



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM LAGARTOS DO GÊNERO
***TROPIDURUS* (SQUAMATA: TROPIDURIDAE) NO CERRADO BRASILEIRO**

LUMA VIEIRA SOBRINHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA – DF
SETEMBRO DE 2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM LAGARTOS DO GÊNERO
***TROPIDURUS* (SQUAMATA: TROPIDURIDAE) NO CERRADO BRASILEIRO**

LUMA VIEIRA SOBRINHO

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 259/22

Brasília – DF
Setembro de 2022

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM LAGARTOS DO GÊNERO
TROPIDURUS (SQUAMATA: TROPIDURIDAE) NO CERRADO BRASILEIRO**

LUMA VIEIRA SOBRINHO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS ANIMAIS.

APROVADA POR:

**GIANE REGINA PALUDO, Doutora (UNB)
(ORIENTADORA)**

**LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRIANO, Doutora (UNB)
(EXAMINADORA INTERNA)**

**MÁRCIA PAULA OLIVEIRA FARIAS, Doutora (UFPI)
(EXAMINADORA EXTERNA)**

Brasília/DF, 29 de SETEMBRO de 2022

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOBRINHO, L. V. **Pesquisa de tripanossomatídeos em lagartos do gênero *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) no cerrado brasileiro.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 52 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SOBRINHO, L. V. **Pesquisa de tripanossomatídeos em lagartos do gênero *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) no cerrado brasileiro.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2022. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2022.

1. *Tropidurus oreadicus* 2. *Tropidurus semitaeniatus* 3. *Tropidurus itambere* 4. *Trypanosoma* sp. 5. Cerrado

Dedico este trabalho a minha mãe, Luzia Maria da
Conceição (*in memoriam*), por todo amor, cuidado,
incentivo, por sempre acreditar em mim e me ensinar a
nunca desistir dos meus objetivos. Um exemplo de mulher,
amiga e mãe. Te levo comigo a cada passo que eu der.
Respiro saudades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha companheira, parceira de vida Glenda. Por ter sido meu porto seguro durante toda essa caminhada, por sempre acreditar em mim, mesmo quando nem eu acreditava. Em dias cansativos e difíceis nunca saiu do meu lado, sempre me lembrando que eu não estava sozinha e que tudo ia dar certo. Obrigada por tanto.

A minha família, em especial as minhas irmãs Luciene e Luana, que estão sempre na torcida, vibrando por cada conquista. Ao meu pai, pelo seu esforço para que eu tivesse a oportunidade de estudar, pelo amor que sinto ter por mim.

À minha orientadora, Giane Regina Paludo, por todo suporte, orientação e paciência durante essa trajetória.

À Adriana e Izabele, pelo suporte, apoio e energias positivas de que tudo ia dar certo.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica, em especial a Marcela, Marina, Gabriela e Julia por toda ajuda.

Aos amigos Fernanda, Alline, Raianna, Kayra e Leôncio por sempre estarem comigo. Aos amigos que fiz em Brasília, Thais, Talita, George, Janaina, Sandy e Stephanie, e que levarei para a vida toda.

Aos meus amigos do CVET, em especial a Marlete, Uex e Marcelo, pelas risadas, pelos momentos de descontração em dias difíceis, pelas conversas e todo apoio.

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

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XII
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 Objetivos específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Gênero <i>Tropidurus</i>	16
3.2 Família <i>Trypanosomatidae</i>	17
3.3 <i>Trypanossoma</i> sp.	19
3.3.1 <i>Trypanossoma</i> sp. em répteis.....	21
3.4 <i>Leishmania</i> spp.	23
3.4.1 <i>Leishmania</i> spp. em répteis	24
3.5 Métodos utilizados para detecção de tripanossomatídeos	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2 – PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM LAGARTOS DO GÊNERO <i>TROPIDURUS</i> (SQUAMATA: TROPIDURIDAE) NO CERRADO BRASILEIRO	34
1 RESUMO	35
2 ABSTRACT	36
3 INTRODUÇÃO.....	37
4 MATERIAIS E METODOS.....	38
4.1 Amostras	38
4.2 Análises moleculares	39
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

Tripanossomatídeos são protozoários flagelados, unicelulares, apresentam distribuição mundial e são capazes de parasitar várias espécies de animais, inclusive o homem. Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* vem sendo descritos em répteis, incluindo lagartos. No Cerrado, estima-se que 241 espécies de lagartos participem da herpetofauna, ocupando a segunda posição do bioma mais rico em lagartos no Brasil. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em amostras de sangue de lagartos do gênero *Tropidurus* utilizando técnicas moleculares de *Nested* PCR e pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. Foram testadas 81 amostras de sangue de lagartos do gênero *Tropidurus*, distribuídos em 3 espécies: *T. oreadicus*, *T. semitaeniatus* e *T. itambere*, do banco de amostras de DNA e de esfregaços sanguíneos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. As amostras eram provenientes de duas regiões do Cerrado Brasileiro, na região da Serra das Confusões, localizada próximo ao município de Redenção do Gurgueia no estado do Piauí e na Reserva Ecológica do IBGE localizado em Brasília, Distrito Federal. Das 81 amostras testadas, 33 (40,7%) foram positivas na PCR para o gene 18S rRNA, destas, 7 amostras eram da espécie *T. itambere*, e 26 amostras da espécie *T. oreadicus*. As 33 amostras foram negativas para *Leishmania* sp. na PCR. Nenhum destes agentes foi visualizado nos esfregaços sanguíneos. Este é o primeiro estudo a identificar *Trypanosoma* sp. em lagartos da espécie *T. oreadicus* e *T. itambere* no Cerrado.

Palavras-chave: 1. *Tropidurus oreadicus* 2. *Tropidurus semitaeniatus* 3. *Tropidurus itambere* 4. *Trypanosoma* sp. 5. Cerrado

ABSTRACT

Trypanosomatids are flagellated, unicellular protozoa, have a worldwide distribution and are capable of parasitizing several species of animals, including man. The genera *Leishmania* and *Trypanosoma* have been described in reptiles, including lizards. In the Cerrado, it is estimated that 241 species of lizards participate in the herpetofauna, occupying the second position of the richest biome in lizards in Brazil. Thus, the present study aimed to evaluate the presence of agents of the *Trypanosomatidae* family in blood samples of lizards of the genus *Tropidurus* using molecular techniques of *Nested* PCR and direct investigation in blood smears. Eighty-one blood samples from lizards of the genus *Tropidurus* were tested, distributed in 3 species: *T. oreadicus*, *T. semitaeniatus* and *T. itambere*, from the DNA sample bank and blood smears of the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the college of Veterinary Medicine from the University of Brasilia. The samples came from two regions of the Brazilian Cerrado, in the Serra das Confusões region, located near the municipality of Redenção do Gurgueia in the state of Piauí and in the IBGE Ecological Reserve located in Brasília, Federal District. Of the 81 samples tested, 33 (40.7%) were PCR positive for the 18S rRNA gene, of which 7 samples were from the *T. itambere* species, and 26 samples from the *T. oreadicus* species. The 33 samples were negative for *Leishmania* sp. in PCR. None of these agents were seen on blood smears. This is the first study to identify *Trypanosoma* sp. in lizards of the species *T. oreadicus* and *T. itambere* in the Cerrado.

Keywords: 1. *Tropidurus oreadicus* 2. *Tropidurus semitaeniatus* 3. *Tropidurus itambere* 4. *Trypanosoma* sp. 5. Cerrado

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - A, Lagarto *Tropidurus itambere*, B, *Tropiduros oreadicus* e C, *Tropidurus semitaeniatus* (Autores: João Gava Just, Luis F. C. de Lima e Célio Moura Neto, respectivamente; Fonte: iNaturalist)..... 16

Figura 2 - Características morfológicas dos protozoários da família Trypanosomatidae. Subclasse “juxtaform” corresponde as formas com flagelo inserido lateralmente ao corpo celular e subclasse “liberform” corresponde as formas com flagelo não inserido lateralmente ao corpo celular. **a.** Tripomastigota, **b.** Epimastigota, **c.** Amastigota (não possui flagelo), **d.** Opistomastigota, **e.** Coamastigota, **f.** Promastigota. Fonte: Adaptado de KAUFER et al., (2017). 18

Figura 3 - Classificação do gênero *Trypanossoma*. G: Gênero; SG: Subgênero e ESP: Espécie. Fonte: BAKER, 1983..... 19

Figura 4 – Ciclo biológico do *T. grayi*. FONTE: VIOLA, 2007 (Adaptado de HOARE, 1931) 21

Figura 5 – Parasitos de lagartos encontrados na Amazônia. *Trypanosoma* spp em (A) *U. superciliosus* e (B) *P. plica*. C. Infecção mista em *U. superciliosus* (*Trypanosoma* e microfilia). FONTE: Adaptado de Picelli et al., (2020). 22

CAPÍTULO 2

Figura 1 – O Mapa apresenta, na cor laranja, a extensão do Cerrado Brasileiro, e circuladas de preto as áreas amostradas, no estado do Piauí, o município de Redenção do Gurgueia, e no Distrito Federal, a área da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF..... 37

Figura 2 - Resultado de ensaio de PCR em gel para o gene alvo COI, utilizando os oligonucleotídeos COI-R e COI-F. Poços 1 e 2 controles negativos; poços 3 a 15 amostras de lagartos do gênero *Tropidurus*. 41

Figura 3 Eletroforese em gel de agarose (1,5%) da *Nested* PCR para detecção de agentes da família *Trypanosomatidae*, utilizando os oligonucleotídeos TRY927R/TRY927 e SSU561R/SSU561F. Amostras foram testadas em duplicata. Poços 1-2: controle negativo. Poços 3 a 12: amostras de lagartos *Tropiduros* positivas para tripanosomatídeos. Poços 13 – 14: controle positivo. Poço 15: marcador de peso molecular 100pb (*Invitrogen*®) 42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos e suas características utilizados para detecção de tripanossomatídeos em lagartos do gênero *Tropidurus* do Cerrado Brasileiro. 39
- Tabela 2**- Distribuição dos lagartos considerando o local de coleta e espécie. 40
- Tabela 3** - Amostras de *Tropidurus itambere* positivas e negativas para tripanosomatídeos por meio da *Nested* PCR, coletados na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF. 42
- Tabela 4** - Amostras de *Tropidurus oreadicus* positivas e negativas para tripanosomatídeos por meio da *Nested* PCR, coletadas na região da Serra das Confusões, localizada próximo ao município de Redenção do Gurgueia no estado do Piauí 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COI - Citocromo Oxidase subunidade I

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Trifosfato de Desoxirribonucleosídeos

mM – Milimol

pb – Pares de base

cPCR – Reação de Polimerase em Cadeia convencional

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

pMol – Picomol

RNA – Ácido Ribonucleico

°C – Graus Celsius de Temperatura

μL – Microlitros

% - Porcentagem



CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado ocupa cerca de 21% do território nacional, sendo o segundo maior bioma brasileiro (BORTOUG, 2002), abrange a região central do Brasil e engloba Estados do Goiás, Distrito Federal, como também partes dos Estados de Minas Gerais, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Tocantins, Maranhão, Piauí e Pará (SHIKI, 1997; SANO et al, 2008; KLINK & MACHADO, 2005). O Cerrado é considerado a savana tropical mais diversificada do mundo (MENDONÇA et al. 2008; ROCHA et al., 2012), possui biodiversidade elevada, aproximadamente 2.500 espécies de vertebrados vivem no bioma, entre mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, ocupando papel importante na ecologia (RATTER et al, 1997).

No Brasil, 760 espécies de répteis são reconhecidas, ocupando a segunda posição em maior número de espécies (COSTA & BÉRNILS, 2014). Estima-se que participem da herpetofauna do Cerrado, 260 espécies de répteis e destas, 241 espécies são de lagartos. Desta forma, o Cerrado é a segunda região mais rica em lagartos no Brasil (BASTOS, 2007; COSTA et al, 2007; RODRIGUES, 2005; NOGUEIRA et al., 2011).

Os répteis possuem papel importante por serem hospedeiros de muitos parasitos, incluindo os parasitos de células sanguíneas, sendo superior aos hemoparasitas registrados em aves e mamíferos. Aproximadamente 14 gêneros de hemoparasitas já foram registrados nessas espécies (DAVIES & JOHNSTON 2000; VITT et al 2008; TELFORD 2009; FARIA et al. 2019; PEIXOTO et al. 2020, UETZ et al. 2020).

Os tripanossomatídeos são protozoários, da Ordem Kinetoplastea, com distribuição mundial, infectam várias espécies de répteis, aves, mamíferos e o homem, destacam-se os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (TELFORD, 1995; HOARE, 1972; VOTÝPKA et al, 2015). No presente estudo foi realizada pesquisa de tripanossomatídeos em espécies de lagartos do gênero *Tropidurus* do Cerrado, pois os estudos sobre hemoparasitas nesses lagartos são escassos, uma vez que a maioria se restringe a identificação de espécies de lagartos, avaliação das condições ambientais, e pouco se sabe sobre hemoparasitas nas espécies do gênero *Tropidurus* no Cerrado.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em amostras de lagartos do gênero *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) no Cerrado brasileiro.

2.1 Objetivos Específicos

- Realizar detecção de tripanossomatídeos por meio da técnica de *Nested* Reação em Cadeia da Polimerase (nPCR) em lagartos do gênero *Tropidurus* do Cerrado.
- Realizar detecção de *Leishmania* sp. por meio da PCR convencional (cPCR) em lagartos positivos para tripanossomatídeos na técnica de *Nested* PCR.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Gênero *Tropidurus*

Lagartos da família *Tropiduridae* (Ordem: Squamata), gênero *Tropidurus* são encontrados na América do Sul e, no Brasil, possuem ampla distribuição, sendo observados na Caatinga, Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica e Restinga (VANZOLINI et al., 1972; VITT et al., 1993; ZERBINI et al., 1998). Atualmente, 22 espécies de *Tropidurus* foram descritas no Brasil (SBH 2022).

Considerados onívoros, os *Tropidurus* possuem estratégias alimentares do tipo senta-e-espera (ARAUJO, 1987; VAN SLUYS, 1995). São ectotérmicos, se tornam mais ativos quando expostos ao sol, e essa exposição acontece em longos períodos do dia e ano. São observados em áreas abertas e pouco encontrados em áreas de florestas (VITT, 1993). A maioria das espécies apresentam ciclo reprodutivo sazonal, caracterizando-se pela reprodução no período chuvoso e desova no período seco (VAN SLUYS, 1993; WIEDERHECKER et al, 2002).

Baseado em estudos morfológicos e moleculares, FROST e colaboradores (2001) dividiram o gênero *Tropidurus* em quatro grupos: grupo *T. bogerti*, grupo *T. spinulosus*, grupo *T. semitaeniatus* (que inclui a espécie *T. semitaeniatus*) e o grupo *T. torquatus* (que inclui as espécies *T. itambere* e *T. oreadicus*).

Os lagartos do grupo *Torquatus* são predominantemente insetívoros, encontrados em algumas áreas abertas da Caatinga, Cerrado, Restinga, Chaco e Savana Amazônica (VITT; GOLDBERG, 1983; RODRIGUES, 1987; VITT, 1993; ZERBINI, 1998; FROST et al. 2001, FARIA; ARAUJO, 2004). Dentre as espécies desse grupo, *Tropidurus oreadicus* são amplamente distribuídos no Cerrado, sendo descritos nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Piauí, Bahia e Maranhão (Figura 1-A) (RODRIGUES, 1987; ÁVILLA-PIRES, 1995). As espécies de *Tropidurus itambere* podem ser encontrados desde o centro ao sudoeste do Brasil, já observados nos estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocupando regiões do Cerrado (Figura 1-B) (RODRIGUES, 1987).

No grupo *Semitaeniatus*, as espécies de *Tropidurus semitaeniatus*, podem ser encontradas sobre superfícies rochosas na Caatinga, nos locais próximos ao litoral, do Piauí até Salvador (RODRIGUES, 2005; FREITAS; SILVA, 2007). Lagartos dessa família necessitam de muita exposição ao sol, sendo caracterizados como heliófilos (VITT, 1995). Lagartos *T.*

semitaeniatus são considerados generalistas, se alimentam de artrópodes e itens de origem vegetal, embora se alimentem predominantemente de insetos, principalmente formigas (Figura 1-C) (VITT, 1995; RIBEIRO, 2010).



Figura 1. A, Lagarto *Tropidurus itambere*, B, *Tropiduros oreadicus* e C, *Tropidurus semitaeniatus* (Autores: João Gava Just, Luis F. C. de Lima e Célio Moura Neto, respectivamente; Fonte: iNaturalist)

3.2 Família *Trypanosomatidae*

Pertencentes a Ordem Kinetoplastea, a família *Trypanosomatidae* é formada por protozoários flagelados que morfologicamente possuem mitocôndria única e uma estrutura denominada cinetoplasto, estrutura essa constituída por DNA circular (kDNA) localizado na base do flagelo. Apresentam distribuição mundial e já foram descritos em várias espécies, incluindo répteis, aves e mamíferos, se destacam pela capacidade de causar doenças em humanos (OPPERDOIS, 1994; HOARE; WALLACE, 1996; SIMPSON et al., 2006; LUKES et al., 2014; VOTÝPKA et al, 2015; KALFER et al., 2017).

A classificação desses protozoários pode ser de acordo com o ciclo e características morfológicas. Com relação ao ciclo, baseia-se na quantidade de hospedeiros, classificam-se em monóxeno e dioxeno. No ciclo dioxeno participam dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, como acontece nas espécies do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*, e no ciclo monóxeno participa apenas um hospedeiro invertebrado (VICKERMAN, 1976; SIMPSON et al., 2006; WHEELER et al., 2013; KALFER et al., 2017).

Morfologicamente, a classificação mais utilizada baseia-se na observação do agente por meio da microscopia de luz, sendo avaliado a posição e profundidade da bolsa do flagelo, fixação lateral do flagelo ao corpo da célula e comprimento do flagelo. Dessa forma, seis classes

morfotípicas de tripanossomatídeos são descritas: amastigota, coanomastigota, promastigota, opistomastigota, epimastigota e tripomastigota. Existe ainda uma classificação baseada na localização do flagelo: a superclasse denominada “juxtaform” engloba as formas cujo flagelo localiza-se lateralmente ao corpo celular (tripomastigota e epimastigota), e a superclasse “liberform” associa-se as formas que não possuem o flagelo inserido lateralmente ao corpo celular (Figura 2) (WALLACE et al., 1963; HOARE; WALLACE, 1966; WALLACE et al., 1996; WHEELER et al., 2013; LUKES et al., 2018).

Com base nas variações morfológicas, os tripanossomatídeos são classificados nos seguintes gêneros: *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Blastocrithidia*, *Sergeia*, *Wallacemonas*, *Blechnomonas*, *Angomonas*, *Strigomonas* e *Kentomonas* (HOARE, 1972; LUKES et al., 2014; VOTÝPKA et al., 2014).

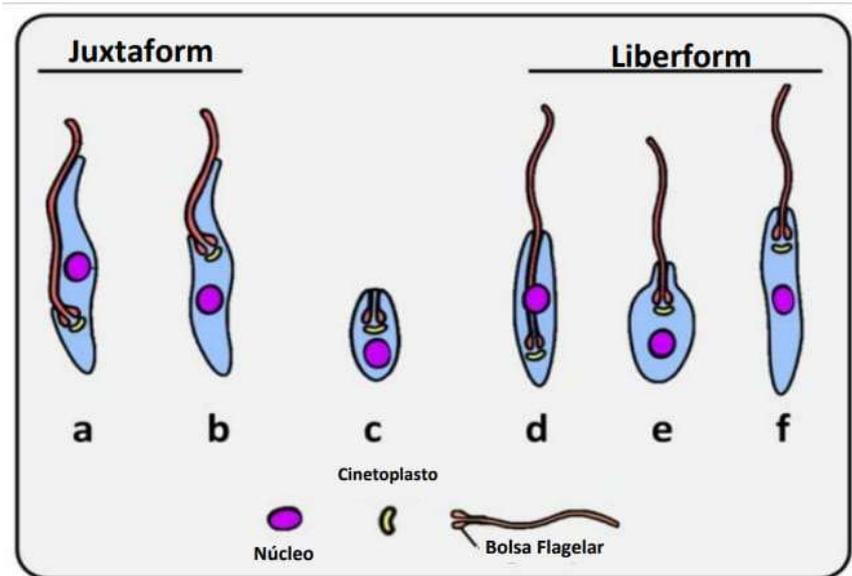


Figura 2- Características morfológicas dos protozoários da família Trypanosomatidae. Subclasse “juxtaform” corresponde as formas com flagelo inserido lateralmente ao corpo celular e subclasse “liberform” corresponde as formas com flagelo não inserido lateralmente ao corpo celular. **a.** Tripomastigota, **b.** Epimastigota, **c.** Amastigota (não possui flagelo), **d.** Opistomastigota, **e.** Coanomastigota, **f.** Promastigota. Fonte: Adaptado de KAUFER et al., (2017).

Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* se destacam pela capacidade de infectar uma variedade de espécies, incluindo répteis (são os únicos flagelados capazes de infectar os répteis e outros vertebrados), apresentam distribuição mundial e possuem importância médica pois são capazes de causar doenças no homem, como doença do sono, doença de Chagas e leishmaniose. Em répteis, cada vez mais vem sendo descritas espécies desses gêneros, principalmente do gênero *Trypanosoma*. Dentre os répteis, os lagartos se destacam por terem pelo menos 42 espécies do gênero *Trypanosoma* descritas no mundo (TELFORD, 1995; HOARE, 1972; VOTÝPKA et al, 2015).

3.3 *Trypanosoma* sp.

As espécies de gênero *Trypanosoma* possuem distribuição mundial, variam entre espécies não patogênicas e patogênicas. As espécies patogênicas são de interesse para a medicina humana e medicina veterinária pois possuem capacidade de causar doenças em várias espécies de animais e no homem (HOARE, 1992; DESQUESNES et al., 2022).

As formas morfológicas encontrados são amastigotas, promastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. As espécies de *Trypanosomas* apresentam ciclo dioxeno, alternando entre vertebrados e invertebrados hematófagos. As formas tripomastigotas são encontradas na circulação sanguínea de hospedeiros vertebrados. Nos invertebrados é encontrada a forma tripomastigota metacíclica. As formas amastigotas ocorrem nos vertebrados, sendo intracelulares, as formas promastigotas e epimastigotas ocorrem em invertebrados (HOARE, 1972).

De acordo com a forma de eliminação da forma infectante, Hoare (1972), propôs a divisão dos *Trypanosomas* em duas classes: Stercoraria e Salivária. A classe Salivaria caracteriza-se por espécies que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor (mosca tsé-tsé) e a transmissão acontece a partir da picada e inoculação de formas tripomastigotas metacíclicas. Já na classe Stercoraria, as espécies se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor, sendo transmitido pelas formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas nas fezes do vetor (Figura 3) (HOARE, 1972; CLAES et al., 2005; CORTEZ et al, 2006; DESQUESNES et al., 2022).

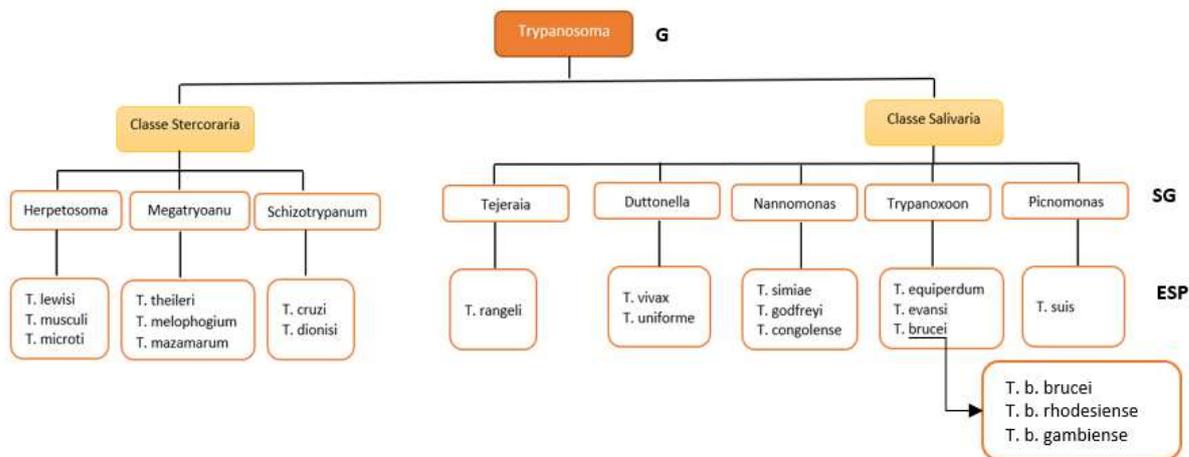


Figura 3 – Classificação do gênero *Trypanosoma*. G: Gênero; SG: Subgênero e ESP: Espécie. Fonte: BAKER, 1983.

3.3.1 *Trypanosoma* sp. em répteis

Já foram descritas mais de 80 espécies do gênero *Trypanosoma* em répteis. Diferentemente dos mamíferos, não existe uma classificação para espécies desses protozoários em répteis, principalmente devido a variedade morfológica e pouca descrição acerca do ciclo de vida desses agentes (TELFORD, 1995; MAIA et al., 2004; VIOLA, 2007).

Informações sobre ciclo biológico e vetores de répteis são escassos, mas Telford (1995) sugere que esses tripanossomas sejam transmitidos possivelmente por flebotomídeos em répteis terrestres. As formas tripomastigotas são as descritas em avaliações microscópicas do sangue periférico e formas intracelulares nunca foram observadas.

Em 1995, Telford, S. descreveu a presença de várias espécies de *Trypanosoma* encontrados no sangue de lagartos pertencentes a família *Gekkonidae*. Neste estudo, foram avaliadas características morfológicas como: tamanho do protozoário, características do flagelo, largura da membrana flutuante, comprimento do núcleo entre outros aspectos baseados na observação das formas tripomastigotas encontradas, também foi descrito as espécies em que se observou a mesma espécie de *Trypanosoma*, identificando sete espécies diferentes nessa família.

O *Trypanosoma grayi*, observado em grandes formas de tripomastigotas em sangue de crocodilos (*Crocodilus niloticus*), é a única espécie a apresentar descrição de ciclo no hospedeiro vertebrado e no vetor. Transmitido pela mosca tsé-tsé (*Glossina palpapis*), a transmissão ocorre pela ingestão de fezes das moscas ou pela ingestão da própria mosca contendo a forma tripomastigota metacíclica. Após ingestão das fezes ou da mosca, formas tripomastigotas metacíclicas penetram na mucosa oral dos crocodilos e no sangue ocorre diferenciação na forma tripomastigota observada na microscopia. Na mosca, após ingestão de sangue de crocodilos contendo a forma tripomastigota, no intestino médio se diferenciam em epimastigota, que após processo de divisão, no intestino posterior, se diferenciam em tripomastigota metacíclica (Figura 4). A transmissão causada pela ingestão de insetos contaminados já foi descrita em outros répteis como: *T. thezieni* encontrada em camaleões e *T. phylodriasi* descritas em serpentes (HOARE, 1929; 1931; BRYGOO, 1963; DE BIASE et al., 1975).

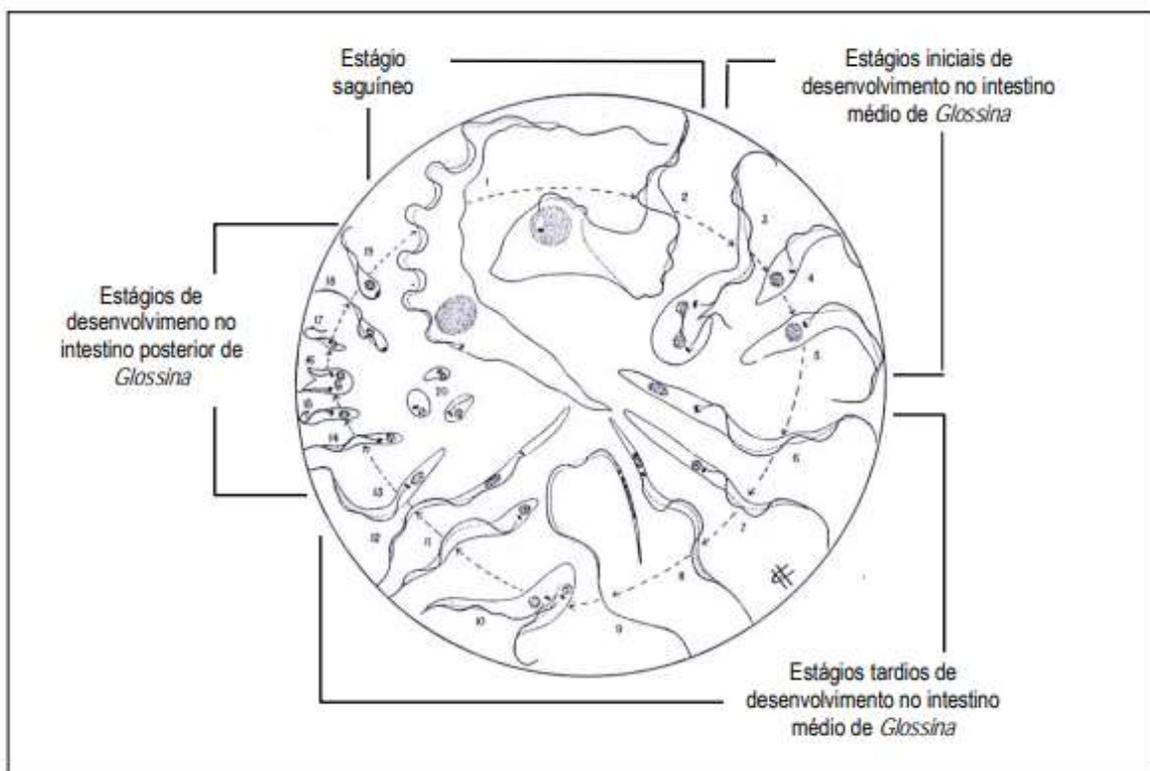


Figura 4 – Ciclo biológico do *T. grayi*. FONTE: VIOLA, 2007 (Adaptado de HOARE, 1931).

No Brasil, *T. plicae*, *T. superciliosae* e *T. rudoiphi* já foram descritos em lagartos (CARINE; RUDOLPH, 1912; WALLIKER, 1965; LAINSON et al., 1975). Pesquisando sobre a prevalência de hemoparasitas da Amazônia, Picelli e colaboradores (2020), relataram por meio da microscopia, presença de parasitos extracelulares da família *Trypanosomatidae* em lagartos Tropicoduridae das espécies *Urunoscodon superciliosus*, total de 83 positivos (70%, n=118) e *Plica umbra*, total de um positivo (8%; n = 12), apresentando morfotipos diferentes de *Trypanosoma* (Figura 5).

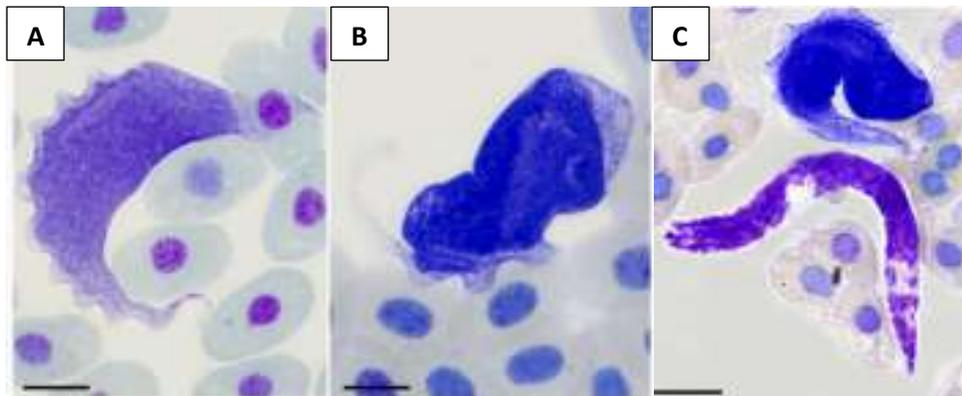


Figura 5 – Parasitos de lagartos encontrados na Amazônia. *Trypanosoma* spp em (A) *U. superciliosus* e (B) *P. plica*. C. Infecção mista em *U. superciliosus* (*Trypanosoma* e microfilária). FONTE: Adaptado de Picelli et al., (2020).

3.4 *Leishmania* spp.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são causadores de um grupo de doenças denominadas leishmanioses. Com distribuição mundial, as regiões tropicais e subtropicais são as mais acometidas. Possui importância para a medicina humana e veterinária, afetando homens, animais domésticos e silvestres. Doenças causadas por *Leishmania* spp. são negligenciadas, sendo um problema de saúde pública (BRASIL, 2000; BRASIL, 2006; DESJEUX, 2004; DESQUESNES et al., 2022).

O aumento de casos de leishmaniose no homem e animais domésticos, ocorre principalmente pela migração, falta de saneamento básico, devido ao processo de urbanização, o desmatamento, diminuição na disponibilidade na alimentação para os mosquitos também são fatores que contribuem para a urbanização desses vetores e conseqüentemente a procura do homem e cães, principalmente, como fonte de alimento (LUZ et al., 2001; REIS, 2001; BRASIL, 2002; DESJEUX, 2004; BRASIL, 2006).

Dentre as formas clínicas da leishmaniose, a forma visceral causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani*, incluindo *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* é a forma mais grave (ROSS, 1903; NICOLLE, 1908; LAINSON ; HAW, 1987). A transmissão acontece após picada do mosquito flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, pelas fêmeas durante o repasto sanguíneo no hospedeiro. No tubo digestivo da fêmea, a forma amastigota que foi ingerida evolui para promastigotas metacíclicas (forma infectante), que após passar por processos de multiplicação e migrarem para a porção anterior do trato digestivo da fêmea, reiniciam o ciclo durante o próximo repasto sanguíneo no homem e animais. Na pele do hospedeiro, após alimentação do vetor, formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário e se transformam na forma amastigota que se multiplicam e lisam as células. Após lise celular, as formas amastigotas ficam livres, sendo fagocitadas novamente por outras células, e a disseminação acontece para outros tecidos, incluindo linfonodos, fígado, baço e medula óssea, via corrente sanguínea. Esses tecidos são alvos pois são ricos em células do sistema mononuclear fagocitário (MURRAY et al, 2005; BRASIL, 2006; KAMHAWI, 2006).

3.4.1 *Leishmania* spp. em répteis

Além dos mamíferos, os lagartos são os únicos animais que podem ser infectados por *Leishmania* spp. Contudo, a importância dos répteis na disseminação da leishmaniose ainda é desconhecida. Os protozoários encontrados em répteis já descritos, foram classificados em um subgênero denominado *Sauroleishmania* e as características taxonômicas ainda não foram elucidadas (BELOVA, 1971; TELFORD, 1975; LAINSON; SHAW, 1987; NOYS et al., 1998).

A transmissão acontece com a participação de flebotomíneos do gênero *Sergentomyia*. France et al, (1920) sugerem que a transmissão de *Leishmania* para os répteis ocorra pela ingestão de vetores do gênero *Sergentomyia*, supondo que o parasita tenha acesso a circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado como resultado da absorção do parasita pela mucosa

intestinal (NOVO et al., 2016). A espécie *L. tarentolae*, já foi detectada em lagartixas *Tarentola mauritanica* e *Mediodactylus kotschy* na Itália e *Tarentola annularis* no Sudão (POZIO et al., 1983; KIIKCK-KENDRICK et al., 1986; ELWASILA, 1988; POMBI et al., 2020).

Zhang et al (2016; 2019) identificaram alta prevalência de *Leishmania* em lagartos (*L. turanica*, *L. tarentolae*, complexo *L. donovani* e *L. tropica*) no Oeste da China, evidenciando a importância dos lagartos como possíveis reservatórios para leishmaniose humana, pela identificação das espécies patogênicas em lagartos.

Mendoza-Roldan et al, (2022), demonstraram a circulação simpátrica de *Leishmania tarentolae* e *Leishmania infantum* em lagartos *Gekkonidae*, cães e flebotomíneos na Itália. Das 37 amostras de lagartos amostrados, quatro foram positivas na PCR (10,81%) dessas, duas espécies de lagartos *T. mauritanica* foram positivas para *L. tarentolae* e duas foram positivas para *L. infantum*. Das amostras positivas para *L. infantum*, foram observadas formas amastigotas na microscopia de medula óssea. De 716 flebotomíneos coletados, 294 eram fêmeas, destas 24 (8,1%) foram positivas para *L. tarentolae* na PCR e um (4,2%), foi positivo para *L. infantum*. Com relação aos cães baseados em testes sorológicos, dos 19 cães amostrados, 12 (63,2%) tiveram resultados positivos contra promastigotas de *L. infantum* e *L. tarentolae*.

3.5 Métodos utilizados para detecção de tripanossomatídeos

As técnicas utilizadas para detecção de agentes da família *Trypanosomatidae* variam em sensibilidade e especificidade. As técnicas vão desde a visualização do agente, pela microscopia óptica (métodos diretos) até o uso de métodos mais complexos como a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR; métodos indiretos) (DESQUESNES, 2022). Técnicas utilizadas para detecção direta do agente incluem a confecção de esfregaço sanguíneo devidamente corado, permitindo a identificação das formas amastigotas ou tripomastigotas dos agentes por meio da microscopia óptica. Pode ser realizado ainda as técnicas de lâmina úmida e do microhematócrito. (NISHIDA; DELMASCHIO, 2017; LUQUETTI; SCHIJMAN, 2019; DESQUESNES, 2022).

Apesar de serem procedimentos considerados de baixo custo e demandarem poucos equipamentos para realização, a não detecção do agente em exames diretos não exclui uma possível infecção por tripanossomatídeos. Isso acontece principalmente devido a influência da

qualidade da amostra e a baixa parasitemia (LUQUETTI; SCHIJMAN, 2019; DESQUESNES, 2022).

Os métodos sorológicos mais utilizados são ensaio imunoenzimático (ELISA), hemaglutinação indireta e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Apesar de apresentarem boa sensibilidade e especificidade, a capacidade de detectar reações cruzadas, tornam esses testes insuficientes se avaliados individualmente. Desta maneira, a confirmação do resultado sorológico deve ser realizada utilizando outra técnica para contraprova (BRASIL, 2014; LUQUETTI; SCHIJMAN, 2019; DESQUESNES, 2022).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), apresenta alta sensibilidade, sendo capaz de detectar o DNA do agente tanto no hospedeiro quanto no vetor. Técnicas moleculares utilizadas na identificação de sequências alvo do DNA nuclear, cinetoplástico ou ribossomal se mantêm conservadas durante fases distintas do ciclo de protozoários. Tem sido descrito uma variedade de oligonucleotídeos que possibilitam detectar agentes, desde família, gênero e espécie por meio da PCR. As regiões variáveis do gene 18S rRNA já foram caracterizadas na maioria das espécies eucarióticas (NEEFES et al, 1993; GRISARD et al, 1999; LIMA et al., 2013; SABINO et al., 2015; DESQUESNES, 2022).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. [S.l.], Public Library of Science. , 3 mar. 2016.

ARAÚJO, A. F. B. Comportamento alimentar dos lagartos: o caso do *Tropidurus* do grupo *torquatus* da Serra de Carajás, Pará (Sauria: Iguanidae). *Anais de Etologia*, 5: 189-197, 1987.

ÁVILA-PIRES, T. C. S. Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). **Zool Verhand** 299: 1–706. 1995.

BAKER, J. R. "The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1983. DOI: 10.1016/0035-9203(83)90208-0

BASTOS, R.P. Anfíbios do Cerrado. In: L.B. NASCIMENTO; M.E. OLIVEIRA (eds), *Herpetologia no Brasil II*. Belo Horizonte, Sociedade Brasileira de Herpetologia, p. 87-100. 2007.

BELOVA E, M. Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. *Bull World Health Organ*.44:553–60,1971.

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. pp. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. Borlaug, N.E. 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. pp. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, 2000, p.7-11.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol. Eletrôn. Epidemiologia.*, v.2, n.6, p.2-11, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr.–Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRYGOO E. R. Hematozoaires de reptiles malgaches. I. *Trypanosoma therexieni*. 1963.

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

CAMPBELL, T. W., 2015: Exotic animal hematology and cytology. John Wiley & Sons.

- CLAES F., BÜSCHER P., TOURATIER L., GODDEERIS B.M. *Trypanosoma equiperdum*: Master of disguise or historical mistake? **Trends Parasitol.** 2005;21(7):316–21.
- CORTEZ A.P., VENTURA R. M., RODRIGUES J. P., *et al.* The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology.** Agosto. 2006 (Pt 2): 159-69.
- COSTA, H. C; BÉRNILS, R. S. (org.). 2014. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.2. Acessado em: 30 de jan. 2015.
- COSTA, G.C; NOGUEIRA, C; MACHADO, R.B; COLLI, G.R. Squamate richness in the Brazilian Cerrado and its environmental-climatic associations. *Diversity and Distribution*, 13:714-724. 2007.
- DAVIES, A.J; JOHNSTON, M. R. L. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. **Adv Parasit** 45: 1-107. 2000.
- DE BIASE P., PESSOA S, B., PUORTO G., FERNANDES W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de vultura. **Mem Inst Butantan.** 39: 85-101. 1975.
- DESJEUX, P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318. 2004.
- DESQUESNES M., GONZATTI M., SAZMAND A., *et al.* A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. **Parasites & Vectors** .2022. doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1
- ELWASILA M. *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921 from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan. **Parasitol Res.** 1988; 74: 591–592. <https://doi.org/10.1007/BF00531640> PMID: 3194372
- FARIA, R. G; ARAÚJO, A.F.G. Syntopy of two *Tropidurus* lizard species (squamata: tropiduridae) in a rocky Cerrado habitat in Central Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, 64:775-786. 2004.
- FARIA, A. S; MENIN, M; KAEFER, I. L. Riparian zone as a main determinant of the structure of lizard assemblages in upland Amazonian forests. **Austral Ecol** 44: 850-858. 2019.
- FREITAS, M.A.; SILVA, T.F.S. Guia ilustrado: A herpetofauna das caatingas e áreas de altitudes do nordeste brasileiro. Pelotas: USEB. (Coleção Manuais de Campo USEB, 6) 2007.
- FROST, D. R; RODRIGUES, M. T; GRANT, T; TITUS, T. A. Phylogenetics of the Lizard Genus *Tropidurus* (Squamata: *Tropiduridae*: *Tropidurinae*): Direct Optimization, Descriptive Efficiency, and Sensitivity Analysis of Congruence Between Molecular Data and Morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(3), 352–371. doi:10.1006/mpev.2001.1015.2001.
- GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; GUARNIERI, A.A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. - Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(2): 203-209, 1999.
- HOARE, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi*. 2. Experimental transmission to the crocodile. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 39-56. 1929. doi.org/10.1016/S0035-9203(29)90831-2

HOARE, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. Life-Cycle in the Tsetse-fly and in the Crocodile. **Parasitology**. 1931. doi:10.1017/s0031182000013858

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature**, v.212, p.1385-1386, 1966.

HOARE, Cecil Arthur. "The trypanosomes of mammals : a zoological monograph", **Oxford : Blackwell Scientific Publications**, v. 2, n. July 1971, p. 1971, 1972.

KAMHAWI, S. "Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?", **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006. DOI: 10.1016/j.pt.2006.06.012.

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 8 dez. 2017.

KILLICK-KENDRICK, R., LAINSON, R., RIOUX, JA, SAF'JANOVA, VM. The taxonomy of Leishmania-like parasites of reptiles. In: Rioux JA, editor. *Leishmania. Taxonomy and Phylogeny. Eco-épidémiologiques applications*, Montpellier: IMEEE, 143–148. 1986.

KLINK, C. A; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. Belo Horizonte. *Megadiversidade*, v. 1, n 1, p 148–155. 2005.

LAINSON R., SHAW J., LANDAU I. Some blood parasites of the Brazilian lizards *Plica umbra* and *Uranoscodon superciliosa* (Iguanidae). **Parasitology** 70: 119-141. 1975

LAINSON R., SHAW J. Evolution, classification and geographical distribution. In. **Peterd W, Killick-Kendrick R. eds. *The Leishmaniases***. London: Academic Press 1987:1-120.

LUKEŠ, J., SKALICKÝ, T., TÝČ, J., et al. "Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates", **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115–122, 2014. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.05.007.

LUKEŠ J., BUTENKO A., HASHIMI H., et al. Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. **Trends in Parasitology**. Vol 20. 2018. doi.org/10.1016/j.pt.2018.03.002

LUQUETTI, A. O., SCHIJMAN, G. A., "Diagnosis of Chagas Disease". In: ALTICHEH, J. M., FREILIJ, H. (Org.), **Chagas Diseases A clinical approach**, **Birkhäuser** ed. [S.l.], Springer Nature Switzerland AG, 2019. p. 141–158.

LUZ, Z.M.P.; PIMENTA, D.N.; CABRAL, A.L.L.V.; FIÚZA, V.O.P.; RABELLO, A. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da região metropolitana de Belo Horizonte. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.34, n.3, p.249-254, 2001.

MAIA S., RODRIGUES A, C., CAMPANER M., et al. 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 a species-specific marker. **Parasitology**. 2004. 128: 28-283.

MENDONÇA, R. C; FELFILI, J. M; WALTER, B. M. T; SILVA-JÚNIOR, M. C; REZENDE, A. B; FILGUEIRAS, T. S; NOGUEIRA, P. E; FAGG, C. W. Flora vascular do Bioma Cerrado.

In: Sano, S. M; Almeida, S. P; Ribeiro, J. F. (orgs.). Cerrado: Ecologia e Flora. (pp. 213-228). vol 2. Brasília: Embrapa Cerrados. 2008.

MENDOZA-ROLDAN JA, ZATELLI A, LATROFA MS, IATTA R, BEZERRA-SANTOS MA, ANNOSCIA G, *et al.* Leishmania (*Sauroleishmania*) tarentolae isolation and sympatric occurrence with Leishmania (*Leishmania*) infantum in geckoes, dogs and sand flies. **PLoS Negl Trop Dis** 16(8): e0010650. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010650>

Ministério da saúde. Brasil, (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.

MURRAY H, W., BERMAN J, D., DAVIES C, R., SARAVIA N, G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561–77.

NEEFS, J. M. et al. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic acids research*, v. 21, n. 13, p. 3025–3049, 1993.

NISHIDA, L. H. G; DELMASCHIO, I. B. Leishmaniose Visceral Canina – Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 07-15, 2017.

NOGUEIRA, C., RIBEIRO, S., COSTA, G.C. & COLLI, G.R. Vicariance and endemism in a Neotropical savanna hotspot: distribution patterns of Cerrado squamate reptiles. **J. Biogeogr.** 38:1907-1922. 2011. [http:// dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02538.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2699.2011.02538.x)

NOYES H, A., CHANCE M. L; CROAN D,G., ELIS J,T. Leishmania (*Sauroleishmania*): a commentary on classification. **Parasitology**. 14, 167. 1998.

NOVO, S. P. C., LELES, D., BIANUCCI, R., & ARAUJO, A. THE PROCESS OF Leishmania INFECTION - DISEASE AND NEW PERSPECTIVES OF PALEOPARASITOLOGY. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 58(0). 2016. doi:10.1590/s1678-9946201658045

OPPERDOES R. F. Introduction The Trypanosomatidae: Amazing Organisms. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Vol. 26, No. 2, 1994.

PEIXOTO, G.M; FRAGA, R; ARAÚJO, M. C; KAEFER, I. L; LIMA, A. P. Hierarchical effects of historical and environmental factors on lizard assemblages in the upper Madeira River, Brazilian Amazonia. *PloS* 15:e0233881. 2020. doi.org/10.1371/journal.pone.0233881

PICELLI A, M., RAMIRES A, C., MASSELI F, A. S. Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscopy. **An Acad Bras Cienc.** 2020. 92(2): e20200428 DOI 10.1590/0001-3765202020200428

POMBI M, GIACOMI A, BARLOZZARI G, MENDOZA-ROLDAN J, MACRÍ G, OTRANTO D, ET AL. Molecular detection of Leishmania (*Sauroleishmania*) tarentolae in human blood and Leishmania (*Leishmania*) infantum in *Sergentomyia minuta*: unexpected host-parasite contacts. *Med Vet Entomol.*; 34: 470–475, 2020. <https://doi.org/10.1111/mve.12464> PMID: 32710462 15.

- POZIO E, GRAMICCIA M, GRADONI L, MAROLI M. Hemoflagellates in *Cyrtodactylus kotschy* (Steindachner, 1870) (Reptilia, Gekkonidae) in Italy. **Acta Trop.** 1983; 40: 399–400. PMID: 6142639 12.
- RATTER, J. A; RIBEIRO, J. F; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany** 80: 223-230. 1997.
- REIS, A.B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. 2001. 176f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- RIBEIRO, L. B. Ecologia comportamental de *Tropidurus hispidus* e *Tropidurus semitaeniatus* (Squamata, Tropiduridae) em simpatria, em área de Caatinga do Nordeste do Brasil. 2010. 172f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.
- ROCHA, G; FERREIRA, L; FERREIRA, N; FERREIRA, M. Detecção de desmatamentos no bioma Cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. **Rev. Brasileira Cartografia.** 2012
- RODRIGUES, M. R. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do Grupo *Torquatus* ao sul do rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia.** V.31, n.3,p.105-230. 1987.
- RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. *Megadiversidade*, 1, 87–94. 2005
- SABINO, E. C., RIBEIRO, A. L., LEE, T. H., et al. "Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity", **European Journal of Heart Failure**, v. 17, n. 4, p. 416–423, 2015. DOI: 10.1002/ejhf.220.
- SANO, E. E; ROSA, R; BRITO, J. L. S; FERREIRA, L. G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 1, jan. 2008, p.153-156.
- SIMPSON A.G.B., STEVENS J.R., LUKES J. The Evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** 2006; 22(4):168 – 74.
- SHIKI, S. Sistema agroalimentar no Cerrado brasileiro: caminhando para o caos? In: SILVA, J. G.; SHIKI, S.; ORTEGA, A. C. (orgs) *Agricultura, meio ambiente e sustentabilidade do Cerrado brasileiro*. Uberlândia, UFU, 372 p. 1997.
- TELFORD S.R. A review of trypanosomes of gekkonid lizards, including the description of five new species. **Syst Parasitol.** 1995;31:37–52.
- TELFORD S.R. The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles, In: JP Kreier, *Parasitic Protozoa*, 2nd, ed0, vol 10 . San Diego: Academic Press. 1975.
- TELFORD, S. R. *Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text*. Boca Raton: CRC Press, 355 p. 2009.
- UETZ, P; FREED, P; HOŠEK, J. The Reptile Database. Disponível em acesso em 24 agosto 2020.

- VIOLA L, B., Diversidade morfológica, molecular e filogenia de isolados Brasileiros de Trypanosomas em cobras, jacarés e lagartos [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, 2007.
- VOTÝPKA, J., KOSTYGOV, A. Y., KRAEVA, N., et al. "Kentomonas gen. n., a New Genus of Endosymbiont-containing Trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n.", **Protist**, v. 165, n. 6, p. 825–838, 2014. DOI: 10.1016/j.protis.2014.09.002.
- VOTÝPKA, J., D'AVILA-LEVY, C. M., GRELLIER, P., et al. "New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description", **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2015.06.015.
- WALLIKER D. Malaria parasites of some Brazilian lizards. **Parasitology** 56: 39-44. 1966.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, n. 1, fev. 1966.
- WHEELER, R. J., GLUENZ, E., GULL, K. "The limits on trypanosomatid morphological diversity", **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 19 nov. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0079581.
- World Health Organization (WHO). Epidemiology and control of African trypanosomiasis. 1986.
- ZHANG, J.-R., GUO, X.-G., CHEN, H., LIU, J.-L., GONG, X., CHEN, D.-L., & CHEN, J.-P. Pathogenic Leishmania spp. detected in lizards from Northwest China using molecular methods. **BMC Veterinary Research**, 15(1). 2019. doi:10.1186/s12917-019-2174-4
- ZHANG, J.-R., GUO, X.-G., LIU, J.-L., ZHOU, T.-H., GONG, X., CHEN, D.-L., & CHEN, J.-P. Molecular detection, identification and phylogenetic inference of Leishmania spp. in some desert lizards from Northwest China by using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. **Acta Tropica**, 162, 83–94. 2016. doi:10.1016/j.actatropica.2016.06
- SBH (2022) Brazilian reptiles – List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. www.sbherpetologia.org.br. Acessado em 28 de Agosto de 2022.
- VAN SLUYS, M. Food habits of the lizard Tropicurus itambere (Tropiduridae) in south eastern Brazil. **J. Herpetol.**, 27(3): 347-351, 1993.
- VAN SLUYS, M. Seasonal variation in prey choice by the lizard Tropicurus itambere (Tropiduridae) in southeastern Brazil. *Ciência e Cultura*, 47(1/2): 61-65, 1995
- VANZOLINI, P.E. Miscellaneous notes on the ecology of some Brazilian lizards (Sauria). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 26 (8): 83-115, 1972.
- VITT, L. J. Ecology of isolated open-formation Tropicurus (Reptilia: Tropiduridae) in Amazonian lowland rain forest. **Canadian Journal of Zoology / Revue Canadienne De Zoologie**, v. 71, n. 12, p. 2370-2390. 1993.
- VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. Ecological observations on Cerrado Lizards in Rondônia, Brazil. **Journal of Herpetology**, 27 (1): 46-52, 1993.
- VITT, L. J; GOLDBERG, S. R. Reproductive ecology of two tropical iguanid lizards: Tropicurus torquatus and Platynotus semitaeniatus. *Copeia*, 1983(1): 131-141, 1983.

VITT, L. J; MAGNUSSON, W.E; ÁVILA-PIRES, T. C; LIMA, A.P. Guide to the Lizards of Reserva Adolpho Ducke, Central Amazonia. Manaus: Áttema Editorial, 176 p. 2008.

ZHANG JR, GUO XG, CHEN H, LIU JL, GONG X, CHEN DL, *et al.* Pathogenic *Leishmania* spp. detected in lizards from Northwest China using molecular methods. **BMC Vet Res.** 2019; 15: 1–3.

ZERBINI, G.J. Partição de recursos por duas espécies de *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) na Restinga de praia das neves. Não publicado. Brasília-DF, Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado. 1998.

RODRIGUES, M.T. Herptofauna da caatinga, p. 181-236. In: Ecologia e Conservação da Caatinga. (Leal I.R., Tabareli, M. & Silva, J.M.C., Eds.). Recife: Editora da UFPE, 2005. 806p, 2005.

WIEDERHECKER, H.C; PINTO, A.C.S; COLLI, G.R. Reproductive ecology of *Tropidurur torquatus* (Squamara: Tropiduridae) in the highly seasonal Cerrado biome og Central Brasil. **J Herpetol.** 36:82-91. 2002.



CAPÍTULO 2

PESQUISA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS EM LAGARTOS DO GÊNERO *TROPIDURUS* (SQUAMATA: TROPIDURIDAE) NO CERRADO BRASILEIRO

1 RESUMO

Tripanossomatídeos são protozoários flagelados, unicelulares, apresentam distribuição mundial e são capazes de parasitar várias espécies de animais, inclusive o homem. Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* vem sendo descritos em répteis, incluindo lagartos. No Cerrado, estima-se que 241 espécies de lagartos participem da herpetofauna, ocupando a segunda posição do bioma mais rico em lagartos no Brasil. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença de agentes da família *Trypanosomatidae* em amostras de sangue de lagartos do gênero *Tropidurus* utilizando técnicas moleculares de *Nested* PCR e pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. Foram testadas 81 amostras de sangue de lagartos do gênero *Tropidurus*, distribuídos em 3 espécies: *T. oreadicus*, *T. semitaeniatus* e *T. itambere*, do banco de amostras de DNA e de esfregaços sanguíneos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. As amostras eram provenientes de duas regiões do Cerrado Brasileiro, na região da Serra das Confusões, localizada próximo ao município de Redenção do Gurgueia no estado do Piauí e na Reserva Ecológica do IBGE localizado em Brasília, Distrito Federal. Das 81 amostras testadas, 33 (40,7%) foram positivas na PCR para o gene 18S rRNA, destas, 7 amostras eram da espécie *T. itambere*, e 26 amostras da espécie *T. oreadicus*. As 33 amostras foram negativas para *Leishmania* sp. na PCR. Nenhum destes agentes foi visualizado nos esfregaços sanguíneos. Este é o primeiro estudo a identificar *Trypanosoma* sp. em lagartos da espécie *T. oreadicus* e *T. itambere* no Cerrado.

Palavras-chave: 1. *Tropidurus oreadicus* 2. *Tropidurus semitaeniatus* 3. *Tropidurus itambere* 4. *Trypanosoma* sp. 5. Cerrado

2 ABSTRACT

Trypanosomatids are flagellated, unicellular protozoa, have a worldwide distribution and are capable of parasitizing several species of animals, including man. The genera *Leishmania* and *Trypanosoma* have been described in reptiles, including lizards. In the Cerrado, it is estimated that 241 species of lizards participate in the herpetofauna, occupying the second position of the richest biome in lizards in Brazil. Thus, the present study aimed to evaluate the presence of agents of the *Trypanosomatidae* family in blood samples of lizards of the genus *Tropidurus* using molecular techniques of *Nested* PCR and direct investigation in blood smears. Eighty-one blood samples from lizards of the genus *Tropidurus* were tested, distributed in 3 species: *T. oreadicus*, *T. semitaeniatus* and *T. itambere*, from the DNA sample bank and blood smears of the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the college of Veterinary Medicine from the University of Brasilia. The samples came from two regions of the Brazilian Cerrado, in the Serra das Confusões region, located near the municipality of Redenção do Gurgueia in the state of Piauí and in the IBGE Ecological Reserve located in Brasília, Federal District. Of the 81 samples tested, 33 (40.7%) were PCR positive for the 18S rRNA gene, of which 7 samples were from the *T. itambere* species, and 26 samples from the *T. oreadicus* species. The 33 samples were negative for *Leishmania* sp. in PCR. None of these agents were seen on blood smears. This is the first study to identify *Trypanosoma* sp. in lizards of the species *T. oreadicus* and *T. itambere* in the Cerrado.

Keywords: 1. *Tropidurus oreadicus* 2. *Tropidurus semitaeniatus* 3. *Tropidurus itambere* 4. *Trypanosoma* sp. 5. Cerrado

3 INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos são protozoários, unicelulares, pertencentes ao filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, caracterizados pela presença de uma única mitocôndria e cinetoplasto localizado na base do flagelo, parasitam várias espécies, incluindo aves, peixes, répteis e mamíferos. Espécies da família *Trypanosomatidae* possuem importância na medicina veterinária e humana por serem patogênicas, com destaque ao *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico causador da doença de Chagas e espécies do gênero *Leishmania*, responsáveis pelas leishmanioses (MASLOV et al, 2013; LAINSON, 2010; CAVALIER-SMITH, 2016; KAUFER et al 2017; ORTIZ & SOLARI, 2019).

Os répteis vêm apresentando papel importante nas doenças transmitidas por vetores. Artrópodes tornam-se bem adaptados aos répteis, que se infectam por agentes zoonóticos transmitidos por vetores (bactérias, protozoários, vírus) sendo fonte primária de alimentação para os vetores artrópodes que também podem se alimentar de humanos. Os répteis podem atuar como hospedeiros de patógenos zoonóticos associados à subclasse Acarina (ácaros e carrapatos) ou Diptera (mosquitos e flebotomíneos) (VÁCLAV et al., 2011; EBANI, 2017; MENDOZA-ROLDAN et al., 2020). Em lagartos, identificações de espécies do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* tem sido descritas, principalmente em regiões endêmicas para doenças causadas por esses agentes (HOARE, 1931; TELFORD, 1995; VOTÝPKA et al, 2015; ZHANG et al, 2016, 2019; PICELLI et al, 2020; MENDOZA-ROLDAN et al, 2022).

Os principais métodos para identificação de agentes da família *Trypanosomatidae* em répteis incluem pesquisa direta do agente, utilizando microscopia de luz e técnicas moleculares (PCR). Estes métodos se apresentam eficazes e tem sido utilizados na literatura (HOARE, 1931; TELFORD, 1995; DESQUESNES, 2022; PICELLI et al, 2020).

No Brasil, dados sobre a presença de hemoparasitas em lagartos na Amazônia Central brasileira, compreendeu quatro grandes grupos: Apicomplexa (incluindo hemogregarinas, piroplasmas e hemosporídeos), tripanossomatídeos, microfilárias (Picelli et al. 2020). Não há relatos de pesquisa de hemoparasitas tripanossomatídeos em lagartos *Tropidurus* no Cerrado. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo identificar espécies de tripanossomatídeos capazes de parasitar lagartos do gênero *Tropidurus* no Cerrado Brasileiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram testadas 81 amostras de sangue de lagartos do gênero *Tropidurus*, distribuídos em 3 espécies: *T. oreadicus*, *T. semitaeniatus* e *T. itambere*, do banco de amostras de DNA do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV/UnB). As amostras eram provenientes de duas regiões do Cerrado Brasileiro: na região da Serra das Confusões, localizada próximo ao município de Redenção do Gurgueia no estado do Piauí e na Reserva Ecológica do IBGE localizado em Brasília, Distrito Federal (Figura 1).

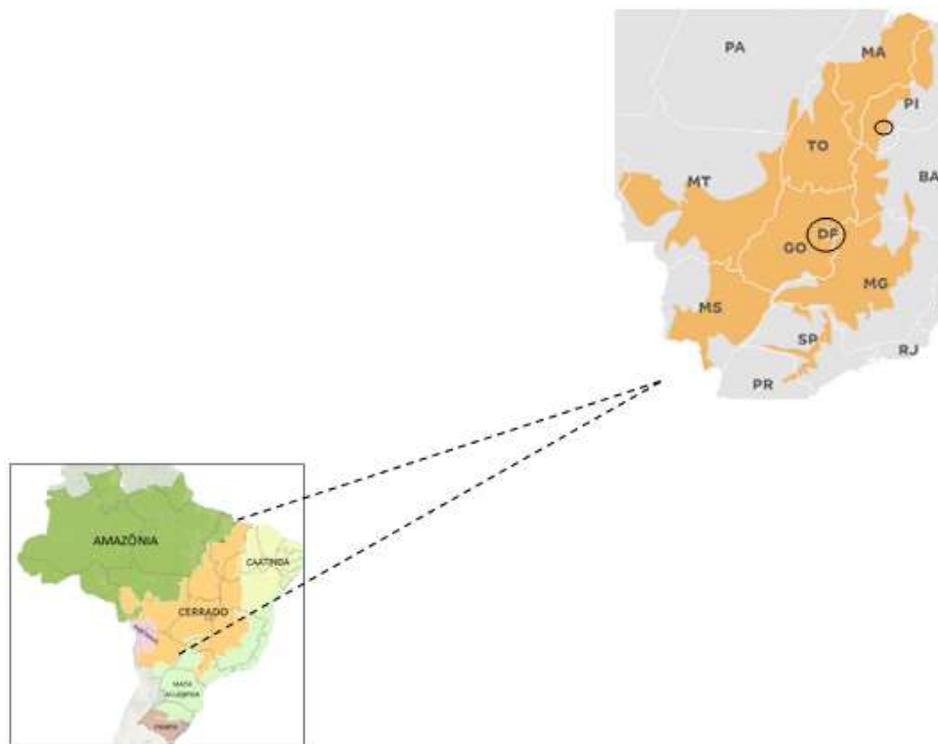


Figura 1 – O Mapa apresenta, na cor laranja, a extensão do Cerrado Brasileiro, e circulas de preto as áreas amostradas, no estado do Piauí, o município de Redenção do Gurgueia, e no Distrito Federal, a área da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF.

Foram analisadas as seguintes informações das planilhas do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (FAV/UNB) referentes as amostras de lagartos utilizados no presente estudo: sexo e os resultados das pesquisas diretas para presença de hemoparasitas, nos esfregaços sanguíneos.

4.2 Análises moleculares

As análises moleculares foram realizadas a partir de DNA obtido de amostras de sangue total dos lagartos. A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue, utilizando o kit comercial Illustra Blood Genomicprep (GE Health Care®) de acordo com as orientações do fabricante. Após extração, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da PCR. Com o objetivo de eliminar resultados falsos negativos em virtude da presença de inibidores da PCR, além de confirmação de integridade do DNA, as amostras de DNA foram submetidas a PCR convencional que amplifica a região alvo do gene citocromo oxidase (COI) usando os oligonucleotídeos COI-R e COI-F (Tabela 1). Na mistura da PCR, utilizou-se solução tampão 10X, 0,75 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,25µl de Taq DNA Polymerase 1U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada primer a 10pM, 2,0µL de DNA e água Milli-Q® purificada para obter um volume final de 25µL para a reação. A amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos repetitivos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60,2°C, e 1 minuto a 72°C, seguidos por uma extensão final de 72°C por 5 min.

Após PCR do COI, realizou-se *Nested* PCR para identificar DNA de protozoários da família *Trypanosomatidae* nos lagartos. O gene alvo dessa reação foi o 18s RNA. Para a primeira reação, foram utilizados os oligonucleotídeos TRY927-R e TRY927-F (Tabela 1). Na mistura da PCR utilizou-se tampão 10X, 1,0 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,25µl de Taq DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada primer a 10pM, 2,0µL de DNA e água Milli-Q® purificada para obter um volume final de 25µL para a reação. Para amplificação, a desnaturação inicial foi de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos foram repetidos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 62°C e 90 segundos a 72°C, a extensão final foi de 5 minutos a 72°C. Para a realização da segunda reação, foi diluído 1 µL do produto da primeira reação em 50 µL de água Milli-Q®. Para a segunda utilizou-se os oligonucleotídeos SSU561-R e SSU561-F (Tabela 1). Para a mistura utilizou-se tampão 10X, 0,75 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,25µl de Taq DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada

primer a 10pM, 2,0µL do produto da primeira reação que foi diluído e água Milli-Q® purificada para obter um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada nas mesmas condições de ciclos da primeira reação.

Nas amostras positivas na PCR para detecção de tripanosomatídeos, realizou-se PCR para detecção do gene alvo SSU-rRNA de *Leishmania* spp. utilizando os oligonucleotídeos R221 e R332 (Tabela 1). Para a mistura da PCR utilizou-se tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂ a 50mM, 0,2mM de dNTP a 25mmol, 0,2µl de Taq DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®, Calsbad, CA), 1,0µL de cada primer a 10pM, 2,5µL de DNA e água Milli-Q® purificada para obter um volume final de 25µL.

Tabela 1. Oligonucleotídeos e suas características utilizados para detecção de tripanossomatídeos em lagartos do gênero *Tropidurus* do Cerrado Brasileiro.

Primers	Sequencias dos Oligonucleotídeos (5'-3')	Espécie alvo	Gene alvo	Fragmento	Referência
COI-R	TNT TMT CAA CNA ACC ACA AAG A				
COI-F	ACT TCT GGR TGK CCA AAR AAT CA	Répteis	COI	~ 600 pb	(NAGY et al., 2012)
TRY816F	CAG AAA CGA AAC ACG GGA G				
TRY816R	CCT ACT GGG CAG CTT GGA	Trypanosomatidae	18S rRNA	~ 650 pb	(NOYES et al. 1999)
SSU561F	TGG GAT AAC AAA GGA GCA				
SSU561R	CTG AGA CTG TAA CCT CAA AGC				
R221	GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG				
R332	GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG	<i>Leishmania</i> sp.	SSU-rRNA	~ 600 pb	(VAN EYS et al., 1992)

Todas as amostras foram testadas em duplicata. Controles negativos e positivos foram utilizados nas PCR, realizadas no termociclador BioradMyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os produtos de amplificação das reações de PCR para tripanosomatídeos e para *Leishmania* sp. foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, e os produtos de amplificação do gene alvo COI foram separados em gel de agarose a 1,5%. Todos os géis de agarose foram corados em brometo de etídio (Vetec Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) e visualizados sob luz ultravioleta (UV transiluminator®, UVP LLC, Upland, CA). Os produtos de PCR com bandas nos tamanhos esperados para cada conjunto de oligonucleotídeos utilizados foram considerados como positivos.

5 RESULTADOS

Foram utilizadas amostras de sangue de 81 lagartos *Tropidurus* das espécies *T. oreadicus*, *T. semitaeniatus* e *T. itambere*, coletadas na região da Serra das Confusões, próximo ao município de Redenção do Gurgueia, Piauí. As concentrações das espécies foram restritas aos locais de colheita. Observa-se que as amostras coletadas no Piauí estão em maior número de amostras (60/81) e a espécie *T. oreadicus* destacou-se por estar em maior quantidade (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos lagartos considerando o local de coleta e espécie.

Espécies de lagartos <i>Tropidurus</i>				
	<i>T. oreadicus</i>	<i>T. semitaeniatus</i>	<i>T. itambere</i>	Total
Redenção do				
Gurgueia	51 (62,9%)	9 (11,1%)	-	60
Brasília	-	-	21 (25,9%)	21
Total	51	9	21	81

Todas as 81 amostras de lagartos do gênero *Tropidurus* foram positivas para PCR do gene alvo COI, confirmando a presença de material genético dos lagartos nas amostras extraídas, sendo aptas para realização da PCR específica para tripanossomatídeos (Figura 2).

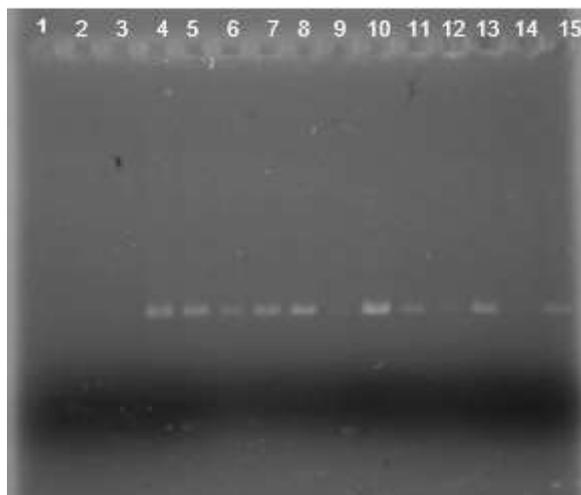


Figura 2- Resultado de ensaio de PCR em gel para o gene alvo COI, utilizando os oligonucleotídeos COI-R e COI-F. Poços 1 e 2 controles negativos; poços 3 a 15 amostras de lagartos do gênero *Tropicurus*.

Das 81 amostras testadas por meio da *Nested* PCR para o gene alvo 18S rRNA, utilizando os oligonucleotídeos TRY927R/TRY927 e SSU561R/SSU561F para detecção de tripanossomatídeos, 33 (40,7%) foram positivas. Das amostras positivas 26 (78,78%) da espécie *T. oreadicus* e 7 (21,21%) da espécie *T. itambere* (Figura 3). Nenhuma amostra de lagartos da espécie *T. semitaeniatus* amplificou na *Nested* PCR para tripanossomatídeos. Os resultados de animais positivos estão dispostos nas Tabelas 3 e 4 de acordo com localização, espécie e sexo.

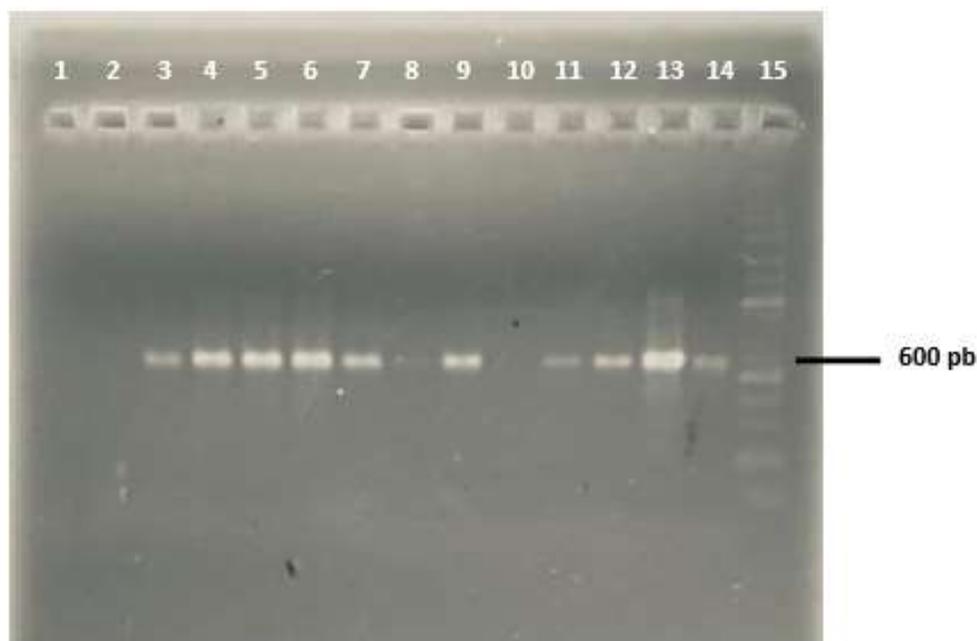


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose (1,5%) da *Nested* PCR para detecção de agentes da família *Trypanosomatidae*, utilizando os oligonucleotídeos TRY927R/TRY927 e SSU561R/SSU561F. Amostras foram testadas em duplicata. Poços 1-2: controle negativo. Poços 3 a 12: amostras de lagartos *Tropidurus* positivas para tripanosomatídeos. Poços 13 – 14: controle positivo. Poço 15: marcador de peso molecular 100pb (*Invitrogen*®)

Tabela 3 – Amostras de *Tropidurus itambere* positivas e negativas para tripanosomatídeos por meio da *Nested* PCR, coletados na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília-DF.

<i>Tropidurus itambere</i>			
	Positivo	Negativo	Total
Macho	5 (23,80%)	6 (28,57%)	11
Fêmea	2 (9,52%)	8 (38,09%)	10
Total	7 (33,32%)	14 (66,66%)	21

Tabela 4 – Amostras de *Tropidurus oreadicus* positivas e negativas para tripanosomatídeos por meio da *Nested* PCR, coletadas na região da Serra das Confusões, localizada próximo ao município de Redenção do Gurgueia no estado do Piauí

<i>Tropidurus oreadicus</i>			
	Positivo	Negativo	Total
Macho	10 (19,60%)	15 (29,41%)	25
Fêmea	16 (31,37%)	10 (19,60%)	26
Total	26 (50,97%)	25 (49,01%)	51

Nenhuma das 33 amostras que amplificaram na *nested* PCR para a família *Trypanosomatidae* foi positiva na PCR para *Leishmania* sp. com base no gene alvo SSU-rRNA.

Nenhum esfregaço sanguíneo apresentou-se positivo na pesquisa direta para agentes tripanossomatídeos. Uma amostra de *T. oreadicus*, 1/26 (3,8%) foi sugestiva de Hemosporídeos e confirmada pela cPCR em outros estudos.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi identificada a ocorrência de infecção por tripanosomatídeos em lagartos *Tropidurus* capturados em duas regiões do Cerrado Brasileiro. Foi observada variação nas espécies e locais de coleta das amostras utilizadas. Do total de amostras analisadas, 25,9% (21/81) foram oriundas da Reserva Ecológica do IBGE, no Distrito Federal, e eram da espécie *T.itambere* (Tabela 2). O restante das amostras analisadas foram oriundas da Serra das Confusões, próximo ao município de Redenção do Gurgueia, no Piauí, e corresponderam a 62,9% (51/81) e 11,1% (9/81) as espécies de *T. oreadicus* e *T. semitaeniatus*, respectivamente (Tabela 2). Essa variação na população de lagartos amostrados pode ser justificada pela característica ampla e heterogênia dos ambientes de Cerrado (RATTER et al, 1997; OLIVEIRA-FILHO & RATTER, 2002). Colli et al, (2002), justificam essa variação devido a “estratificação horizontal do habitat”, o que resulta em uma associação entre as espécies da herpetofauna e as características ambientais, influenciando nas variações das comunidades de lagartos no Cerrado. Outros autores justificaram essas variações baseando-se em fatores climáticos e estrutura do habitat (PANTOJA, 2007; VITT et al, 2007; COSTA et al, 2007; NOGUEIRA et al, 2009). A espécie *T. itambere* está relacionada a ambientes com temperaturas elevadas, baixa umidade e pouca cobertura vegetal, sendo muito observado em áreas abertas com afloramentos rochosos. Esta espécie já foi observada no Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul (NOGUEIRA, 2005; LEDO, 2009; SANTORO, 2016). Cabe salientar que, das espécies amostradas no presente trabalho, apenas a espécie *T. itambere* está presente na lista de répteis da família *Tropiduridae* encontrados na Reserva Ecológica do IBGE, no Distrito Federal (IBGE, 2011).

Os lagartos *T. semitaeniatus* são endêmicos na Caatinga e nos locais próximos ao litoral do Piauí até Salvador (ROGRIGUES, 2005; FREITAS & SILVA, 2007) e podem ser encontrados na porção norte do Cerrado, bem como os lagartos da espécie *T. oreadicus* são considerados endêmicos do Cerrado (NOGUEIRA, 2006). Semelhantemente a espécie *T. itambere*, as espécies *T. oreadicus* e *T. semiateniatus* também possuem preferências por superfícies rochosas (MEIRA, 2003; FARIA & ARAÚJO 2004; SILVA, 2004; SILVA & KOKUBUM, 2011). Relatamos as espécies *T. oreadicus* e *T. semiateniatus* coletadas no mesmo ambiente, diferente dos dados relatados por Faria (2001), que descreveu a ecologia das espécies *T. itambere* e *T. oreadicus* como simpátricas em pesquisas realizadas no Cerrado do

Brasil central. Não há relatos na literatura sobre a presença das espécies *T. oreadicus* e *T. semitaeniatus* encontradas na Serra das Confusões, no Piauí serem simpátricas.

Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram testadas na PCR e amplificaram o fragmento de aproximadamente 600 pb do gene COI. As sequências de oligonucleotídeos (Tabela 1) utilizadas no presente estudo, desenvolvidas por Nagy et al, (2012) demonstram-se eficazes para identificação molecular do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COI) nas espécies amostradas no nosso estudo. No Brasil, Matos et al. (2016) também obtiveram bons resultados com o gene alvo COI em *Tropidurus*, incluindo espécies testadas no presente estudo. Outros genes já foram propostos para identificação molecular de lagartos, como o gene 16S rDNA (VENCES et al, 2005), mas análises do gene COI foram bem-sucedidas (NAGY et al, 2012; VENCES et al, 2012). A amplificação deste gene no presente estudo permitiu confirmar a integridade do DNA extraído e eliminar a presença de possíveis inibidores da PCR nas amostras de DNA dessas espécies, eliminando a possibilidade de resultados falso negativos nos demais ensaios realizados.

Os ensaios de *nested* PCR utilizando os oligonucleotídeos TRY927R/TRY927 e SSU561R/SSU561F, para o gene alvo 18S rRNA da família *Trypanosomatidae* no presente estudo demonstrou uma taxa de infecção nos lagartos de 40,7%. Estudos avaliando o gene ssrRNA da família *Trypanosomatidae*, indicaram que essas sequências de oligonucleotídeos seriam capazes de amplificar espécies de *Leishmania donovani*, *Endotrypanum monterogeii*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens*, *Trypanosoma cruzi* (em mamíferos), *Trypanosoma avium* (em pássaros) e *Trypanosoma rotatorium* (em anfíbios) (NOYES, et al. 1999). Em 2008, Smith e colaboradores identificaram *Trypanosoma* sp. em 81 Marsupiais (*Bettongia penicillata*) na Austrália correspondendo a 26,3% e Santos et al. (2019) pesquisando sobre possíveis reservatórios de *Trypanosoma* em uma área Central do Pantanal brasileiro, identificaram taxa de infecção e co-infecção de *T. cruzi*, *T. rangeli* e *T. evansi* em 43 quatis (*Nasua nasua*) (15,8%), utilizando as mesmas sequências de oligonucleotídeos e protocolo utilizado no presente trabalho, onde encontramos uma porcentagem maior quando comparado a esses estudos, demonstrando que os oligonucleotídeos utilizados são eficazes na identificação de *Trypanosoma* em várias espécies de animais, inclusive em lagartos *Tropidurus*. Não foi encontrado na literatura trabalhos direcionadas a identificação de *Leishmania* sp. utilizando as sequências de oligonucleotídeos citadas. Contudo, todas as 33 amostras positivas para tripanossomatídeos foram testadas para *Leishmania* sp. e todas foram negativas. Com base nesses resultados, podemos inferir que todas as amostras positivas na nPCR para família

Trypanosomatidae estavam provavelmente infectadas por *Trypanosoma* sp. Contudo, há a necessidade de realização do sequenciamento genético para a confirmação do agente responsável pela infecção dos lagartos *Tropidurus* positivos na nPCR no presente estudo.

Das 33 amostras de lagartos positivas identificadas por meio da nPCR, maior taxa de infecção (78,78%) foi observada na espécie *T. oreadicus* da Serra das Confusões, no Piauí e 21,21% corresponderam a espécies *T. itambere* coletadas na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília. No Cerrado, espécies de *Trypanosoma* são descritas principalmente em mamíferos silvestres. Espécies *T. dionisii* e *T. gennarii* foram descritas pela primeira vez em Marsupiais no Cerrado, este último foi agrupado no clado composto por espécies que infectam lagartos no Brasil e na África (FERREIRA et al, 2017; RODRIGUES et al, 2017). Brandão et al. (2020), relataram a presença de *T. cruzi* em canídeos silvestres no Cerrado. Espécies de *Triatoma sordida* foram descritas em associação com lagartos *Tropidurus*, demonstrando uma associação entre vetor-hospedeiro. Minuzzi-Souza et al. (2018), identificaram sangue de lagartos *Tropidurus* em espécies de *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida*, esta última é considerada um importante vetor de *T. cruzi*, ocupa regiões com longos períodos secos e formações abertas, observada no Cerrado brasileiro (CARVALHO et al, 2000; CARVALHO & ALMEIDA, 2011). Cabe salientar que não há dados de detecção de *Trypanosoma* sp. nessas espécies de *Tropidurus* no Cerrado. Apesar do aumento dos estudos identificando espécies de *Trypanosomas* em répteis, incluindo lagartos, essa é a primeira descrição de *Trypanosoma* sp. em *T. itambere* e *T. oreadicus* no Cerrado Brasileiro. No Sul da Tailândia, Toontong et al. (2022) identificaram infecção por tripanossomatídeos pela primeira vez em oito (8) lagartixas de cauda-chata, correspondendo a uma taxa de infecção de 42,1%, corroborando com os resultados do presente estudo. No estudo realizado por Toontong et al. (2022), observou-se que as lagartixas serviram como hospedeiros para *Trypanosoma* sp. mas não tiveram papel significativo na transmissão de tripanossomatídeos patogênicos transmitidos para humanos.

Análises futuras para identificação da espécie de *Trypanosoma* sp. nas amostras positivas encontradas no presente trabalho faz-se necessário. Identificar possíveis novas espécies de *Trypanosomas* parasitando lagartos ou até mesmo espécies patogênicas para o homem, ajudará a compreender a importância do estudo de hemoparasitas nesses animais. A importância dos répteis na epidemiologia de agentes patogênicos para humanos ainda necessita de estudos para completa elucidação, uma vez que é de conhecimento que esses animais podem servir de hospedeiros para esses agentes. Infecções naturais e experimentais estão sendo descritas, com o objetivo de fornecer informações a respeito, principalmente em regiões

endêmicas. Botto-Maham et al. (2022), encontraram uma taxa de infecção de 95,4% de lagartos infectados experimentalmente com *T. brucei* no Chile e demonstraram que houve a transmissão do protozoário para um barbeiro que não estava infectado. No nordeste brasileiro, Lilio et al. (2020) avaliaram o sangue de *Triatoma brasiliensis* e encontraram uma alta taxa de infecção (86%) de *T. petrocchiae* associados a répteis, incluindo *Tropidurus*. A alta taxa de infecção encontrada por Lilio et al. (2020), superior ao presente estudo, pode estar relacionada a amostra utilizada para identificar Trypanosomas, pois foi utilizado sangue do vetor (*T. brasiliensis*) que é encontrado amplamente no nordeste brasileiro.

A identificação de espécies de Trypanosoma em répteis tem sido descrita principalmente através da identificação direta do protozoário pela microscopia de luz, durante avaliação do esfregaço sanguíneo, inclusive em lagartos *Tropidurus* (TELFORD, 1995; PICELLI et al, 2020). No presente trabalho, não foram visualizados tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. nos esfregaços sanguíneos, utilizando microscopia de luz. Apenas uma espécie de *T. oreadicus* apresentou estruturas identificadas como sugestivas de Hemosporídeos e posteriormente confirmada pela técnica de cPCR. Este é o primeiro relato de coinfeções de Hemosporídeos e Trypanosoma sp. em lagartos *Tropidurus* no Cerrado.

7 CONCLUSÃO

Os lagartos do gênero *Tropidurus*, amostrados no presente estudo, demonstraram taxa de infecção moderada, quando comparados estudos identificando infecção por agentes da família *Trypanosomatidae* pelo método molecular *Nested PCR*. Este é o primeiro estudo a identificar *Trypanosoma* sp. em lagartos da espécie *T. oreadicus* e *T. itambere* no Cerrado. Em estudos futuros, o sequenciamento das amostras positivas na *Nested PCR* faz-se necessário para identificar quais são as espécies de *Trypanosomas* que afetam os lagartos *Tropidurus* no Cerrado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRANDÃO, E. M. V; XAVIER, S. C. C; ROCHA, F. L; LIMA, C. F. M; CANDEIAS, Í. Z; LEMOS, F. G; ROQUE, A. L. R. Wild and Domestic Canids and Their Interactions in the Transmission Cycles of *Trypanosoma Cruzi* and *Leishmania spp.* in an Area of the Brazilian Cerrado. **Pathogens**, 9(10), 818. 2020. doi:10.3390/pathogens9100818
- BOTTO-MAHAN, C. *et al.* Lizards as Silent Hosts of *Trypanosoma cruzi*. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 28, No. 6. 2022. <https://doi.org/10.3201/eid2806.220079>
- CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, 56, 250–276. 2016. doi:10.1016/j.ejop.2016.09.003
- CARCAVALLO, R. U; JURBERG, J; LENT, H; NOIREAU, F; GALVÃO, C. Phylogeny of the *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae): Proposals for taxonomic arrangements. **Entomología y Vectores**, 7: 1-99. 2000.
- CARVALHO, C. J. B; ALMEIDA, E. A. B. Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos. Editora Roca, São Paulo, 306p. 2011.
- COLLI, G.R., BASTOS, R.P. & ARAÚJO, A.F.B. The character and dynamics of the Cerrado herpetofauna. In *The Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a Neotropical Savanna* (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds.). Columbia University Press, New York, p.223-241. 2002.
- COSTA, G. C; NOGUEIRA, C; MACHADO, R. B; COLLI, G. R. Squamate richness in the Brazilian Cerrado and its environmental-climatic associations. *Diversity and Distributions*, 13, 714–724. 2007.
- DESQUESNES M., GONZATTI M., SAZMAND A., *et al.* A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. **Parasites & Vectors** .2022. doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1
- EBANI, V. V. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: A mini review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2017. 10(8), 723–728. doi:10.1016/j.apjtm.2017.07.020
- FARIA, R. G. Ecologia de duas espécies simpátricas de Tropiduridae (*Tropidurus itambere* e *Tropidurus oreadicus*) no Cerrado do Brasil Central. Dissertação: Instituto de Biologia. Pós-Graduação em Ecologia, 2001.
- FARIA, R.G; ARAÚJO, A.F.B. Sintopy of two *Tropidurus* lizard species (Squamata: Tropiduridae) in a rocky cerrado habitat in Central Brazil. **Brazilian Journal Biololy**. 64(4): 775-786. 2004.
- FERREIRA, J. I. G. S; COSTA, A. P; NUNES, P. H; RAMIREZ, D; FOURNIER, G. F. R; SARAIVA, D. *et al.* New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from South American marsupial in Brazilian Cerrado. **Acta Tropica**, 176, 249–255, 2017. doi:10.1016/j.actatropica.2017.08.018
- FREITAS, M.A.; SILVA, T.F.S. Guia ilustrado: A herpetofauna das caatingas e áreas de altitudes do nordeste brasileiro. Pelotas: USEB. (Coleção Manuais de Campo USEB, 6) 2007.
- HOARE, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. Life-Cycle in the Tsetse-fly and in the Crocodile. **Parasitology**. 1931. doi:10.1017/s0031182000013858

IBGE: Reserva Ecológica do IBGE / Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais; Mauro Lambert Ribeiro, organizador. - Rio de Janeiro: IBGE, 2011

KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 8 dez. 2017.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista pan-Amazônica de saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010. ISSN 2176- 6223.

LEDO, R. M. D. Estruturas de Comunidades e Biogeografia de Lagartos em Matas de Galeria do cerrado. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, 128, 2009.

LILIOSO, M; PIRES-SILVA, D; VON HERTWIG, F; OLIVEIRA, J; DA ROSA, J. A; VILELA, R. V; ALMEIDA, C. E. *Triatoma petrocchia* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): A Chagas disease vector of *T. brasiliensis* species complex associated to reptiles. *Infection, Genetics and Evolution*, 82, 104307. 2020. doi:10.1016/j.meegid.2020.104307

MASLOV, D. A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends in parasitology**, v. 29, n. 1, p. 43-52, 2013. ISSN 1471-4922.

MATOS, N. B; FERREIRA, M; SILVA, F; RODRIGUES, M. T; SANTOS, E; GARCIA, C. Taxonomy and Evolution of *Tropidurus* (*Iguania*, *Tropiduridae*) Based on Chromosomal and DNA Barcoding Analysis. **Journal of Herpetology**, 50(2), 316–326. 2016. doi:10.1670/13-221

MENDOZA-ROLDAN, J; MODRY, D; OTRANTO, D. Zoonotic parasites of reptiles: a crawling threat. **Trends in Parasitology**. 2020. doi:10.1016/j.pt.2020.04.014

MENDOZA-ROLDAN JA, ZATELLI A, LATROFA MS, IATTA R, BEZERRA-SANTOS MA, ANNOSCIA G, *et al.* Leishmania (*Sauroleishmania*) *tarentolae* isolation and sympatric occurrence with Leishmania (*Leishmania*) *infantum* in geckoes, dogs and sand flies. *PLoS Negl Trop Dis* 16(8): e0010650. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010650>

MINUZZI-SOUZA, T. T. C; SILVA, L. R; HAGSTRÖM, L; HECHT, M; NITZ, N; GURGEL-GONÇALVES, R. Molecular bloodmeal analyses reveal that *Trypanosoma cruzi* -infected, native triatomine bugs often feed on humans in houses in central Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**. 2018. doi:10.1111/mve.12324

NAGY, Z. T; SONET, G; GLAW, F; VENCES, M. First Large-Scale DNA Barcoding Assessment of Reptiles in the Biodiversity Hotspot of Madagascar, Based on Newly Designed COI Primers. *PLoS ONE*, 7(3), e34506. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0034506

NOGUEIRA, C; VALDUJO, P. H; FRANÇA, F. G. R. Habitat variation and lizard diversity in a Cerrado area of Central Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 40: 105-112. 2005.

NOGUEIRA, C. C. Diversidade e padrões de distribuição da fauna de lagartos do Cerrado. 295 páginas Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Ecologia, 2006.

- NOGUEIRA, C., COLLI, G.R. & MARTINS, M. Local richness and distribution of the lizard fauna in natural habitat mosaics of the Brazilian Cerrado. *Aust. Ecol.* 34:83-96. 2009.
- NOYES, H. A., STEVENS, J. R., TEIXEIRA, M., PHELAN, J. AND HOLZ, P. 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, 331–339. 1999.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T; A. J. RATTER. Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome, p. 91-120. In: The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna. P. S. Oliveira e R. J. Marquis (eds.). Columbia University Press, New York. 2002.
- ORTIZ S; SOLARI A. Excavata-Kinetoplastea Trypanosomatidae parasitas e a interação com seus hospedeiros. **Int J Trop Dis** 2019; 2: 015. <http://dx.doi.org/10.23937/IJTD-2017/1710015>.
- PANTOJA, D. L. L. Efeito do fogo sobre a taxocenose de lagartos em áreas de Cerrado sensu stricto no Brasil Central. 114. Tese. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília. 2007.
- PICELLI A, M., RAMIRES A, C., MASSELI F, A. S. Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscopy. **An Acad Bras Cienc.** 2020. 92(2): e20200428 DOI 10.1590/0001-3765202020200428
- RATTER, J. A; RIBEIRO, J. F; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223-230. 1997.
- RODRIGUES, M. T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. *Megadiversidade*, 1, 87–94. 2005.
- RODRIGUES, M. S; LIMA, L; XAVIER, S. C; HERRERA, H. M; ROCHA, F. L; ROQUE, A. L. R; JANSEN, A. M. Descobrendo *Trypanosoma spp.* diversidade de mamíferos selvagens pelo uso de DNA de coágulos sanguíneos. **Revista Internacional de Parasitologia: Parasitas e Vida Selvagem.** 2019. doi:10.1016/j.ijppaw.2019.02.004
- SANTORO, G. R. C. C. Ecologia e conservação de comunidades de lagartos em três Parques Nacionais do Cerrado no Planalto Central brasileiro. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade de Brasília. 139 p. 2016.
- SANTOS, M. F; BARRETO, W. T. G; MACEDO, G. C; BARROS, J. H. S; XAVIER, S. C. C; GARCIA, C. M. et al. The reservoir system for *Trypanosoma (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)* species in large Neotropical wetland. **Acta Tropica**, 2019. doi:10.1016/j.actatropica.2019.105098
- SILVA, W.Z. Influência das táticas de forrageamento na ecologia e reprodução de *Tropidurus oreadicus* e *Cnemidophorus ocellifer* para uma área de cerrado rupestre do Brasil Central. Faculdades da Terra de Brasília, Distrito Federal. 2004.
- SMITH, A; CLARK, P; AVERIS, S; LYMBERY, A. J; WAYNE, A. F; MORRIS, K. D; THOMPSON, R. C. A. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, 135(11). 2008. doi:10.1017/s0031182008004824

TELFORD S.R. The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles, In: JP Kreier, Parasitic Protozoa, 2nd, ed0, vol 10 . San Diego: Academic Press. 1975.

TOONTONG, P.; SUNANTARAPORN, S.; TIAWSIRISUP, S.; PENGSAKUL, T.; BOONSERM, R.; PHUMEE, A.; SIRIYASATIEN, P.; PREATIVATANYOU, K. First Report of Anuran Trypanosoma DNA in Flat-Tailed House Geckos (Reptilia: Gekkonidae) Collected from Southern Thailand: No Evidence as a Reservoir for Human Trypanosomatids. **Pathogens** 2022, 11, 247. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020247>

VÁCLAV, R., FICOVÁ, M., PROKOP, P., & BETÁKOVÁ, T. Associations Between Coinfection Prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in Hard Ticks Feeding on Reptile Hosts. **Microbial Ecology**, 61(2), 245–253. 2010. doi:10.1007/s00248-010-9736-0

VAN EYS, G. J. J. M., SCHOONE, G. J., KROON, N. C. M., et al. "Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites", **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133–142, 1992. DOI: 10.1016/0166-6851(92)90208-2.

VENCES, M., M. THOMAS, R. M. BONETT, AND D. R. VIEITES. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 360:1859–1868. 2005.

VENCES, M., Z. T. NAGY, G. SONET, AND E. VERHEYEN. DNA barcoding amphibians and reptiles. Pp. 79–107 in *DNA Barcodes*. **Humana Press**. DOI 10.1007/978-1-61779-591-6-5. 2012.

VITT, L. J; COLLI, G. R; CALDWELL. J. P; MESQUITA, D. O; GARDA, A. A; FRANCA, F. G. R. Detecting variation in micro-habitat use in low-diversity lizard assemblages across small-scale habitat gradients. **Journal of Herpetology**. 41 (4):654-663, 2007.

VOTÝPKA, J., D'AVILA-LEVY, C. M., GRELLIER, P., et al. "New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description", **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2015.06.015.

ZHANG, J.-R., GUO, X.-G., CHEN, H., LIU, J.-L., GONG, X., CHEN, D.-L., & CHEN, J.-P. Pathogenic *Leishmania* spp. detected in lizards from Northwest China using molecular methods. **BMC Veterinary Research**, 15(1). 2019. doi:10.1186/s12917-019-2174-4

ZHANG, J.-R., GUO, X.-G., LIU, J.-L., ZHOU, T.-H., GONG, X., CHEN, D.-L., & CHEN, J.-P. Molecular detection, identification and phylogenetic inference of *Leishmania* spp. in some desert lizards from Northwest China by using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. **Acta Tropica**, 162, 83–94. 2016. doi:10.1016/j.actatropica.2016.06