as spheromastigotes, were observed free or inside Hi-5 cells. The log-phase (Fig. 14E - G) with free spheromastigotes, two epimastigotes morphologies, one slender and smaller, normally observed in division or attached to the Hi-5 cell and the other bigger with a thin undulating membrane, and just one trypomastigote morphology, with slender body with no undulating membrane observed. The last phase, that is the stationary phase (Fig. 14H, I), has larger trypomastigotes with slender undulating membrane and the characteristic s-shaped bodies and free spheromastigotes in a small quantity.

• *An01 Clade*

Through phylogenetic analysis, the An01 clustered as a sister clade to Clade D (Figure 11). This An01 clade comprises a great amount of isolates from Bufonid, Hylidae, Microhylidae and Leptodactylidae samples (Table 7). The isolates from this study clustered in two subclades, named as An01.1 and An01.2 (Figure 12). The subclade An01.1 harbours six isolates, all from Hylidae samples collected at Atlantic Forest, Cerrado and Amazonia biomes. Two isolates, A36 (*B. raniceps*) and TCC 3226 (*T. thyphoni*) were provided from this study, both from Cerrado biome. Furthermore, TCC 3226 was amplified from a mixed culture, cryopreserved at an initial stage for future analysis, with the other two amplified isolates grouped in Clade D (subclade D.1). Therefore, TCC 3226 sample has three different *Trypanosoma* species to be analyzed and differentiated during the hemoculture development, and these analyses are still in progress.

The other subclade, An01.2 comprises 14 isolates of Hylidae, Leptodactylidae and Microhylidae samples from Cerrado, Pantanal and Atlantic Forest with a pair wise distance ranging from 0.03 – 0.00. Seven of these samples are from this study, being two amplified from hemocultures (TCC3227 and TCC 3229). These two cultures have shown 100% of similarity among their amplified clones, and were considered not mixed; both were from *L. latrans* specimens collected from Cerrado Biome. In addition, TCC3227 and A85c1 were identical (100% similarity).

From the nine isolates clustered at An01 Clade, the anuran's blood smears revealed six morphotypes: Morphotype 5 (Fig. 16A); morphotype 7, *T. rotatorium*-like (Fig. 16F); morphotype 9, *T. chattoni*-like (Fig.16E); morphotype 10 (Fig.16D); morphotype 11, *T. loricatum*-like (Fig.16B); and morphotype 12 (Fig. 16C).

Regarding the hemocultures, the An01.1 subclade comprises the third species of TCC3226 (Figure 14). The hemocultures TCC 3227 and TCC 3229 are positioned at An01.2 subclade. The TCC 3227 was isolated from *Leptodactylus latrans*, collected at Cerrado. The blood smears from this anuran revealed two morphotypes, morphotype 7 (*T. rotatorium*-like) and morphotype 10. The morphological data of TCC 3227 observed during the culture development were epimastigotes in division and epimastigotes with undulating membrane (Figure 17 A-F).

The isolate TCC 3229 was obtained from one *L. latrans* specimen, collected at Cerrado. Its blood smears revealed only one morphology, morphotype 11 *T. loricatum*-like. During the hemoculture development, it was possible to observe small and rounded forms, free or into rosette shape, known as spheromorphotype, slender epimastigotes and small trypomastigites with roller-shaped bodies (Fig. 18 A-F).

Discussion

Positivity

There are reports of *Trypanosoma* infection in ten families of Brazilian anurans: Bufonidae, Leptodactylidae, Hylidae, Ranidae, Odontophrynidae, Centrolenidae, Brachycephalidae, Leiuperidae and Cycloramphidae (Ferreira et al. 2007, 2008, 2015; Leal et al. 2008; Lemos et al. 2008; Attias et al. 2016; Isaak-Delgado et al. 2020; Sato 2021). In this study, three of them, from Cerrado and Atlantic Forest biomes, were found positive: Leptodactylidae, Hylidae and Microhylidae.

Morphological data

The anurans trypanosomes have been classified arbitrarily, as new or old species, adopting the host of origin and/or geographic origin as a taxonomic criterion, leading to dozens of described species without reliable criteria and without comparative studies. One of the first attempts to classify amphibian trypanosomes was proposed by Doflein (1901) who divided *Trypanosoma* into three subgenera: *Trypanomona*, *Herpetosoma* and *Trypanosoma*, the latter of which contained the anuran flagellate *T. rotatorium*. However, in the last revision of the genus *Trypanosoma*, this classification was abandoned and a classification restricted to mammalian trypanosomes was proposed. They were grouped into eight subgenera, including the subgenus *Megatrypanum*, and showed morphological affinities with amphibian and reptile trypanosomes (Hoare 1964).

Regarding the classification of anuran trypanosomes over the years, until 1973 about sixty species were described (Bardsley and Harmsen, 1973). However, these species were characterized based on morphological data of blood stages (Desser 2001; Zickus 2002), and anurans trypanosomes are known for the great pleomorphic capacity, being able to have more than one morphotype per species, as reported in this study. Thus, Diamond (1965) in his extensive taxonomic review of anuran trypanosomes recognized 26 species with a wide distribution and defined the morphotypes present in the blood of these hosts.

However, even with some studies focusing on the morphotype identification criteria for anuran blood smears, trypanosomes from these hosts are highly pleomorphic, with variable data on blood forms. Notwithstanding, anurans trypanosomes mixed-infection have been known for a long time in the literature which makes the correct identification and characterization on species level so complex and difficult. For the *Trypanosoma* characterization, several analysis steps should be required, including hemocultures and molecular cloning targeting more than one gene.

Therefore, the correlation of morphological types (morphotypes) and species is impossible to be performed (Attias et al. 2016; Ferreira et al. 2007; Spodareva et al. 2018).

Martin and Desser (1991a), in a study with experimental infection of *T. fallisi* in *Bufo americanus*, described two phases of infection with changes in morphology associated with the season of the year. Wide trypomastigotes, considered an indicative of early infection, were observed in late spring and throughout the summer; and the thinner and shorter forms were present in all seasons of the year. Trypanosomes morphological variations in the anuran's blood is considered related to infection time and temperature (Reilly and Woo, 1982b).

The morphological characteristics of anuran trypanosomes are related to the pleomorphism of the blood trypomastigotes forms, which may vary in body size and shape, in the position of the nucleus and kinetoplast, the development of the undulating membrane and the length of the flagellum. Some species have very peculiar shapes, while others have shapes similar to those found in reptile trypanosomes. Desser (2001) observed five morphotypes in the blood of a single specimen of *Rana vaillanti*. Ferreira et al. (2007) observed 11 morphotypes of trypomastigotes in the anuran's blood from Brazil, with more than one morphological type per host. In our study, twelve morphologies were found with more than one observed per blood sample, and with some morphologies being reported for the first time in the literature. However, unfortunately, the blood samples from some of these morphologies (Morphotype 4) could not be amplified by molecular analysis. In addition, most of the morphotypes found in Brazilian anurans, including those of this study, resembles the morphotypes described in European, North American and Asian trypanosomes in previous studies (Diamond 1965; Bardsley and Harmsen 1973; Desser 2001; Ferreira et al. 2008). Although some of the morphotypes found in this study could be related to some European, North American and Asian species, the molecular studies carried out did not confirm the existence of these species in Brazil, as reported by Ferreira et al. (2007, 2008).

In Brazil, several species were described or observed infecting Leptodactylidae frogs: *Trypanosoma ocellati*, *T. leptodactyli*, *T. celestinoi* and *T. rotatorium* in *Leptodactylus ocellatus*; *T. chattoni* in *L. fuscus* and *T. rotatorium*-like in *L. chaquensis* (Lemos et al, 2008). In addition to these frog parasites, *T. borelli* has been described in *Scinax ruber*, family Hylidae (Bardsley and Harmsen 1973). The only species of Brazilian frog trypanosome described based on a set of morphological and molecular parameters was *Trypanosoma hertameyeri* (Attias et al. 2016).

Molecular data

From the common ancestor of all trypanosomes, two phylogenetic lineages diverged (terrestrial and aquatic) according to the main habitat of their hosts. The trypanosomes of mammals and birds, and part of reptiles, cluster in the terrestrial clade (Stevens et al. 2001; Hamilton et al. 2004, 2007; Viola et al. 2009; Kostygov et al. 2021). On the other hand, fish and anuran trypanosomes grouped in the most basal clade, known as the aquatic clade. Due to its basal position, this clade has proved to be fundamental for evolutionary studies of the genus *Trypanosoma* (Stevens et al. 2001, 2008; Hamilton et al. 2004, 2007; Ferreira et al. 2007, 2008; Fermino et al. 2015, 2019; Spodareva et al. 2018).

The studies carried out by the scientific community so far, suggest that vectors are decisive in the origin of the main phylogenetic lineages of trypanosomes. Therefore, exclusively aquatic leeches should transmit the ancestor species of the Aquatic clade. However, an ancestor of this lineage gave rise to two main groups that differ in vectors and transmission. The first, associated with the aquatic environment, is constituted predominantly by trypanosomes from fish and some reptiles, such as turtles (*T. chelodinae* and *T. mocambicum*) and caiman (*T. clandestinus*), as well as the platypus trypanosome (*T. binneyi*). All tripanosomes of group 1 are transmitted by aquatic leeches (; Stevens et al. 2001; Ferreira et al. 2007, 2008; Hamilton et al. 2004, 2007; Fermino et al. 2013, 2015, 2019; Hayes et al. 2014; Papaprini et al. 2014; Lemos et al. 2015; Spodareva et al. 2018).

The second group from Aquatic clade is comprised by anuran's trypanosomes. The anuran trypanosomes are considered the largest known assemblage of trypanosomes among vertebrate orders, with the monophyly of the group being debated since the first performed phylogenetic analyzes (Bardsley and Harmsen 1973; Ferreira et al. 2007, 2008; Attias et al. 2016). This second group contains a single non-anuran trypanosome, *T. therezieni*, from a chameleon from Madagascar, which is not an aquatic but an arboreal animal (Stevens et al. 2001; Hamilton et al. 2007; Spodareva et al. 2018). Ongoing studies at USP laboratory confirm that trypanosomes from lizards, from Brazil and Africa, are positioned in this clade, close to different groups of anuran trypanosomes. Therefore, the anuran's monophyly has been contested again with trypanosome exchanges between frogs and lizards (Hamilton et al. 2007; Viola et al. 2009; Ortiz et al. 2018; Rodrigues et al. 2019).

In addition, the sharing of vectors and hosts in the same environment is considered the most likely mechanism for host exchange by the trypanosomes. Although there is experimental evidence that anuran trypanosomes are transmitted by leeches and insects, no trypanosome included in phylogenetic analyzes has had its vector confirmed.

Studies including molecular markers are scarce and this number is even smaller when related to Brazilian hosts. To the date, only a few trypanosomes from anurans have been included in the general phylogenetic analyses. Martin et al. (2002) developed one of the first studies on anuran trypanosomes. The authors report that five species infecting ranids and bufonids from North America, Europe and Africa clustered together. Nowadays, it is known that anuran trypanosomes from these regions, except from *T. chattoni* (Mathis and Leger 1911), cluster in the Clade An04. In regards of *T. chattoni*, this species was described in a ranid from North America and clusters in the An05 clade.

In addition, a new clade (An08) was proposed by the USP laboratory team, to include sequences amplified by the SSU rRNA and gGAPDH genes of *T. loricatum* from the Czech Republic. This clade comprises *T. loricatum* and similar trypanosomes obtained from the same frog species from Croatia (deposited in USP collection). Furthermore, An08 turned out to be the first clade to diverge from the common ancestor of all anuran trypanosomes. Therefore, the basal phylogenetic lineages of anuran trypanosomes do not include tropical specimens.

The Neotropical anuran trypanosomes formed a sister clade to old-world trypanosomes, consisting of at least five phylogenetic lineages (clades An01-An05) (Ferreira et al. 2007, 2008 Attilas et al. 2016). To the date, seven lineages can be cited with Brazilian isolates: An01, An02, An03, An04, An05, An06 and An07 (Sato, 2021).

In addition, the data from the present study, concatenated with data from USP samples, bring a great overview of the diversity of tripanosomes from Brazilian anurans including data from almost all Brazilian biomes, except Pampa. In relation to our samples, some grouped together with the subclades An03 and An01, previously identified, and others were included in four new clades, temporarily named A – D. This study brings some insights on the diversity of *Trypanosoma* species in Brazilian anurans and emphasizes the importance of this study.

An03 clade

This study revealed that 14 isolates from anurans clustered with Neotropical anurans and sandflies from previous studies (Ferreira et al. 2008; Sato et al. 2021). Ferreira et al. (2008) revealed the cluster of anurans and sandflies (*Evandromyia infraspinosa*, *Sciopemyia servulolimae*, *S. sordellii* and *Sciopemyia* sp.) isolates from the Amazon region of Brazil in the An03 Clade. These sandflies species are known for their preference for feeding on cold-blooded animals and for inhabiting tree trunks, ecological niches close to the ground where anurans lives (Shaw et al. 2003; Ferreira et al. 2008).

Prior to the present study, clade An03 consisted mainly of bufonids and leptodactylids from the Amazon biome, with two exceptions: hylid isolate from the Pantanal (BSC405) and leptodactylid isolate from the Atlantic Forest (TSC250). This study included isolates of hylids and leptodactylids from the Cerrado and Atlantic Forest biomes. Therefore, the presence of anurans and sandflies in Clade An03 strongly suggests sandflies as vectors of trypanosomes in anurans and a great complexity in this clade, composed of such divergent species.

The knowledge of hematophagous insects as a potential vector of *Trypanosoma* in anurans had already been considered previously in the literature. The hematophagous insects are often observed feeding on the blood of frogs and toads, some exclusively. Therefore, studies based on experimental infection sought to demonstrate the transmission of trypanosomes via ingestion of infected insects by anurans (Anderson and Ayala 1968; Ramos and Urdaneta-Morales 1977; Bernal and Pinto 2016).

Anderson and Ayala (1968) carried out an experimental infection and identified *Phlebotomus vexator* as the vector of *Trypanosoma* species that parasitize *Bufo boreas* from North America. The development of the trypanosome was followed after the sand fly fed on the positive anuran. After 24 hours, the amastigotes forms were observed in the stomach of the sandflies; after 48 hours, elongated forms with free flagellum were seen; and, after 72 hours, a high number of promastigotes forms were detected along the intestine. In addition, other species of anuran trypanosomes have been described associated to transmission by sandflies as *Trypanosoma bocagei* in bufonids from China and Africa, and *Trypanosoma bufophlebotomi* from the United States (Anderson and Ayala 1968). Although anuran trypanosomes developed in the gut of sandflies, no infective metacyclic trypomastigotes forms were observed, suggesting the epimastigotes as the infective forms (Ayala 1971; Dessler et al. 1973; Ramos and Urdaneta-Morales 1977).

Regarding the morphological data, the morphologies observed in the anurans blood smears and hemocultures by Sato (2021) doctoral thesis, were similar to those found in that study, with roller-shaped trypomastigotes, with undulating membrane evidenced and longitudinal striations, similar to the morphotype 1 in this study. The only hemoculture from this study, TCC 3230, also provided similar morphologies during the culture development, with small and rounded forms, often clustering into rosettes, epimastigotes and roller-shaped trypomastigotes with well-defined undulating membrane.

A, B and C clades

In this study, the evolutionary story of anurans trypanosomes turned out to be much more complex with the inclusion of our isolates in the phylogenetic analyzes. Ferreira et al. (2007, 2008) and Sato (2021) suggested that a common ancestor originated all Neotropical trypanosomes, with two main phylogenetic lineages (Anura III and IV). The first lineage (Anura III) gave rise to the trypanosomes of clades AN03 and AN05. The second lineage (Anura IV) diverged more recently, generating the clades An01, An02, An06 and An07.

The analyzes inferred with gGAPDH sequences (phylogenies with better support values) from this study, revealed three new subclades (A, B and C) located in a basal portion within the branches of clades An07, An02 and An06. The clade A comprising only Hylidae isolates from Mata Atlântica and Cerrado biomes, all from this study. Clade B, on the other hand, has sequences from this study and from previous studies developed by Sato (2021). This Clade was initially located within An01, but with the inclusion of our isolates, it has moved to an upper portion of the tree and grouped with clades A, C, An02, An07 and An06. According to Sato (2021), this clade B was composed only of Hylidae isolates from the Atlantic Forest. However, with our isolates, this clade is now composed of Hilidae, Microhylidae and Leptodactylidae isolates from the Amazon, Pantanal, Cerrado and Atlantic Forest, being our sequences from the Atlantic Forest and Cerrado. Therefore, it is noticeable how complex the phylogeny of Neotropical anurans is. The Clade C comprises sequences from this study (A209, A224 and A219) and two sequences (TCC2379 and TCC2252) previously reported belonging to An01 clade (Sato, 2021), from Venezuela and Brazil. The phylogenetic position have shown a common ancestor to An07, A06 and An02, being the basal clade among them.

In this study, no pattern was observed regarding host specificity or biome specificity per new clade (A, B, and C). However, our morphological data from the blood smears revealed some similarity per clade. The clade A include three morphotypes, but only morphotype 5 was observed in all samples. In the Clade B two different morphologies were present, nevertheless, only morphotype 7 (*T. rotatorium*-like) was observed in all blood smears from this study. Finally, in Clade C only one morphology, morphotype 7 (*T. rotatorium*-like), was detected, similar with what is reported in clade B, and these results may be related to the common ancestor.

Thus, most of the morphotypes found in this study are related to European, North American or African species, strongly suggesting that the Neotropical isolates may have originated from species from Europe, Africa and North America, with the morphologies being less modified over time, compared to the gene structure. This hypothesis has been strongly suggested by previous studies with phylogenetic data (Ferreira et al. 2007, 2008; Sato 2021).

Clades D and An01

The Clade D is composed, majority from isolates from this study, with only four samples (TCC645, TCC653, RNSA15, PAAN98) from the USP dataset. Hylidae, Microhylidae and Leptodactylidae isolates,

from Mata Atlantica, Cerrado, Pantanal (PAAN98) and Caatinga (RNSA15) biomes, form this clade. There was no pattern observed, regarding host or biome per subclade. The phylogeny inferred with gGAPDH sequences (with better support values) have shown a common ancestor between Clade D and An01, being considered as sister clades.

Differing from Clade D, The An01 clade is composed majority by isolates from USP dataset. This clade was described before by Ferreira et al. (2007) and Sato (2021, data unpublished). The first data on this clade comprised only four Hylidae isolates from the Amazonia and Pantanal biomes (Ferreira et al. 2007). Then expanded with Hylidae, Bufonidae and Leptodactylidae isolated from Colombia, Venezuela and Brazil (Sato, 2021). Now, with the samples from this study, there is an addition of isolates from the Cerrado biome and from the Microhylidae family. Clade D is the most diverse in host species and biome, with only samples from Pampa biome missing from Brazil. This shows how complex is the evolutionary history of trypanosomes from Neotropical anurans.

Conclusion

The evolutionary history of anuran trypanosomes has become much more complex with the inclusion of our isolates in the analyses. This study brings new data into *Trypanosoma* species diversity in Brazilian anurans, with new species to be described soon, and report, for the first time, *Trypanosoma* spp. infection in eight anuran species. The plasticity of *Trypanosoma* morphology was evidenced, with twelve morphologies found during the blood smears analysis; and in most cases, more than one morphotype was observed per blood smear, including some reported for the first time. We also bring new data on hemocultures results. Besides the inclusion of some isolates from this study into two pre-existing subclades (An03 and An01), we created four new clades (Clade A to Clade D) to absorb the majority of our new isolates. The An03 Clade that includes anuran isolates from this study, from earlier studies and from sandflies isolates, strongly suggest sandflies as vectors of frogs trypanosomes. In conclusion, this study reinforces the complexity of phylogeny of anuran trypanosomes, bringing new morphological and molecular data on this parasite group. Also, we provide the first report of *Trypanosoma* in eight anuran species, with further new species descriptions.

References

- Anderson JR, Ayala SC (1968). Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: first report from the Americas. Science (New York, NY). 161(3845):1023-5.
- Attias M, Sato LH, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Camargo EP, Teixeira MM, de Souza W (2016). Developmental and ultrastructural characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma herthameyeri* n. sp. of Brazilian Leptodactylidae frogs. Journal of Eukaryotic Microbiology. 63:610–22.
- Ayala SC, McKay JG (1971). *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. The Journal of Protozoology. 18(3):430-3.
- Bardsley JE, Harmsen R (1973). The trypanosomes of anura. Advances in Parasitology. 11(0):1-73.
- Bartlett-Healy K, Crans W, Gaugler R (2009). Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). Journal Parasitology. 95:381-387
- Bernal XE, Pinto CM (2016). Sexual differences in prevalence of a new species of trypanosome infecting túngara frogs. International Journal of Parasitology Parasites and Wildlife. 21;5 (1):40-7.
- Cavalier-Smith T (2016). Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. European journal of Protistology. 56:250-76.
- Desser SS (2001). The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. The Journal of Parasitology. 87(1):152-60.
- Fermino BR, Paiva F, Viola LB, Rodrigues CMF, Garcia HA, Campaner M, Takata CSA, Sheferaw D, Kisakye JJ, Kato A, Jared CAGS, Teixeira MMG, Camargo EP (2019). Shared species of crocodilian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South America, including the description of a new species from caimans, *Trypanosoma kaiowa* n. sp. Parasites and Vectors. 12(1):225.
- Fermino BR, Paiva F, Soares P, Tavares LE, Viola LB, Ferreira RC, Botero-Arias R, de-Paula CD, Campaner M, Takata CS, Teixeira MM, Camargo EP (2015). Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. International Journal of Parasitology Parasites and Wildlife. 4(3):368-78.
- Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CS, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MM (2013). The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. Parasites and Vectors. 6(1):313.

629 Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV (2008). A phylogenetic
630 lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies
631 (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. The Journal of Eukaryotic
632 Microbiology. 55(5):427-35.

633 Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM (2007). Morphological and
634 molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia,
635 Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitology. 134: 1623-38.

636 Frost DR (2022). Amphibian Species of the World: an Online Reference. American Museum of Natural
637 History, New York, USA. Electronic Database, Version 6.0, 2022 <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>

638 Gruby M (1843) Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoïre, Trypanosoma
639 sanguinis. C R Hebd Saeances Acad Sci. 55: 1134 – 1136.

640 Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR (2007). Patterns of co-evolution between trypanosomes and their
641 hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Molecular Phylogenetics and
642 Evolution. 44(1):15-25.

643 Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC (2005). A new lineage of trypanosomes from
644 Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). International journal for
645 Parasitology. 35(4):431-43.

646 Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC (2004). Trypanosomes are monophyletic:
647 evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA.
648 International Journal for Parasitology. 34(12):1393-404.

649 Hayes PM, Lawton SP, Smit NJ, Gibson WC, Davies AJ (2014). Morphological and molecular
650 characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech
651 vector. Parasites & vectors. 7:50-60.

652 Hoare CA (1972). The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific
653 Publications.

654 Hoare CA (1964). Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. x. revision of the
655 systematics. Journal of Protozoology. 11: 200-7.

656 Isaak-Delgado AB, López-Díaz O, Romero-Callejas E, Martínez-Hernández F, Muñoz-García CI,
657 Villalobos G, Rendón-Franco E (2020). Morphological and molecular characteristics of hemoparasites in
658 vaillant's frogs (*Lithobates vaillanti*). Parasitology Research. 119: 1891 - 1901

659 Kostygov AY, Karnkowska A, Votýpka J, Tashyreva D, Maciszewski K, Yurchenko V, Lukeš J (2021).
 660 Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*. 11: 200407.
 661 Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0
 662 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7):1870-4.
 663 Leal DD, O'Dwyer L H, Ribeiro VC, Silva RJ, Ferreira VL, Rodrigues RB (2009). Hemoparasites of the
 664 genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the Sao Paulo
 665 and Mato Grosso do Sul States - Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 81(2):199- 206.
 666 Lemos M, Fermino BR, Simas-Rodrigues C, Hoffmann L, Silva R, Camargo EP, Teixeira MM, Souto-
 667 Padrón T (2015). Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian
 668 armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome
 669 species. *Parasites and Vectors*. 8:573.
 670 Lemos M, Souto-Padrón T (2014). Isolation and In Vitro Maintenance of Trypanosomes from Naturally
 671 Infected and Commercially Important Brazilian Fish. *Journal of Parasitology*. 100: 687–91
 672 Lemos M, Morais DH, Carvalho VT, D'Agosto M (2008). First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil
 673 and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *The Journal of*
 674 *Parasitology*. 94(1):148-51.
 675 Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana Jr M, Pavan AC, Carranza JC, Lim BK, Campaner M,
 676 Takata CS, Camargo EP (2015). New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided
 677 by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian
 678 lineage of trypanosomes. *Parasites & vectors* 8:657-74.
 679 Lima L, Silva F, Neves L, Attias M, Takata C, Campaner M, de Souza W, Hamilton P, Teixeira MMG
 680 (2012). Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic
 681 evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related
 682 to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist*. 163(6):856-72.
 683 Lun ZR, Dessler SS (1996). ANalysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random
 684 amplified polymorphic DNA. *Parasitology Research*. 82:22-27
 685 Marcili A, Costa AP, Soares HS, Acosta ICL, Lima JTR, Minervini AHH, Melo ATL, Aguiar DM, Pacheco
 686 RC, Gennari SM (2013). Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different
 687 biomes in Mato Grosso, Brazil. *Journal of Parasitology*. 99: 1071 – 1076.

688 Martin DS, Wright AD, Barta JR, Desser SS (2002). Phylogenetic position of the giant anuran
689 trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma*
690 *neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. Journal of
691 Parasitology. 88:566–71.

692 Martin DS, Desser SS (1992). Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida:
693 Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. Journal of Parasitology. 78:317-322.

694 Martin DS, Desser SS (1991). Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in
695 toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron microscopic study. Parasitology research.
696 77(1):18-26.

697 Martin DS, Desser SS (1990). A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* n. sp. in toads
698 (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. The Journal of Protozoology. 37(3):199- 206.

699 Noyes HA, Stevens JR, Teixeira MMG, Phelan J, Holz P (1999). A nested PCR for the ssrRNA gene detects
700 *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia.
701 International journal for parasitology. 29(2):331-9.

702 O'Donoghue P (2017) Haemoprotozoa: Making biological sense of molecular phylogenies. International
703 Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 6(3):241-56.

704 Ortiz PA, Garcia HA, Lima L, da Silva FM, Campaner M, Pereira CL, Jittapalapong S, Neves L,
705 Desquesnes M, Camargo EP, Teixeira MMG (2018). Diagnosis and genetic analysis of the worldwide
706 distributed Rattus-borne *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* and its allied species in blood and fleas of
707 rodents. Infection, Genetics and Evolution. 63: 380-390.

708 Paparini A, Macgregor J, Irwin PJ, Warren K, Ryan UM (2014). Novel genotypes of *Trypanosoma binneyi*
709 from wild platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*) and identification of a leech as a potential vector.
710 Experimental Parasitology. 145:42-50.

711 Rambaut A (2012). FigTree v1.4.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed march
712 2022).

713 Ramos B, Urdaneta-Morales S (1977). Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. Revista
714 de Biologia Tropical. 25(2):209-17.

715 Read AM, Goldberg TL (2010). Blood parasites of frogs from an equatorial African montane forest in
716 western Uganda. Journal of Parasitology. 96: 448–450.

717 Reilly BO, Woo PTK (1982). The in vivo and in vitro development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and
 718 Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). Canadian Journal Zoology. 60: 124-
 719 33.
 720 Rodrigues AFSF, Morais DH, Carvalho VT, D'Agosto M, Lemos M (2019). Morphological and
 721 Morphometric Characterization of Trypanosomes in *Leptodactylus lineatus* and *Osteocephalus* sp. (Anura)
 722 from Brazilian Midwest. Revista Brasileira de Zoociências. 20:1-10.
 723 Sato LH. 2021. Diversidade genética e morfológica, relações filogenéticas e taxonomia de tripanossomas
 724 de anuros neotropical. Tese. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro,
 725 Universidade de São Paulo. Pp. 123.
 726 Shaw JJ, Rosa AT, Souza A, Cruz AC (2003). Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de
 727 determinadas espécies. In: Rangel EF, Lainson R (eds) Flebotomíneos do Brasil. Ed. Fiocruz.
 728 Simpson AG, Stevens JR, Lukes J (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends
 729 in Parasitology. 22(4):168-74.
 730 Spodareva VV, Grybchuk-Ieremenko A, Losev A, Votýpka J, Lukeš J, Yurchenko V, Kostygov AY (2018).
 731 Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. Parasites and
 732 Vectors. 11(1):447.
 733 Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae (2001).
 734 Advances in Parasitology. 48:1-56.
 735 Vickerman K (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. International Journal
 736 for Parasitology. 24: 1317-1331.
 737 Vickerman K (1976). The diversity of the kinetoplastid flagellates in: Biology of the Kinetoplastida.
 738 Lumsden WHR, Evans DA (eds), Academic Press, London/New York/San Francisco. Academic Press,
 739 London/New York/San Francisco. 1-34
 740 Viola LB, Attias M, Takata CSA, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG (2009).
 741 Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate
 742 dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma*
 743 *serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*.
 744 Journal of Eukaryotic Microbiology. 56(6):594-602.
 745 Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, Duarte MR, Grego KF, Barrett
 746 TV, Camargo EP, Teixeira MMG (2008a). Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA

sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 135(5):595-605.

Viola LB, Almeida R, Ferreira RC, Campaner M, Takata CSA, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MMG (2008b). Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman jacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and GAPDH genes. *Parasitology*. 136(1):55-65.

Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukeš J, Yurchenko V (2015). New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*. 31(10):460-469.

Wilgenbusch JC, Swofford D (2003). Inferring evolutionary trees with PAUP*. *Current protocols in bioinformatics* Chapter 6, Unit 64.

Zanetti A, Ferreira RC, Serrano MG, Takata CS, Campaner M, Attias M, de Souza W, Teixeira MM, Camargo EP (2016). *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae): Phylogenetic analyses support infrageneric lineages and a new species transmitted to Solanaceae fruits by a pentatomid hemipteran. *European journal of Protistology* 56:232-49.

Zickus T (2002). The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*. 12:197-202.

Zippel KC, Lillywithe HB, Mlandnich CRJ (2001). New vascular system in reptiles: Anatomy and postural hemodynamics of vertebral venomous lexus in snakes. *Journal of Morphology*. 250: 1

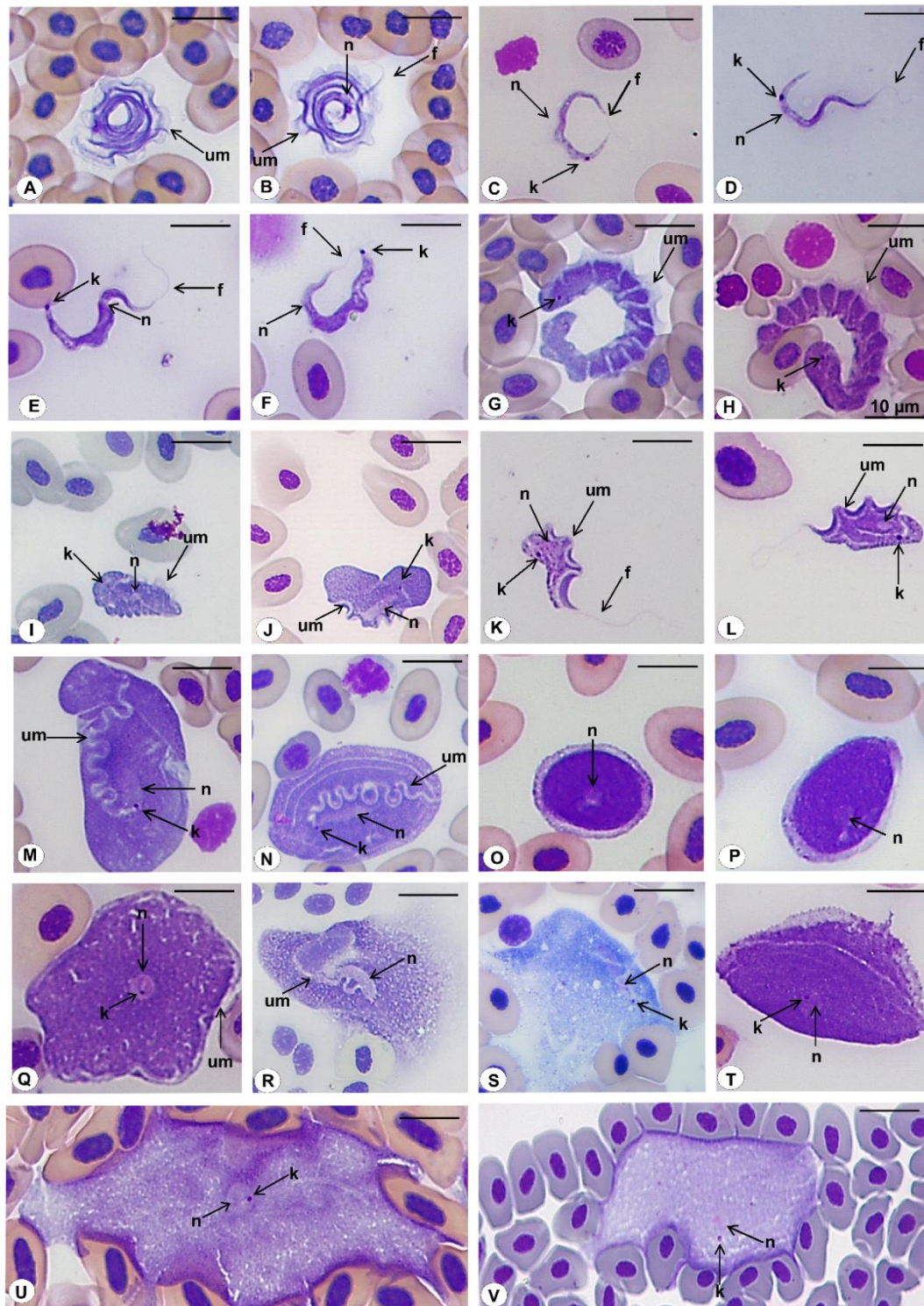


Figure 1 (A – V). *Trypanosoma* spp. infecting the peripheral blood of anurans from this study. The morphological differences of the tripomastigotes were characterized as morphotypes 1 to 12. **Morphotype 1:** *T. karyozenkton* - like (A, B). **Morphotype 2** (C, D). **Morphotype 3:** *T. leptodactyly* - like (E, F). **Morphotype 4** (G, H). **Morphotype 5** (I, J). **Morphotype 6:** (K, L). **Morphotype 7** *T. rotatorium* – like (M, N). **Morphotype 8** *T. tsunozomiytai* - like (O, P). **Morphotype 9** *T. chattoni* - like (Q). **Morphotype 10** (R, S). **Morphotype 11** *T. loriatum* – like (T). **Morphotype 12** (U, V). (k - kinetoplast; F – free flagellum; um - undulating membrane; n - nucleus).

775 **Table 1.** List of Locations sampled with their respective geographic coordinates. SP = São Paulo; MS =
 776 Mato Grosso do Sul; MT = Mato Grosso; GO = Goiás.

Locality	City	State	Coordenates
São Sebastião do Paraíso farm	Boa Esperança do Sul	SP	21°51'36.83"S, 48°27'3.56"W
Santa Júlia farm	Gavião Peixoto	SP	21°50'43.74"S, 48°28'43.43"W
Carandá farm	Araraquara	SP	21°52'30.28"S, 48°13'50.78"W
São Sebastião do Paraíso farm (fishing place)	Gavião Peixoto	SP	21°50'41.83"S, 48°28'10.24"W
RPPN Cisalpina	Brasilândia	MS	21°15'34.36"S, 51°54'18.96"W
CEPEMA	Cocalinho	MT	14°31'40.16"S, 51°41'34.07"W
Pindaíba river	Araguaiana	MT	14°35'47"S, 51°43'9.59"W
Boa Esperança farm	Cocalinho	MT	14°46'32.27"S, 51°32'50.29"W
Stream	Nova Xavantina	MT	14°31'48.03"S, 51°41'43.88"W
Amado Batista farm	Cocalinho	MT	14°28'39.27"S, 51°36'31.95"W
Sertaneja Retiro farm	Cocalinho	MT	14°26'19.98"S, 51°35'20.17"W
Red driver	Britânia	GO	15°10'44.82"S, 51°9'58.48"W
São Pedro hotel	Britânia	GO	15° 14'30.80"S, 51°9'27.05"W
Tigrinho river	Britânia	GO	15° 13'42.20"S, 51°9'30.0"W
Araguaia river	Itacaiú	GO	15°04'39.81"S, 51°26'68,91" W

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786 **Table 2.** Number of anuran species screened for trypanosomes and their positivity by analysis in conventional optical microscopy.

	Species	Family	Nº	P (%)
1.	<i>Boana raniceps</i> (Cope, 1862)	Hylidae Rafinesque, 1815	28	20 (71.4%)
2.	<i>Boana cf. raniceps</i>	Hylidae	4	4 (100%)
3.	<i>Boana caiapo</i> Pinheiro, Cintra, Valdujo, Silva, Martins, Silva & Garcia, 2018	Hylidae	3	2 (66.6%)
4.	<i>Boana faber</i> (Wied, 1821)	Hylidae	1	-----
5.	<i>Boana lundii</i> (Burmeister, 1856)	Hylidae	2	1 (50%)
6.	<i>Boana albopunctata</i> (Spix, 1824)	Hylidae	1	-----
7.	<i>Chiasmocleis albopunctata</i> (Boettger, 1885)	Microhylidae Günther, 1858	2	-----
8.	<i>Dendropsophus aff microcephalus</i>	Hylidae	1	1 (100%)
9.	<i>Dendropsophus anataliasiasi</i> (Bokermann, 1972)	Hylidae	3	1 (33.3%)
10.	<i>Dendropsophus araguaya</i> (Napoli & Caramaschi, 1998)	Hylidae	2	-----
11.	<i>Dendropsophus nanus</i> (Boulenger, 1889)	Hylidae	4	-----
12.	<i>Dermatonotus muelleri</i>	Hylidae	6	-----
13.	<i>Elachistocleis cesarii</i> (Miranda Ribeiro, 1920)	Microhylidae	2	-----
14.	<i>Leptodactylus brevipes</i> Cope, 1887	Leptodactylidae Werner 1896	1	-----
15.	<i>Leptodactylus fuscus</i> (Schneider, 1799)	Leptodactylidae	4	1 (25%)
16.	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (Spix, 1824)	Leptodactylidae	17	2 (11.7%)
17.	<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen, 1815)	Leptodactylidae	49	29 (59.1%)
18.	<i>Leptodactylus mystaceus</i> (Spix, 1824)	Leptodactylidae	9	-----
19.	<i>Leptodactylus petersii</i> (Steindachner, 1864)	Leptodactylidae	1	1 (100%)
20.	<i>Leptodactylus podicipinus</i> (Cope, 1862)	Leptodactylidae	15	5 (33.3%)
21.	<i>Leptodactylus pustulatus</i> (Peters, 1870)	Leptodactylidae	6	4 (66.6%)
22.	<i>Leptodactylus</i> sp.	Leptodactylidae	7	2 (28.5%)
23.	<i>Osteocephalus taurinus</i> Steindachner, 1862	Hylidae	6	-----
24.	<i>Physalaemus centralis</i> Bokermann, 1962	Leptodactylidae	2	-----
25.	<i>Physalaemus cuvieri</i> Fitzinger, 1826	Leptodactylidae	5	-----
26.	<i>Physalaemus marmoratus</i> (Reinhardt & Lütken, 1862)	Leptodactylidae	1	-----
27.	<i>Physalaemus nattereri</i> (Steindachner, 1863)	Leptodactylidae	9	-----
28.	<i>Physalaemus</i> sp.	Leptodactylidae	1	-----
29.	<i>Pseudis platensis</i> Gallardo, 1961	Hylidae	9	4 (44.4%)

30.	<i>Pseudopaludicola mystacalis</i> (Cope, 1887)	Leptodactylidae	27	-----
31.	<i>Rhinella diptycha</i> (Cope, 1862)	Bufonidae Gray, 1825	35	-----
32.	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i> (Gallardo, 1965)	Bufonidae	5	-----
33.	<i>Rhinella ocellata</i> (Günther, 1858)	Bufonidae	4	-----
34.	<i>Scinax fuscovarius</i> (A. Lutz, 1925)	Hylidae	22	5 (22.7%)
35.	<i>Scinax</i> sp.	Hylidae	2	1 (50%)
36.	<i>Scinax x-signatus</i> (Spix, 1824)	Hylidae	13	1 (7,7%)
37.	<i>Trachycephalus typhonius</i> (Linnaeus, 1758)	Hylidae	6	6 (100%)
Total 34 species (13 genera)		4 families	309	90 (29.1%)

*Number of anurans screened (N). Number of anurans found positive through blood smears analysis, with the prevalence [P (%)].

800 **Table 3.** Morphometric data of the different morphologies of trypomastigotes infecting the anurans blood from the states of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and São Paulo,
801 Brazil.

Tripomastigotes	N	M ± SD (H – L)					
		L (µm)	W (µm)	PK (µm)	KN (µm)	AK (µm)	FL (µm)
Morphology 1	25	58.89 ± 8.87 (84.62 – 36.1)	5.48 ± 1.43 (9.92 – 3.34)	46.74 ± 7.63 (70.98 – 34.1)		7.67 ± 2.79 (14.82 – 2.03)	20.32 ± 4.74 (31.7 – 12.29)
Morphology 2	25	25.5 ± 3.85 (28.51 – 20.30)	1.56 ± 0.71. (2.05 – 0.84)	34.42 ± 7.74 (56.15 – 17.36)	1.98 ± 1.01 (2.25 – 0.54)	1.03 ± 0.41 (1.58 – 0.88)	16.61 ± 3.91 (30.13 – 10.4)
Morphology 3	30	39.5 ± 7.85 (57.56 – 19.53)	2.86 ± 1.11. (6.15 – 1.24)	34.42 ± 7.74 (56.15 – 17.36)			16.61 ± 3.91 (30.13 – 10.4)
Morphology 4	15	71.94 ± 11.56 (95.64 – 64.21)	9.73 ± 2.21 (13.29 – 7.00)	11.24 ± 1.45 (12.26 – 10.21)	6.37 ± 1.61 (7.89 – 3.05)		
Morphology 5	15	27.71 ± 6.63 (50.8 – 14.31)	15.05 ± 2.61 (29.35 – 7.20)	12.56 ± 6.59 (30.16 – 2.68)	4.61 ± 1.62 (10.88 – 1.08)		
Morphology 6	15	28.15 ± 7.28 (46.37 – 18.11)	12.01 ± 4.27 (23.74 – 4.69)	20.64 ± 5.52 (31.98 – 11.54)	4.27 ± 1.54 (7.48 – 1.69)		
Morphology 7	20	57.43 ± 9.92 (81.81 – 43.4)	25.64 ± 4.08 (33.1 – 16.09)		9.73 ± 3.32 (16.64 – 3.38)		
Morphology 8	15	29.62 ± 2.88 (32.11 - 16.54)	29.30 ± 4.01 (32.78 - 25.16)		1.14 ± 0.35 (1.45 – 0.89)		
Morphology 9	50	29.53 ± 6.79 (52.76 – 17.7)	34.34 ± 7.42 (53.38 – 17.00)	13.05 ± 3.40 (20.86 – 8.76)	6.24 ± 1.78 (10.66 – 2.88)		
Morphology 10	15	50.16 ± 7.21 (74.19 – 45.14)	23.04 ± 3.01 (31.07 – 12.99)				
Morphology 11	15	46.20 ± 4.73 (54.31 – 34.67)	22.46 ± 2.96 (29.85 – 17.44)		0.84 ± 0.42 (1.55 – 0.48)		
Morphology 12	15	104.34 ± 16.96 (139.48 – 72.12)	49.73 ± 9.39 (73.24 – 34.59)	6.29 ± 2.86 (8.33 – 3.02)	1.93 ± 1.37 (6.13 – 0.64)		

802 *Mean (M). Standard deviation (SD). Lower measure (L). High measure (H). Number of tripomastigotes per morphology measured (N). Body length (L). Body width (W).
803 Distance from posterior end to kinetoplast (PK). Distance from anterior end to kinetoplast (AK). Flagellum length (FL). Distance from kinetoplast to center of nucleus (KN).

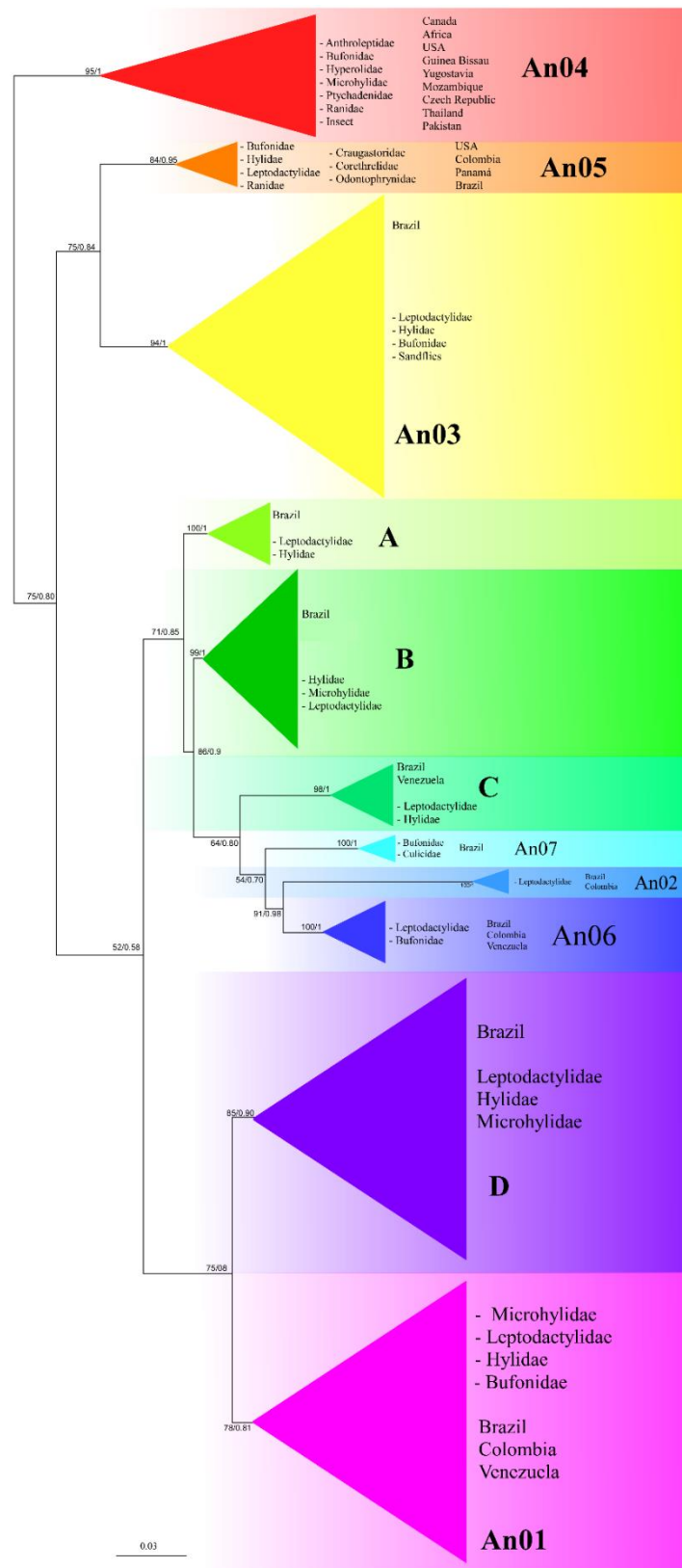
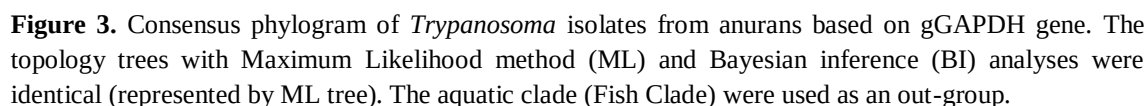


Figure 2. Consensus phylogram of *Trypanosoma* isolates from anurans based on gGAPDH gene. The topology trees with Maximum Likelihood method (ML) and Bayesian inference (BI) analyses were identical (represented by BI tree).

808 **Table 4.** Sequences information from *Trypanosoma* spp. belonging to clade An03.

Samples*	Host		Biome (State)	Sequences (GenBank)	
	Family	Species		SSU rRNA	gGAPDH
A12	Hylidae	<i>Scinax fuscovarius</i>	Cerrado (MT)	X	X
A22	Hylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)		X
A82	Hylidae	<i>Pseudis platensis</i>	Cerrado / Atlantic Forest (MS)		X
A84	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Cerrado / Atlantic Forest (MS)		X
A116	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	Cerrado (MT)		X
A119	Hylidae	<i>Pseudis platensis</i>	Cerrado (MT)		X
A204	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Atlantic Forest		X
A226	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Atlantic Forest		X
A230	Hylidae	<i>Scinax x-signatus</i>	Atlantic Forest		X
A256	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado / Atlantic Forest (MS)		X
A270	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)	X	X
A271	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)		X
A318	Hylidae	<i>Scinax fuscovarius</i>	Cerrado (MT)		X
TCC3230	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)	X	X
TCC101	Psychodidae	<i>Evandromyia infraspinoso</i>	Amazônia (RO)	EU021242	X
TCC103	Psychodidae	<i>Evandromyia infraspinoso</i>	Amazônia (RO)	EU021237	X
TCC120	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	Amazônia (RO)	EU021243	X
TCC339	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	Amazônia (RO)	EU021230	KP686217
TCC364	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	Amazônia (RO)	EF457295	KT765879
TCC365	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i> sp.	Amazônia (RO)	X	X
TCC367	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	Amazônia (RO)	X	X
TCC398	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Amazônia (RO)	EU021227	KT765880
TCC399	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	Amazônia (RO)	EU021233	X
TCC401	Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	Amazônia (RO)	X	X
TCC402	Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	Amazônia (RO)	X	X
TCC405	Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	Amazônia (RO)	X	X
TCC408	Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	Amazônia (RO)	KT765881	X
TCC887	Psychodidae	<i>Sciopemyia</i> sp.	Amazônia (RO)	EU021245	X
TCC888	Psychodidae	<i>Sciopemyia servulolimae</i>	Amazônia (RO)	EU021241	X
TCC1155	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	Amazônia (RO)	EU021244	X
TCC3074	Psychodidae	<i>Sciopemyia fluviatilis</i>	Amazônia (RO)	X	X
BSC707	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	Amazônia (RO)	X	X
BSC405	Hylidae	<i>Hypsiboas raniceps</i>	Pantanal (MT)	X	X
TSC250	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
BSC801	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Amazônia (RO)	X	X
BSC802	Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	Amazônia (RO)	X	X
AMAN80	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	Amazônia (RO)		X
RoAn72	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	Amazônia (RO)		X
RoAn78	Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	Amazônia (RO)		X
MTS82c2a	Hylidae	<i>Hypsiboas</i> sp.	Pantanal (MT)	X	
MTSA82c10a	Hylidae	<i>Hypsiboas</i> sp.	Pantanal (MT)	X	

809 * The samples in bold refer to this study; samples with “TCC” refer to PCR made from culture and
810 samples with “A” refer to PCR made from direct blood. X: amplified sequences.



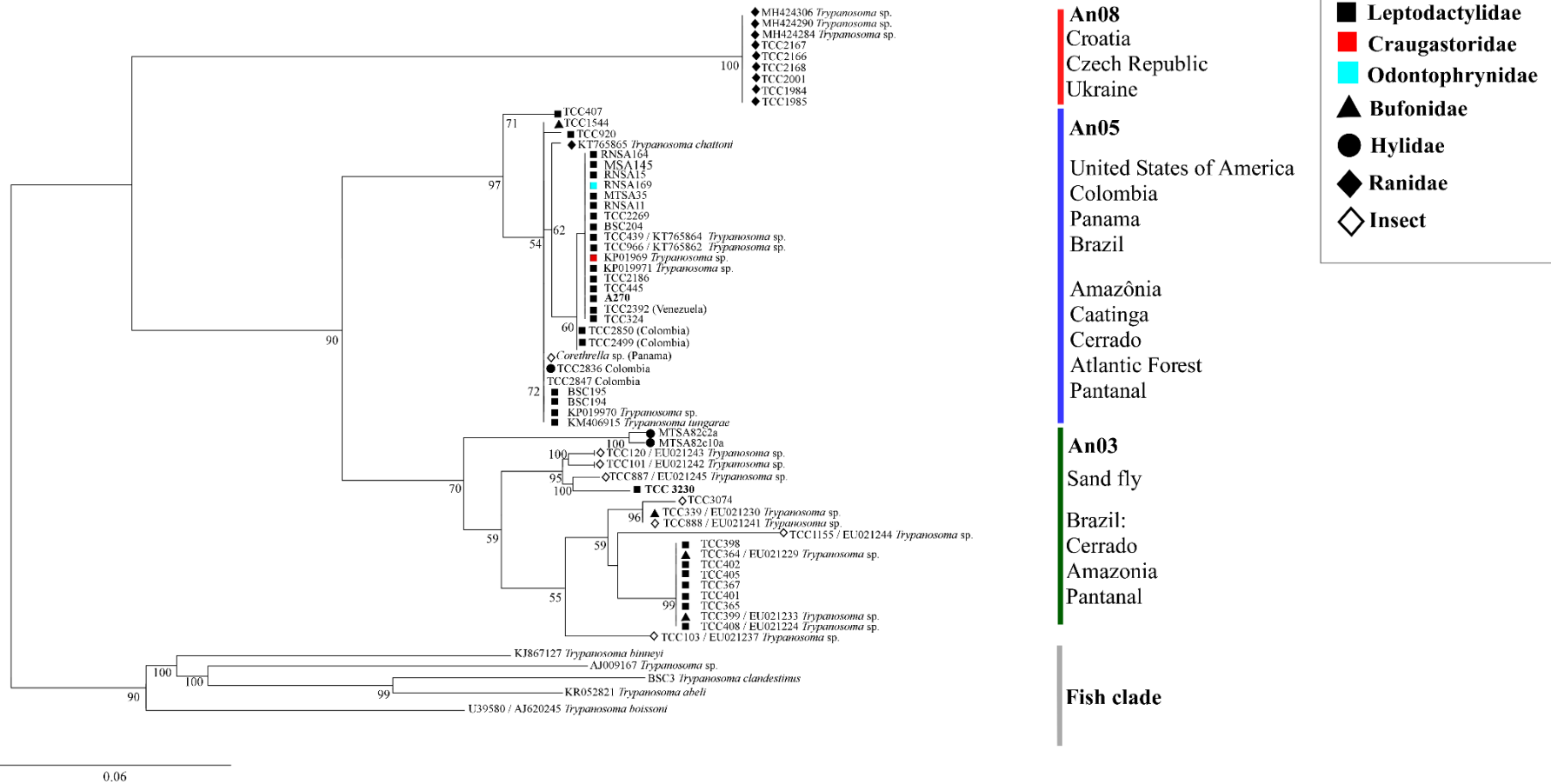
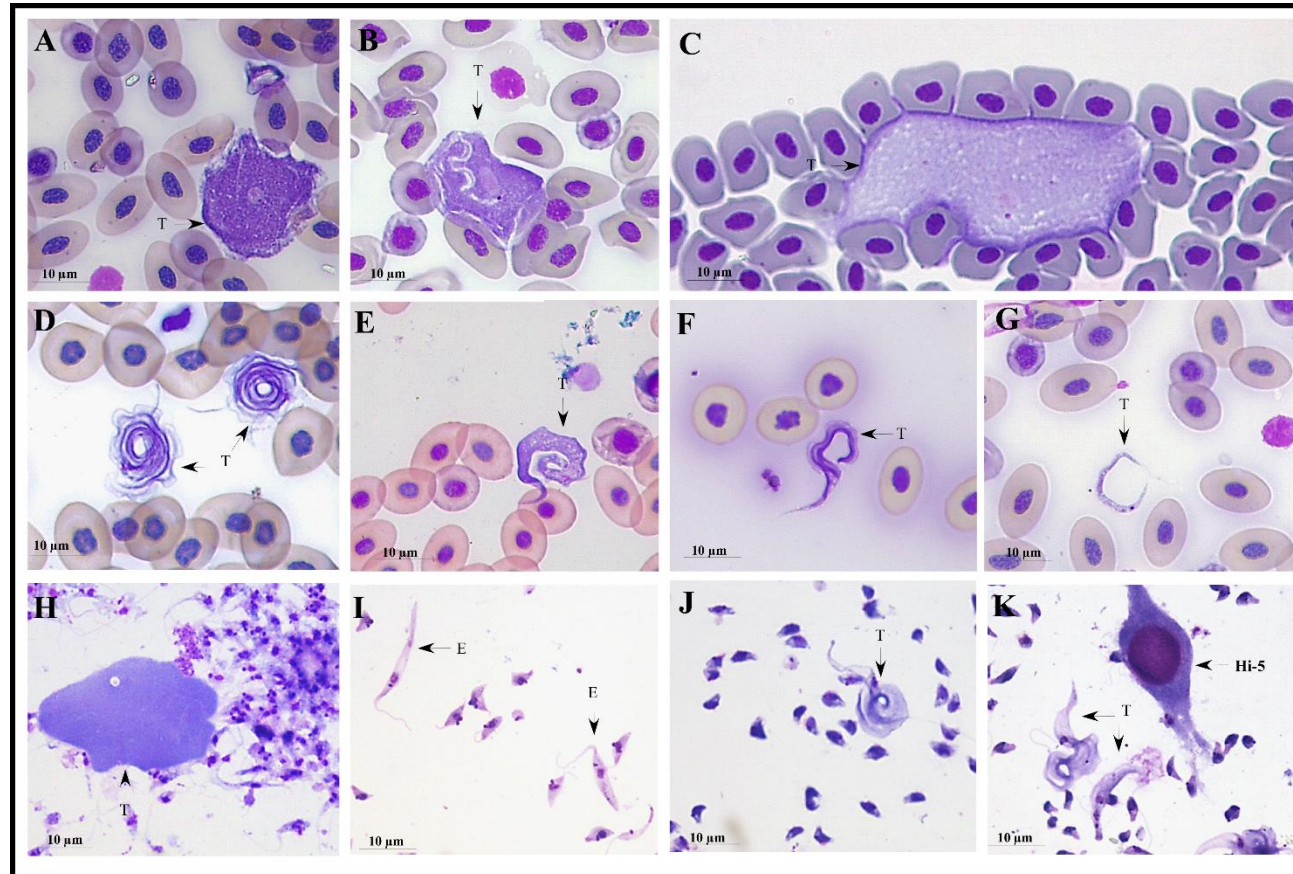


Figure 4. Phylogram of *Trypanosoma* isolates from anurans based on SSU rRNA gene. The topology trees with Maximum Likelihood method (ML) and Bayesian inference (BI) analyses were identical (represented by ML tree). The aquatic clade (Fish Clade) were used as an out-group.

824 **Table 5:** The shaded matrix (lower) shows the p-distance (pair-wise distance) and the non-shaded matrix (upper) shows the percentage of similarity of the nucleotide
825 sequences among the *Trypanosoma* isolates from An03 Clade, of which clustered with the gGAPDH sequences from this study.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1. TCC103		95.7%	95.7%	95.6%	94.9%	95.9%	96.1%	96.1%	96.2%	96.1%	96.1%	96.0%	96.0%	95.9%	95.9%	95.9%	95.4%	95.2%	95.2%
2. TCC101	0.08		100%	97.3%	97.2%	97.1%	97.8%	98.0%	98.3%	98.9%	97.8%	97.8%	97.8%	97.7%	97.8%	97.7%	96.8%	96.9%	96.9%
3. TCC120	0.08	0.00		97.3%	97.2%	97.7%	97.8%	98.0%	98.3%	98.9%	97.8%	97.8%	97.8%	97.7%	97.8%	97.7%	96.8%	96.9%	96.9%
4. TCC887	0.07	0.05	0.05		100%	98.7%	99.4%	99.4%	99.4%	98.2%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	98.2%	98.6%	98.6%
5. TSC250	0.07	0.05	0.05	0.00		98.6%	99.0%	99.0%	99.3%	98.6%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	98.3%
6. TCC3230	0.05	0.05	0.05	0.03	0.03		99.8%	99.8%	99.7%	98.9%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	98.6%	99.1%	99.1%
7. A270	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02		100%	100%	98.9%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.0%	99.5%	99.5%
8. A116	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00		100%	98.9%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.8%	99.0%	99.5%	99.5%
9. A82	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00		98.9%	99.1%	99.1%	98.9%	99.1%	99.1%	98.9%	98.2%	98.9%	98.9%
10. A271	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00		99.1%	99.1%	98.9%	99.1%	98.9%	98.9%	99.8%	99.2%	99.6%
11. A318	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00		100%	100%	100%	100%	100%	99.8%	100%	99.6%
12. A256	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		100%	100%	100%	100%	99.8%	100%	99.6%
13. A226	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		100%	100%	100%	99.8%	100%	99.6%
14. A119	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		100%	100%	99.8%	100%	99.6%
15. A22	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		100%	99.8%	100%	99.6%
16. A230	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		99.8%	100%	99.6%
17. A84	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		100%	99.6%
18. A12	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		99.6%
19. A204	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	



832

833 **Figure 5 (A-H):** Morphological analysis of the *Trypanosoma* spp. samples clustered in the An03 Clade. Developmental stages (arrow) in the
 834 peripheral blood of anurans (A-E) and in cell culture (TCC 3230) with Hi-5 (E-H). Scale: 10 and 20 micrometers. T: tripomastigote; E: epimastigote.
 835 Hi-5: Hi-5 cell.

836 **Table 6.** Sequences information from *Trypanosoma* spp. belonging to A, B and C clades.

Clade	Samples*	Host		Biome (State)	Sequences (GenBank)	
		Family	Species		SSU rRNA	gGAPDH
A	A144c3	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Cerrado (GO)		X
A	A241c4	Hylidae	<i>Scinax x-signatus</i>	Atlantic Forest (SP)		X
A	A243c2	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Atlantic Forest (SP)		X
A	A269c1	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Cerrado (MT)	X	X
A	A321c2	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Cerrado (GO)	X	X
B	A36c4	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)		X
B	A209c4	Hylidae	<i>Boana</i> sp.	Atlantic Forest (SP)	X	X
B	A226c4	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Atlantic Forest (SP)		X
B	A243c6	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Atlantic Forest (SP)		X
B	A248c4	Microhylidae	<i>Elachistocleis</i> sp.	Atlantic Forest (SP)		X
B	A304c2	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pustulatus</i>	Cerrado (MT)	X	X
B	TCC 3231	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Cerrado (MT)	X	X
B	TCC334	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC442 (PAAN114)	Hylidae	<i>Scinax ocreatus</i>	Pantanal (MT)	X	X
B	TCC448	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC457	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC465	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC614	Hylidae	<i>Osteocephalus taurinus</i>	Amazônia (AM)	X	X
B	TCC620	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Amazônia (MT)	X	X
B	TCC1820	Hylidae	<i>Osteocephalus taurinus</i>	Amazônia (AM)	X	X
B	TCC1821	Hylidae	<i>Osteocephalus taurinus</i>	Amazônia (AM)	X	X
B	TCC2231	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2232	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2233	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2234	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2235	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2236	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2239	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2243	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2245	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2246	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
B	TCC2250	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
C	A209c1	Hylidae	<i>Boana</i> sp.	Atlantic Forest (SP)	X	X
C	A219c1	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Atlantic Forest (SP)		X
C	A224c3	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Atlantic Forest (SP)		X
C	TCC2252	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Pantanal (MS)	X	X
C	TCC2379	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i> sp.	Venezuela	X	X

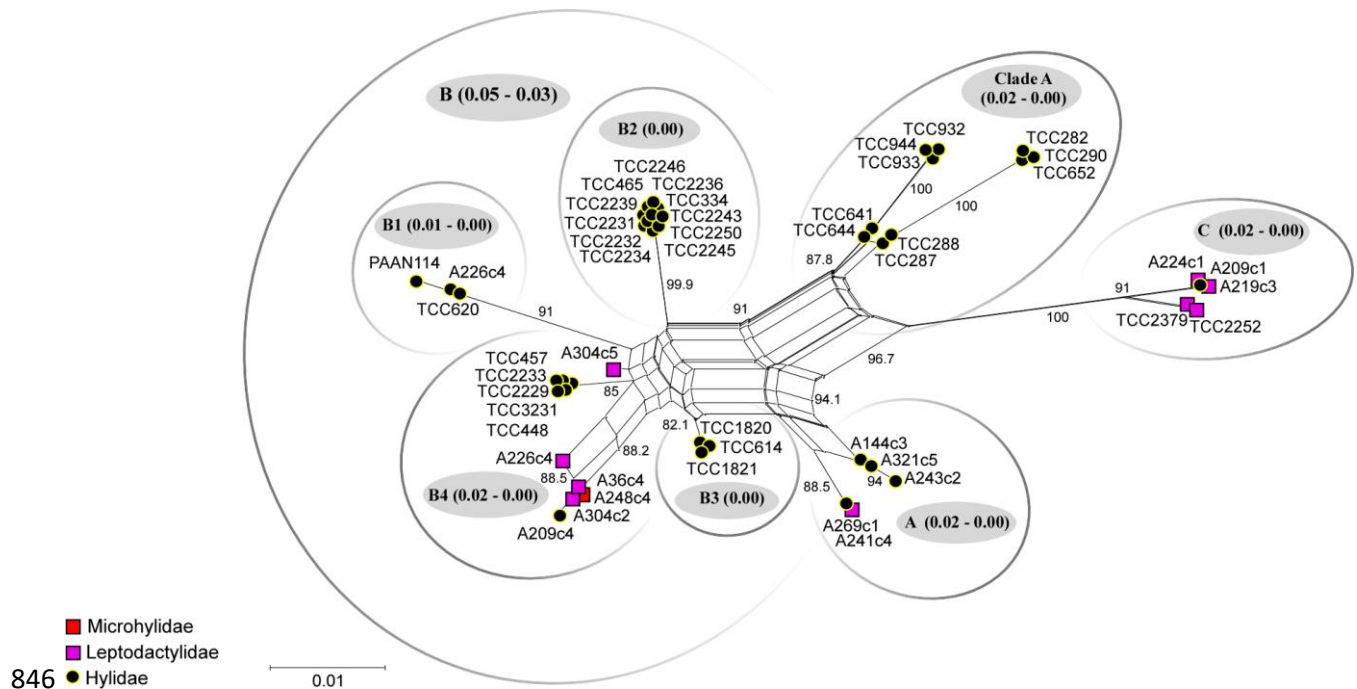
837 * The samples in bold refer to this study; samples with “TCC” refer to PCR made from culture and
838 samples with “A” refer to PCR made from direct blood. X: amplified sequences.

839

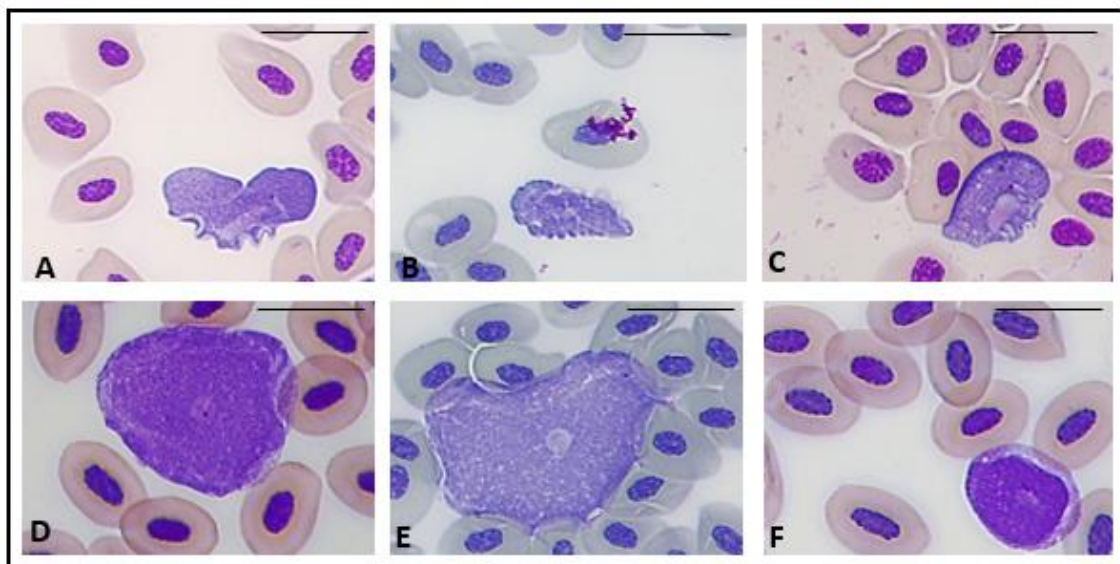
840



842



847 **Figure 7.** Evolutionary relationship among *Trypanosoma* isolates from anurans clustered
848 in the new clades A, B and C (from this study) and Clade A, based on gGAPDH gene.
849 Network phylogenetic analysis with support values estimate 500 replicates.



851 **Figure 8 (A-D):** Morphological analysis of the peripheral blood of anurans with
852 *Trypanosoma* spp. clustered in the A Clade. Scale: 20 micrometers
853

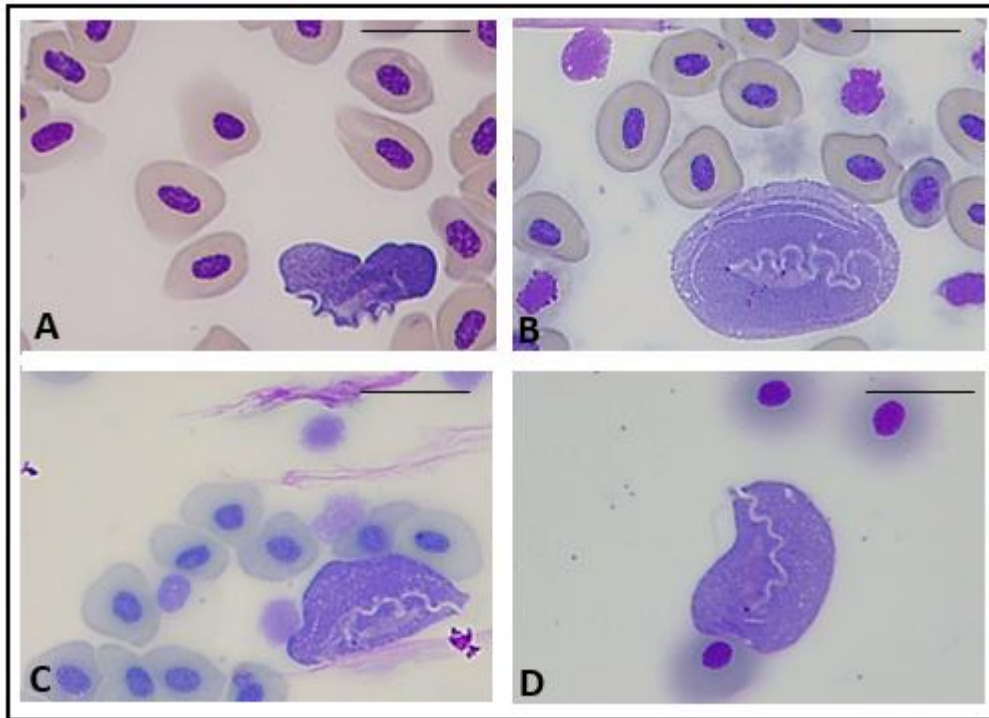


Figure 9 (A-D): Morphological analysis of the peripheral blood of anurans with *Trypanosoma* spp. clustered in the B Clade. Scale: 20 micrometers

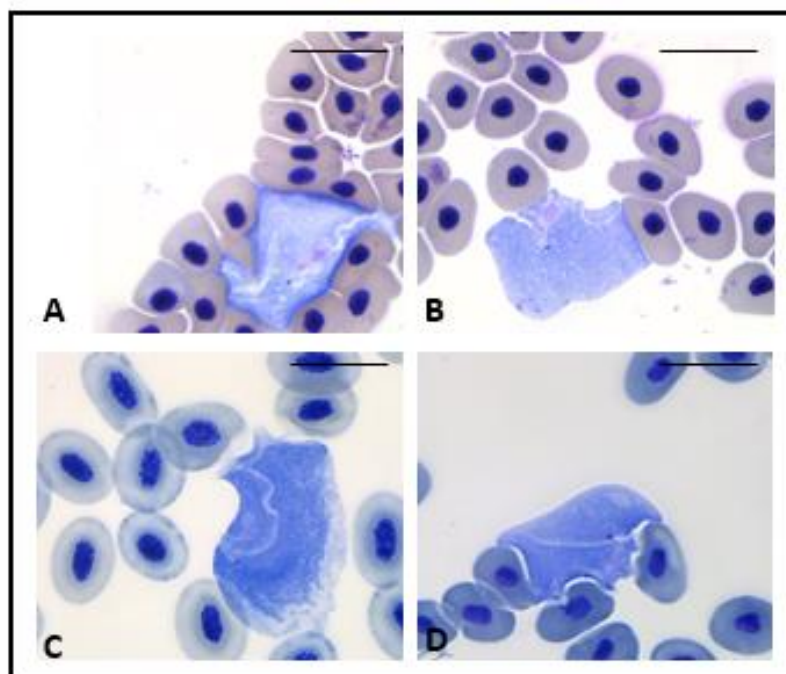


Figure 10 (A-C): Morphological analysis of the peripheral blood of anurans with *Trypanosoma* spp. clustered in the C Clade. Scale: 20 micrometers.

862 **Table 7.** Sequences information from *Trypanosoma* spp. belonging to Clades D and An01.

Clades	Samples*	Host		Biome (State)	Sequences (GenBank)	
		Family	Species		SSU rRNA	gGAPDH
D, An01	TCC3226	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Cerrado(GO)	X	X
D	TCC3228	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)	X	X
D	TCC3232	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)	X	X
D	TCC3233	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	Cerrado (MT)	X	X
D, An01	A12	Hylidae	<i>Scinax fuscovarius</i>	Cerrado (MT)	X	X
D	A24	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)	X	X
D	A36	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)		X
D	A58	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MT)		X
D	A76	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Cerrado (MT)		X
D	A83	Hylidae	<i>Pseudis platensis</i>	Cerrado (MS)		X
D, An01	A85	Hylidae	<i>Pseudis platensis</i>	Cerrado (MS)		X
D	A87	Hylidae	<i>Boana cf. raniceps</i>	Cerrado (MS)		X
D	A116	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	Cerrado (MT)		X
D	A119	Hylidae	<i>Pseudis platensis</i>	Cerrado (MT)		X
D	A130	Hylidae	<i>Boana cf. raniceps</i>	Cerrado (MT)		X
D	A204	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
D, An01	A209	Hylidae	<i>Boana</i> sp.	Atlantic Forest (SP)	X	X
D, An01	A241	Hylidae	<i>Scinax x-signatus</i>	Atlantic Forest (SP)		X
D	A243	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Atlantic Forest (SP)		X
D, An01	A248	Microhylidae	<i>Elachistocleis</i> sp.	Atlantic Forest (SP)		X
D	A249	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Atlantic Forest (SP)		X
D	A257	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MS)		X
D	A302	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pustulatus</i>	Cerrado (MT)		X
D	A305	Hylidae	<i>Scinax fuscovarius</i>	Cerrado (MT)	X	X
D	TCC645	Hylidae	<i>Scinax havi</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
D	TCC653	Hylidae	<i>Boana bischoffi</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
D	RNSA15c3	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Caatinga (RN)	X	X
D	PAAN98c5	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC3229	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MS)	X	X
An01	TCC3227	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Cerrado (MS)	X	X
An01	A86	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Cerrado (MS)		X
An01	TCC291	Hylidae	<i>Boana bischoffi</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
An01	TCC304	Hylidae	<i>Boana punctata</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC305	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC313	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC315	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	EU267074	X
An01	TCC317	Leptidactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC321	Hylidae	<i>Scinax acuminatus</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC327	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC358	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i> sp.	Amazônia (RO)	EU021235	KT765869
An01	TCC400	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i> sp.	Amazônia (RO)	X	X
An01	TCC406	Hylidae	<i>Scinax ruber</i>	Amazônia (RO)	EU267075	X
An01	TCC436	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Pantanal (MS)	X	X

An01	TCC442	Hylidae	<i>Scinax acuminatus</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC444	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	Pantanal (MS)	EU021225	KT765866
An01	TCC467	Leptodactylidae	<i>Boana raniceps</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC612	Hylidae	<i>Boana geographica</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC613	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC615	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC617	Hylidae	<i>Boana boans</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC618	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC619	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC622	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Amazônia (MT)	X	X
An01	TCC646	Hylidae	<i>Aplatodiscus leucopygius</i>	Atlantic Forest (SP)	EU021234	KT765868
An01	TCC647	Hylidae	<i>Boana albomarginata</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
An01	TCC660	Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	Atlantic Forest (SP)	EU267075	X
An01	TCC928	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	Cerrado (SP)	X	X
An01	TCC939	Hylidae	<i>Boana bischoffi</i>	Atlantic Forest (SP)	X	X
An01	TCC2169	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Pantanal (MT)	X	X
An01	TCC2174	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i>	Pantanal (MT)	X	X
An01	TCC2241	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC2242	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC2244	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC2249	Hylidae	<i>Boana raniceps</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC2251	Hylidae	<i>Trachycephalus typhonius</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC2252	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i>	Pantanal (MS)	X	X
An01	TCC2263	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Caatinga (RN)	X	X
An01	TCC2270	Hylidae	<i>Boana</i> sp.	Caatinga (RN)	X	X
An01	TCC2373	Hylidae	<i>Boana crepitans</i>	Venezuela	X	X
An01	TCC2497	Hylidae	<i>Dendropsophus</i> sp.	Colombia	X	X
An01	TCC2620	Hylidae	-----	Venezuela	X	X
An01	TCC2638	Hylidae	<i>Boana</i> sp.	Venezuela	X	X
An01	TCC2810	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	Colombia	X	X
An01	TCC2830	Bufonidae	<i>Rhinella</i> sp.	Colombia	X	X
An01	TCC2831	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i> sp.	Colombia	X	X
An01	TCC2834	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	Colombia	X	X
An01	TCC2835	Bufonidae	<i>Rhinella marina</i>	Colombia	X	X
An01	TCC2837	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i> sp.	Colombia	X	X
An01	TCC2911	Hylidae	-----	Amazônia (AM)	X	X

* The samples in bold refer to this study; samples with “TCC” refer to PCR made from culture and samples with “A” refer to PCR made from direct blood. X: amplified sequences.

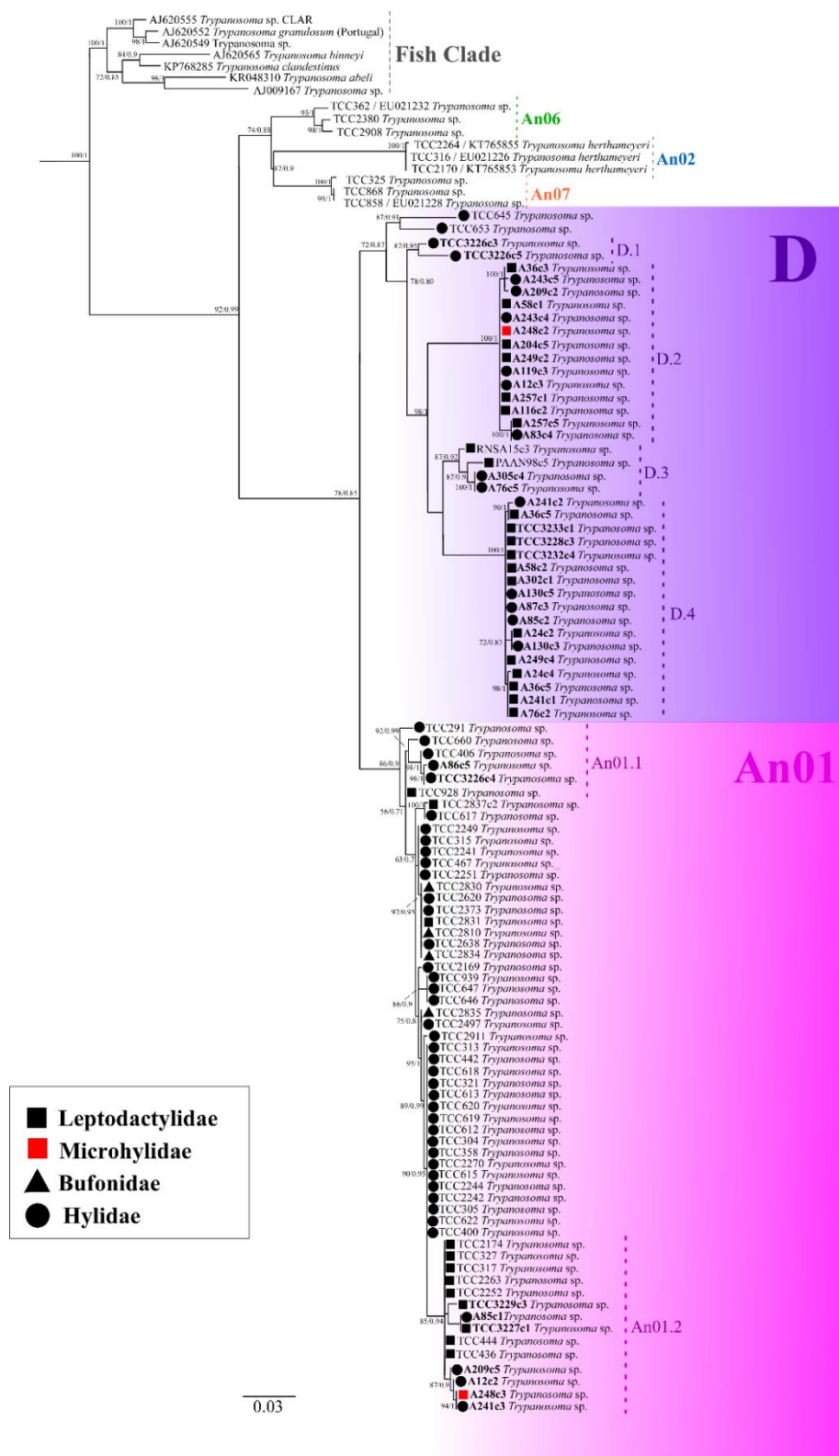


Figure 11. Consensus phylogram of *Trypanosoma* isolates from anurans based on gGAPDH gene. The topology trees with Maximum Likelihood method (ML) and Bayesian inference (BI) analyses were identical (represented by ML tree). The Fish Clade was used as an out-group.

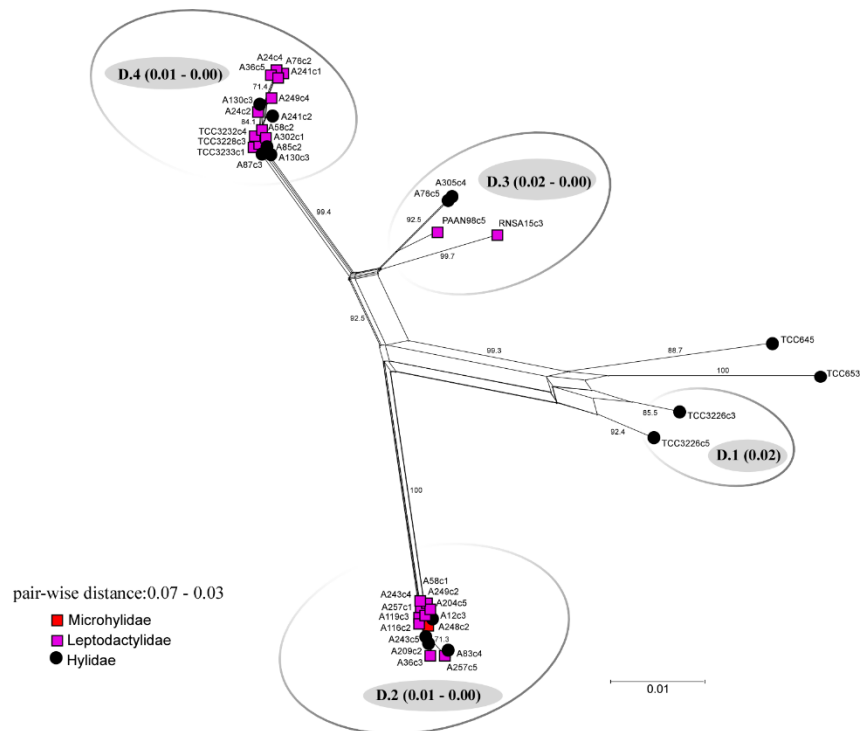


Table 12. Evolutionary relationship among *Trypanosoma* isolates from anurans clustered in the D Clade, based on gGAPDH gene. Network phylogenetic analysis with support values estimate 500 replicates.

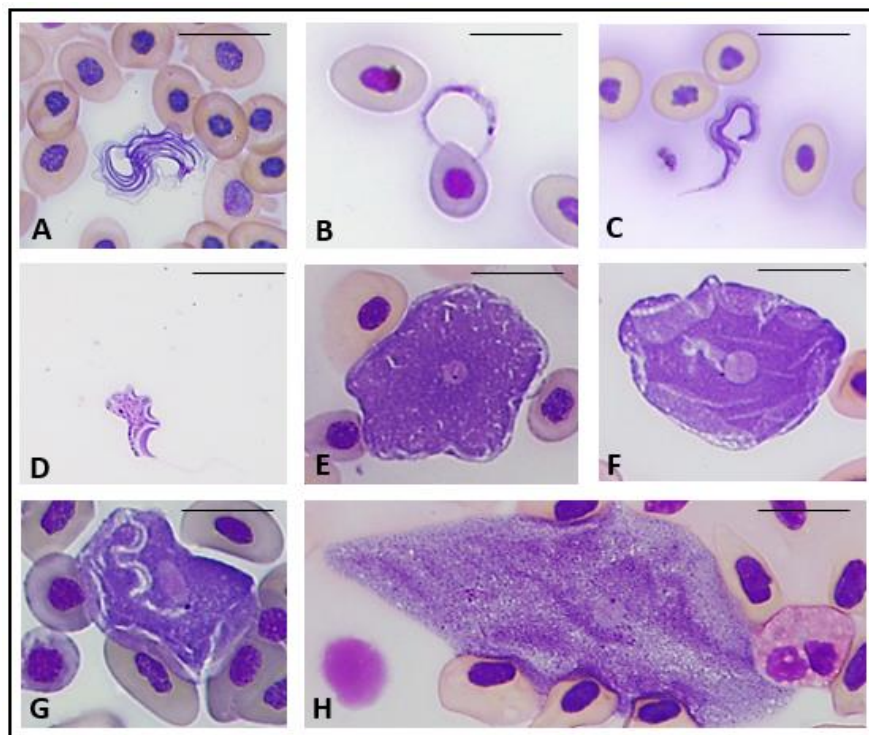


Figure 13 (A-K). Morphological analysis of the peripheral blood of anurans with *Trypanosoma* spp. clustered in the D Clade. Scale: 20 micrometers.

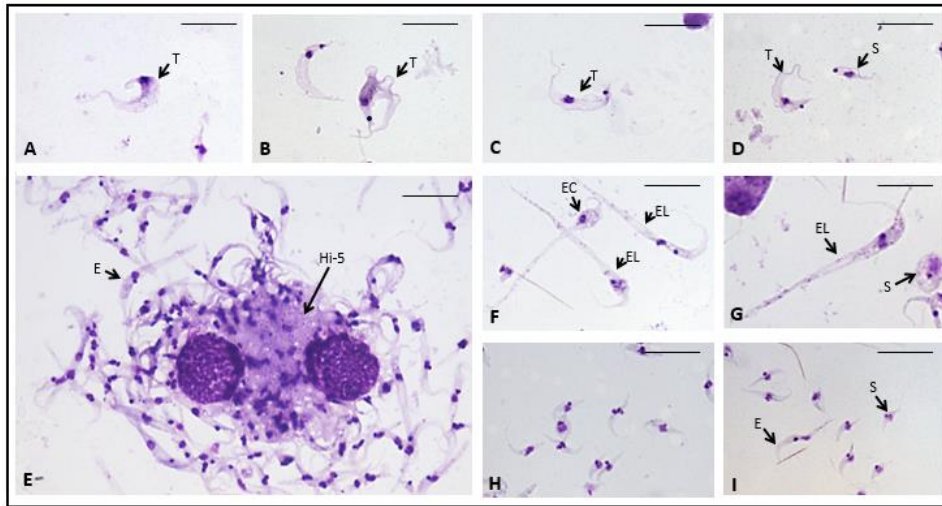


Figure 14 (A - I). Morphological analysis of the *Trypanosoma* spp. developmental stages from TCC 3226 hemoculture with Hi-5 cells. Scale: 10 micrometers. A – D) Trypomastigotes from morphology 1 (M1). E – G) Epimastigotes and spheromastigotes from morphology 2 (M2). H, I) Epimastigotes and spheromastigotes from morphology 3 (M3). T: tripomastigote; E: epimastigote. EL: large epimastigote. EC: coin-shaped epimastigote. S: spheromastigote. Hi-5: Hi-5 cell.

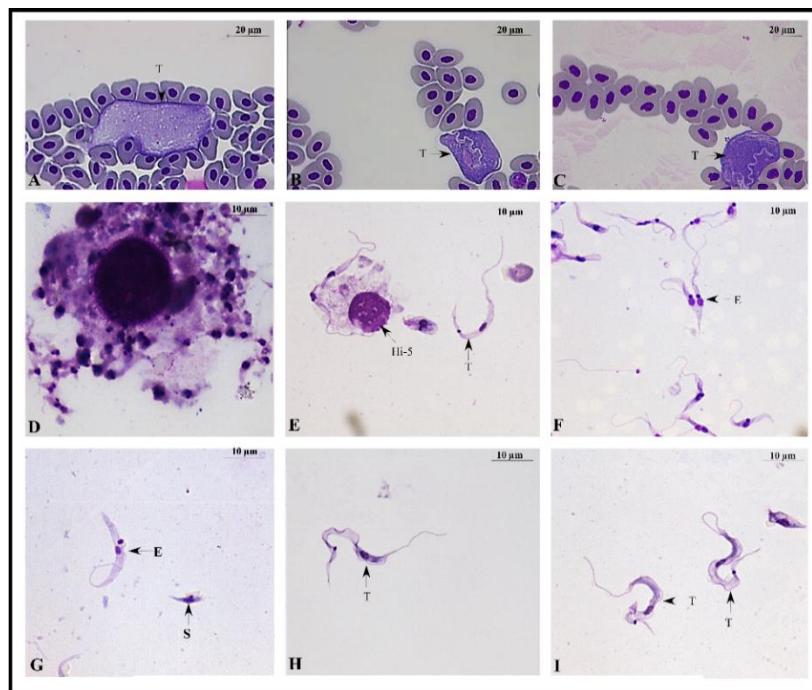
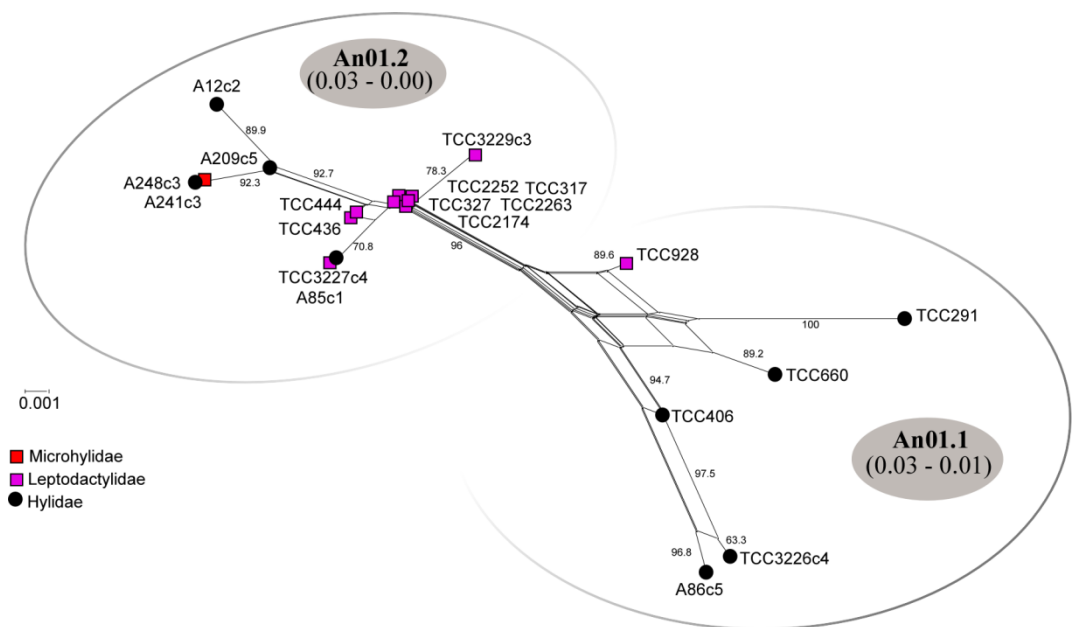


Figure 15 (A-H). Morphological analysis of the *Trypanosoma* spp. samples clustered in the D Clade. Developmental stages (arrow) in the peripheral blood of anurans (A-C) and in cell culture (TCC 3228) with Hi-5 (D-I). Scale: 10 and 20 micrometers. T: tripomastigote; E: epimastigote. S: spheromastigote. Hi-5: Hi-5 cell.

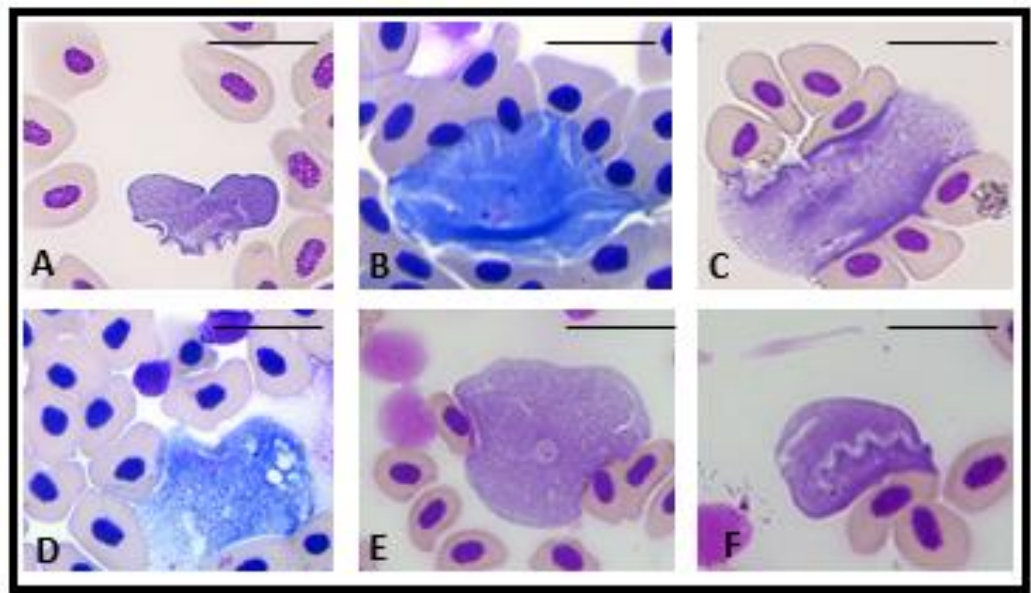
894



895

896 **Table 9.** Evolutionary relationship among *Trypanosoma* isolates from anurans clustered
897 in the An01 Clade, based on gGAPDH gene. Network phylogenetic analysis with support
898 values estimate 500 replicates.

899



900

901 **Figure 16 (A-I).** Morphological analysis of the peripheral blood of anurans with
902 *Trypanosoma* spp. clustered in the An01 Clade. Scale: 20 micrometers

903

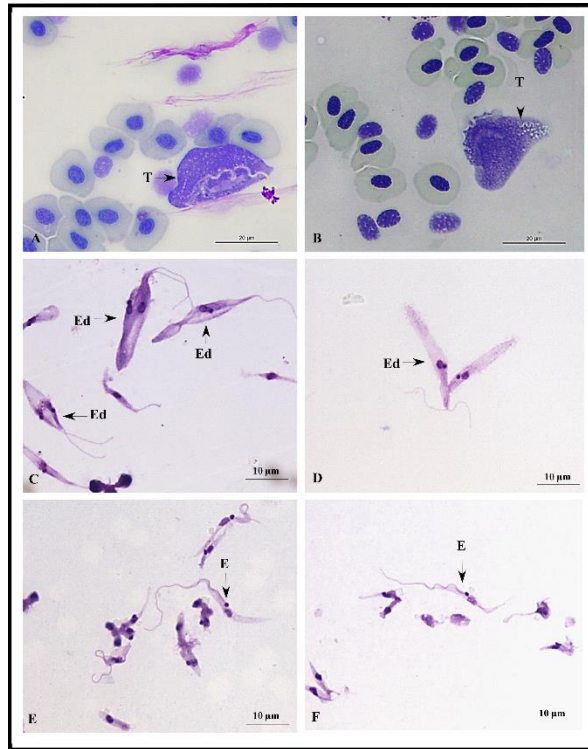


Figure 17 (A-F). Morphological analysis of the *Trypanosoma* spp. samples clustered in the An01.2 subclade. Developmental stages (arrow) in the peripheral blood of anurans (A and B) and in cell culture (TCC 3227) with Hi-5 (C-F). Scale: 10 and 20 micrometers. E: epimastigote. Ed: epimastigote in division. Hi-5: Hi-5 cell.

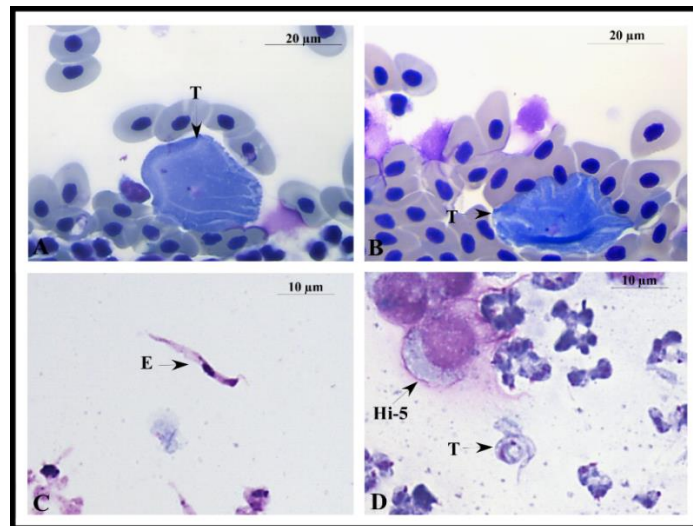


Figure 18 (A-F). Morphological analysis of the *Trypanosoma* spp. samples clustered in the An01.2 subclade. Developmental stages (arrow) in the peripheral blood of anurans (A and B) and in cell culture (TCC 3229) with Hi-5 (C-F). Scale: 10 and 20 micrometers. E: epimastigote. Ed: epimastigote in division. Hi-5: Hi-5 cell.

Capítulo 4

Capítulo 4

A new species, *Dactylosoma piperis* n. sp. (Apicomplexa, Dactylosomatidae), from the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae) from Mato Grosso State, Brazil.

Manuscrito publicado na revista *Parasite*

Autores: **Leticia Pereira Úngari**, Edward Charles Netherlands, André Luiz Quagliatto Santos, Edna Paulino de Alcantara, Enzo Emmerich, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari LP, Netherlands EC, Quagliatto Santos AL, de Alcantara EP, Emmerich E, da Silva RJ & O'Dwyer LH. 2020. A new species, *Dactylosoma piperis* n. sp. (Apicomplexa, Dactylosomatidae), from the pepper frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae) from Mato Grosso State, Brazil. *Parasite* **27**, 73. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020070>

Capítulo 5

Capítulo 5

New insights on the diversity of Brazilian anuran blood parasites: With the description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) from Leptodactylidae anurans

Manuscrito publicado na revista *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Edward Charles Netherlands, André Luiz Quagliatto Santos, Edna Paulino de Alcantara, Enzo Emmerich, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari, L.P.; Netherlands, E.C.; Santos, A.L.Q.; Alcantara, E.P.; Emmerich, E.; da Silva, R.J.; O'Dwyer, L.H. New insights on the diversity of Brazilian anuran blood parasites: With the description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Hepatozoidae) from Leptodactylidae anurans. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **14**, 190-201 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.02.009>.

Capítulo 6

Capítulo 6

Description of a New Species *Hepatozoon quagliattus* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting the Sleep Snake, *Dipsas mikanii* (Squamata: Colubridae: Dipsadinae) from Goiás State, Brazil

Manuscrito publicado na revista *Acta Parasitologica*

Autores: **Leticia Pereira Úngari**, Edward Charles Netherlands, André Luiz Quagliatto Santos, Edna Paulino de Alcantara, Enzo Emmerich, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari, L.P., Netherlands, E.C., de Alcantara, E.P. *et al.* Description of a New Species *Hepatozoon quagliattus* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting the Sleep Snake, *Dipsas mikanii* (Squamata: Colubridae: Dipsadinae) from Goiás State, Brazil. *Acta Parasit.* **66**, 871–880 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00355-x>.

Capítulo 7

Capítulo 7

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)

Manuscrito publicado na revista *Parasitology International*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Edward Charles Netherlands, André Luiz Quagliatto Santos, Edna Paulino de Alcantara, Enzo Emmerich, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari, L.P.; Netherlands, E.C.; Santos, A.L.Q.; Alcantara, E.P.; Emmerich, E.; da Silva, R.J.; O'Dwyer, L.H. 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) *Parasitol. Int.* **89**, 102587 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102587>.

Capítulo 8

Capítulo 8

Diversity of Haemogregarine Parasites Infecting Brazilian Anurans, with a Description of New Species of *Dactylosoma* (Apicomplexa: Adeleorina: *Dactylosomatidae*)

Manuscrito publicado na revista *Acta Parasitologica*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Edward Charles Netherlands, André Luiz Quagliatto Santos, Edna Paulino de Alcantara, Enzo Emmerich, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari, L.P., Netherlands, E.C., Santos, A.L.Q. *et al.* Diversity of Haemogregarine Parasites Infecting Brazilian Anurans, with a Description of New Species of *Dactylosoma* (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae). *Acta Parasit.* **67**, 1740–1755 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00624-3>.

Capítulo 9

Capítulo 9

Hemogregarine diversity infecting Brazilian turtles with a description of six new species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae).

Manuscrito publicado na revista *Diversity*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, André Luiz Quagliatto Santos, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari, L.P.; Santos, A.L.Q.; da Silva, R.J.; O'Dwyer, L.H. Hemogregarine Diversity Infecting Brazilian Turtles with a Description of Six New Species of *Haemogregarina* (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae). *Diversity* 2023, 15, 296. <https://doi.org/10.3390/d15020296>.

Conclusão

.....

Conclusão

De acordo com as análises executadas no Doutorado, foi possível observar grande diversidade de hemoparasitos acometendo a herpetofauna das regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Esse resultado reforça a necessidade de mais estudos sobre esses hemoparasitos, sendo a taxonomia prioritária nesse quesito, com a identificação e descrição dessa diversidade de parasitos. Sendo assim, foi possível identificar:

- Tripanossomas acometendo anfíbios com descrições futuras de possíveis novas espécies;
- Primeiro registro de infecção por *Trypanosoma* sp. em oito anuros: *Boana caiapó*, *B. lundii*, *Dendropsophus* aff. *microcephalus*, *D. anataliasiasi*, *Pseudis platensis*, *Scinax x-signatus*, *Leptodactylus petersii* e *L. pustulatus*.
- Três novas espécies de *Hepatozoon* observadas em anuros brasileiros;
- Duas novas espécies de *Dactylosoma* observadas em anuros brasileiros; sendo este estudo, o primeiro relato com caracterização molecular de nova espécie de *Dactylosoma* no Brasil.
- Três novas espécies de *Hepatozoon* acometendo serpentes brasileiras. Além da identificação de *Hepatozoon cevapii* e *Hepatozoon cuestensis* em serpentes brasileiras desse estudo;
- Primeiro relato de hemogregarina infectando a serpente *Dipsas mikanii*, com a descrição de uma nova espécie de *Hepatozoon*, *Hepatozoon quagliattus*;
- Três possíveis novas espécies de *Hepatozoon* em crocodilianos da espécie *Caiman crocodilus*;
- Seis novas espécies de *Haemogregarina* em testudines das espécies *Podocnemis uniflis* e *Podocnemis expansa*;
- Sanguessugas consideradas possíveis vetores na transmissão de haemogregarinas em testudines brasileiros, com a identificação da mesma como nova espécie.

Anexos

.....

Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Sorocaba



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Biodiversidade de hemoparasitos associados a anfíbios e répteis das regiões centro-oeste e sudeste brasileiras", Protocolo nº **1061-CEUA**, sob a responsabilidade de **Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 01/03/2018	Término: 01/02/2021
Espécie/linhagem:	<i>Lagartos, serpentes, crocodilos, répteis.</i>	
Nº de animais:	250	
Peso:	<i>variados</i>	Idade: variados
Sexo:	<i>Macho e fêmea</i>	
Origem	<i>Serão coletados animais em cinco locais distribuídos entre os Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo.</i>	

Botucatu, 2 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimmini
Presidente da CEUA



Anexo 2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 61940-2	Data da Emissão: 31/01/2019 10:20:47	Data da Revalidação*: 31/01/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Letícia Pereira Úngari	CPF: 387.011.818-07
Nome da Instituição: INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - UNESP	CNPJ: 48.031.918/0022-59

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Redação de relatórios	04/2020	12/2020
2	Coleta anfíbios e répteis	04/2018	04/2020
3	Análise morfológica e morfométrica	09/2018	04/2020
4	Identificação espécies de hemoparasitos	02/2019	04/2020
5	Redação de artigos	09/2019	12/2020
6	Escrita do Projeto e submissão CEUA, SISBIO e FAPESP	02/2018	04/2018
7	Análise estatística	09/2019	09/2020
8	Análise histopatológica	09/2018	04/2020
9	Armazenamento amostras e identificação ectoparasitos	04/2018	04/2020
10	Análise molecular	09/2018	04/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Lucia Helena O'Dwyer de Oliveira	Orientadora/Coordenadora	832.357.957-15	Brasileira

Anexo 3



ACORDO DE COLABORAÇÃO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Eu, Marta Maria Geraldtes Teixeira, professora titular da Universidade de São Paulo (USP – São Paulo), Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia; em contato com a profa. Adjunta. Lucia Helena O'Dwyer, e sua respectiva aluna de doutorado Msc. Letícia Pereira Úngari, procedentes da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Botucatu), firmamos parceria para desenvolvimento de parte do projeto de doutorado da discente intitulado “Biodiversidade de hemoparasitos associados a anfíbios e répteis das regiões Centro-Oeste e Sudeste Brasileiras”, Processo Nº 2018/00754-9.

Assim, por meio desse documento, confirmo interesse mútuo e aceito que a doutoranda Letícia Pereira Úngari execute toda a parte molecular de tripanossomas em répteis e anfíbios em meu laboratório, sob minha supervisão e auxílio.

O foco desse estágio e parceria será a execução do isolamento em cultura, PCR, clonagem e sequenciamento de *Trypanosoma* spp. de répteis e anfíbios, previamente diagnosticados positivos pela análise morfológica. O cronograma de execução se iniciará em março, após a doutoranda ter executado todas as coletas de animais para seu projeto.

Acredito que será uma oportunidade única para a discente aprender algumas técnicas e aprimorar outras nesse período de estágio e propiciará uma troca de conhecimentos muito enriquecedora entre Letícia e meus orientandos.

Profa Dra. Marta Maria Geraldtes Teixeira

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8067345143353691> (mmgteix@icb.usp.br)

São Paulo, SP, novembro de 2019

Anexo 4



DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA

Certificate

June, 2022

To whom it may correspond,

This is to declare that I have received the Phd student Leticia Pereira Úngari from the Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, SP, Brazil during a three weeks internship in June of 2022 to develop a research related with the identification and description of a potential new species of ectoparasites (leech) parasite of Brazilian chelonids, which is considered as a possible vector for haemogregarine parasites.

During her internship, it was possible to conduct the morphological and morphometric analysis of the leech, the scanning electron microscopy (SEM) and the molecular data targeting the genes mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI), nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit I (ND1), 12S rDNA (12S) and the nuclear 18S rDNA (18S).

The Phd. student was learned how to fix newly collected specimens and the basic information to identify hirudineans.

Please do not hesitate to contact me should you require additional information regarding anything in this letter.

Dr. Alejandro Ocegüera Figueroa
Curador Colección Nacional de Helmintos
aocegüera@ib.unam.mx
Cel. 044 55 39 90 86 54

Anexos (outros artigos)

.....

Artigo 1

A new myxozoan species *Henneguya unitaeniata* sp. nov. (Cnidaria: Myxosporea) on gills of *Hoplerythrinus unitaeniatus* from Mato Grosso State, Brazil

Manuscrito publicado na revista ***Parasitology Research***

Autores: **Leticia Pereira Úngari**, Diego Henrique Mirandola Dias Vieira, Reinaldo José da Silva, André Luiz Quagliatto Santos, Rodney Koslowiski de Azevedo, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari LP, Vieira DHMD, da Silva RJ, Santos ALQ, de Azevedo RK, O'Dwyer LH. A new myxozoan species *Henneguya unitaeniata* sp. nov. (Cnidaria: Myxosporea) on gills of *Hoplerythrinus unitaeniatus* from Mato Grosso State, Brazil. *Parasitol Res.* 2019 Dec;118(12):3327-3336. Doi: 10.1007/s00436-019-06533-1. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31728724.

Artigo 2

**Description of a new species of myxobolid parasite, *Henneguya pindaibensis* n. sp.
(Cnidaria: Myxosporea), infecting the gills of *Boulengerella cuvieri* (Spix and
Agassiz, 1829) from Brazil**

Manuscrito publicado na revista *Parasitology International*

Autores: **Letícia Pereira Úngari**, Diego Henrique Mirandola Dias Vieira, Edna Paulino de Alcantara, Enzo Emmerich, André Luiz Quagliatto Santos, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari LP, Vieira DHMD, de Alcantara EP, Emmerich E, Santos ALQ, da Silva RJ, O'Dwyer LH. Description of a new species of myxobolid parasite, *Henneguya pindaibensis* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), infecting the gills of *Boulengerella cuvieri* (Spix and Agassiz, 1829) from Brazil. *Parasitol Int.* 2021 Aug; 83:102319. Doi: 10.1016/j.parint.2021.102319. Epub 2021 Mar 6. PMID: 33689827.

Artigo 3

***Myxobolus* spp. (Cnidaria: Myxobolidae) in the circulating blood of fishes from Goiás and Mato Grosso States, Brazil: case report**

Manuscrito publicado na revista ***Brazilian Journal of Biology***

Autores: **Leticia Pereira Úngari**, Diego Henrique Mirandola Dias Vieira, André Luiz Quagliatto Santos, Reinaldo José da Silva, Lucia Helena O'Dwyer

Citação

Úngari LP, Vieira DHMD, Santos ALQ, Silva RJD, O'Dwyer LH. *Myxobolus* spp. (Cnidaria: Myxobolidae) in the circulating blood of fishes from Goiás and Mato Grosso States, Brazil: case report. *Braz J Biol.* 2021 Jun 11; 82: e242823. Doi: 10.1590/1519-6984.242823. PMID: 34133567.