

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Detecção de Kinetoplastea em *Crotalus durissus* e *Bothrops moojeni* Mantidas em Cativeiro

Autor: Wesley Arruda Gimenes Nantes  
Orientadora: Ana Maria Jansen  
Coorientador: Heitor Miraglia Herrera

"Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: “Sustentabilidade Ambiental e Produtiva” Aplicada à “Saúde, Ambiente e Sustentabilidade”

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Dezembro - 2023

N191d Nantes, Wesley Arruda Gimenes  
Detecção de Kinetoplastea em *Crotalus durissus* e *Bothrops moojeni* mantidas em cativeiro/ Wesley Arruda Gimenes  
Nantes sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Jansen.--  
Campo Grande, MS : 2024.  
83 p.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande- MS, 2024  
Bibliografia: p. 47- 67

1. Tripanosomatídeos. 2. Viperidae. 3. NGS. 4. Serpentes  
I.Jansen, Ana Maria. II. Título.

CDD: 597.96

## **Detecção de Kinetoplastea em *Crotalus durissus* e *Bothrops moojeni* Mantidas em Cativeiro**

**Autor:** Wesley Arruda Gimenes Nantes

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Maria Jansen

**Coorientador:** Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

**TITULAÇÃO:** Detecção de Kinetoplastea em *Crotalus durissus* e *Bothrops moojeni* Mantidas em Cativeiro

**Área de Concentração:** Sustentabilidade Ambiental e Produtiva.

APROVADO em 20 de dezembro de 2023

A presente defesa foi realizada por webconferência. Eu, Ana Maria Jansen, como presidente da banca assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros, ainda na presença destes.



Prof. Dra. Ana Maria Jansen – UCDB/FIOCRUZ/IOC(RJ)

Profa. Dr. Heitor Miraglia Herrera - UCDB

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira- UCDB

Profa. Dra. Paula Helena Santa Rita- UCDB

Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan- FIOCRUZ/IOC(RJ)

Prof. Dr. Fernando Paiva- UFMS

## EPÍGRAFE

**“Passava os dias ali, quieto,  
no meio das coisas miúdas.  
E me encantei.”**

- Manoel de Barros

## DEDICATÓRIAS

Dedico esse trabalho à minha eterna saudade - meu irmão Wilker (em memória).

Ao meu irmãozinho Henrique que me trouxe tanta felicidade nos últimos quatro anos, aos meus pais Margarida e Eduardo, todos os familiares que me deram suporte para chegar aqui e ao Hachiko, meu cãopanheiro de quase 13 anos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus pela força e suporte durante todos esses anos.

À minha mãe, Margarida Maria de Arruda: obrigado por sempre ter feito o possível e o impossível pra que eu chegasse até aqui e por todo seu amor incondicional. Ao meu pai, Eduardo Gimenes Nantes: obrigado por me apoiar em tudo que decidi fazer até aqui e pelo seu amor.

Ao meu irmão, Wilker Gonçalves Camargo Nantes (em memória): agradeço por tudo que me ensinou durante o tempo que pudemos dividir juntos. A saudade que sinto sempre me deu o dobro de força pra continuar e nunca desistir. Ao meu irmãozinho, Henrique de Arruda Cunha Freire: agradeço pela luz e alegria que você me trouxe justamente durante o período do meu doutorado, obrigado por tanto amor - espero que leia minha tese quando aprender a ler (risos).

Aos meus familiares, em especial Tia Bete e Tia Rosa, obrigado por cada palavra de conforto e incentivo, obrigado por acreditarem em mim. Vocês me ajudaram muito pra que eu pudesse chegar aqui e continuasse sonhando.

Aos meus orientadores, antes do agradecimento individual, gostaria de dizer que grande parte do pesquisador que me tornei é reflexo de tanto tempo compartilhado com vocês e tantas lições que aprendi nessa caminhada. Assim como uma criança que descobre o mundo, eu descobri a ciência e a pesquisa com vocês, segurando minha mão quando precisei, me dando autonomia pra caminhar sozinho quando necessário e puxando a minha orelha quando foi preciso. Vocês possuem minha eterna gratidão e admiração.

À minha orientadora, Ana Maria Jansen: obrigado por acreditar em mim, por ter me dado a oportunidade de aprender tanto, por ter se disponibilizado tanto pra me ajudar na construção desse trabalho – inclusive vindo do Rio de Janeiro para Campo Grande. Jamais esquecerei daquela nossa semana intensa de trabalho, foi uma honra ter construído essa memória. Agradeço por, além o trabalho, ter dividido histórias pessoais e também por ter ouvido sobre as minhas. Levar a senhora ao aeroporto em

um Fusca 76 (carro que descobri que a senhora sabe muito sobre) é um momento especial e divertido que guardo comigo.

Ao meu orientador Heitor Miraglia Herrera: obrigado por ter me acolhido ainda na Iniciação Científica (PIBIC) e por sempre ter visto meu potencial. Obrigado por insistir que eu voltasse para o grupo e fizesse o doutorado com vocês. Agradeço por todo suporte e oportunidades que o senhor me deu ao longo dessa nossa história, por ter confiado em mim em inúmeras situações e por ter me dado as primeiras oportunidades de lecionar. São dez anos de memórias, aprendizado e parceria que jamais esquecerei.

Professora Carina, obrigado por ter participado durante minha graduação, mestrado e agora doutorado. A senhora contribuiu significativamente em todos esses processos e sempre esteve a disposição para eventuais dúvidas, além de ter participado ativamente nessa pesquisa através da clonagem, sequenciamento e qualificação. Muito obrigado!

Muito obrigado à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado, à UCDB (Universidade Católica Dom Bosco) pela estrutura e suporte, ao coordenador do Programa Pós-graduação em Ciências Ambientais e sustentabilidade Agropecuária, Prof. Dr. Denilson de Oliveira Guilherme às secretárias Daiane D. Oliveira e Luciana Fukuhara Barbosa (secretária do Programa Pós-graduação em Biotecnologia) pelo suporte durante o curso.

À minha companheira, Sany Caroline Liberal: Obrigado pelo amor e pela parceria nesse período. Agradeço não somente por me ajudar diretamente na construção desses dados, auxiliando em coleta e no processo de clonagem, mas também por me apoiar nos momentos delicados dessa caminhada.

Agradecimento especial Clínica Escola da UCDB, à Clara Costa Barroso (no período de 2022 acadêmica do último ano de psicologia), ao Josué Marco Neto (no período de 2023 acadêmico do último ano de psicologia) pelo atendimento realizado. Esse momento de terapia com vocês foi muito importante para que eu me tornasse uma pessoa melhor e conseguisse estar bem para concluir meu objetivo, tive sorte grande de ter pessoas maravilhosas com as quais pude me abrir.

Ao Biotério UCDB, representado ela Dra. Paula Helena Santa Rita, Luka Moraes, José Augusto, Fernanda Alves e todos os estagiários que por lá passaram durante a minha pesquisa, meu muito obrigado por me receber tão bem e pelo tempo que dedicaram para me ajudar. Dra. Paula, muito obrigado por me receber como

estagiário há 10 anos quando iniciava a graduação e me ensinar tanto, obrigado por me incentivar a fazer o mestrado no grupo de pesquisa do qual faço parte até hoje e principalmente por sempre manter as portas do biotério abertas. Dessa forma pude realizar minha pesquisa de TCC com serpentes e finalizo esse “ciclo de formação acadêmica” da forma que comecei. É um sentimento muito gratificante!

À FIOCRUZ/IOC (RJ): Obrigado, Dr. André Roque e Larissa Sousa, pela troca e contribuição envolvida nos projetos envolvendo as serpentes, foi um prazer ter tido essa experiência. Maria Augusta, muito obrigado por toda ajuda na parte de filogenia, pelas reuniões e toda sua contribuição nesse trabalho. Bruno Alves, obrigado mais uma vez pelo suporte e paciência nos processos de envio dos meios de cultura. Agradeço também todos os outros profissionais da instituição que participaram diretamente ou indiretamente nesse trabalho.

Muito obrigado, Dra. Alessandra Gutierrez e Jucelei de Oliveira (Ju) - UFMS. Foi uma honra ter sido tão bem recebido no laboratório de vocês e aprendido tanta coisa nova em pouco tempo. Obrigado pela contribuição na montagem da lâmina e identificação do flebotomíneo, um processo totalmente novo para mim.

Aos meus amigos Andreza Rucco, Lincoln Mukoyama e Gabriela Melo, obrigado pelo suporte em um dos momentos mais complicados que passei e também por sempre poder contar com vocês para qualquer dificuldade que a vida me apresentasse, sem vocês teria sido extremamente difícil passar por tudo isso. Lincoln, obrigado também pela ajuda nas minhas coletas e no processamento das amostras no laboratório.

Aos meus amigos Oscar Jr., Gabriel Carvalho, Nayara Sano, Caroline Paes, Artur Matinelli, William Assis, Breno Emanuel e todo o grupo Insana Huna pelos cafés, pelas conversas, tantos momentos de descontração, parceria e por toda contribuição nesses anos. Em especial, obrigado Filipe Martins Santos, por toda ajuda na construção dos projetos que escrevi e principalmente pela análise estatística e discussões envolvendo esse trabalho. Obrigado, Márcio e Grasi pela amizade e contribuição na minha vida durante esse período.

Obrigado aos alunos de iniciação científica da graduação e ensino médio que pude orientar durante esses anos, em especial à Katrine Berres, Maria Eduarda e Mariana Simey.

Obrigado, Alexandra Elbakyan, por garantir que eu tivesse acesso à inúmeros artigos e por democratizar o acesso ao conhecimento.

Obrigado aos meus companheiros de banda e de jiu jitsu, duas atividades que sempre me ajudaram a me manter saudável mentalmente e fisicamente.

Por último e não menos importante, meu muito obrigado ao meu fiel companheiro de quatro patas, Hachiko. Os mais próximos sabem o quanto o amo, mas pouco sabem ou entendem o tanto que ele já fez por mim nesses quase 13 anos juntos. Por muitas vezes éramos só nós dois e, em momentos que tive crise de ansiedade, que estava cansado ou que estava bem, ele esteve presente da mesma forma. Tive que dar alguns passos maiores por ele e não me arrependo de nada, graças a tudo isso amadureci e me tornei quem sou.

Obrigado a todos que acreditaram em mim e em algum momento da minha vida me incentivaram e/ou me deram suporte pra que eu chegasse aqui.

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiv
<b>RESUMO</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	2
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	3
1. SERPENTES	3
1.2. SERPENTES NO BRASIL	7
2. FLEBOTOMÍNEOS	8
3. CLASSE KINETOPLASTEA	9
3.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE	10
3.1.1. GÊNERO <i>Trypanosoma</i>	12
3.1.2. GÊNERO <i>Leishmania</i>	16
4. TRYPANOSOMATIDAE EM SERPENTES	18
<b>METODOLOGIA</b>	20
<b>RESULTADOS</b>	26
<b>DISCUSSÃO</b>	35
<b>CONCLUSÕES</b>	41
<b>REFERÊNCIAS</b>	43

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Valores dos testes de diluição de DNA genômico de serpente com concentração em ng/µL e os valores de absorbância (A260/A280).	..... 26
<b>Tabela 2.</b> Amostras de <i>Bothrops moojeni</i> e <i>Crotalus durissus</i> positivas para Trypanosomatidae e o período dos registros de entrada no Biotério UCDB.	..... 27

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Origem evolutiva do clado Serpentes por tempo de divergência inferida usando topologia restrita. A linha vermelha que separa as eras Mesozóica e Cenozóica marca a fronteira Cretáceo-Paleógeno (K-Pg) em 66 Ma. A escala de tempo é em milhões de anos. As caixas coloridas indicam os principais clados. Os táxons fósseis são marcados com uma adaga (†). Os nomes dos táxons acinzentados indicam espécies existentes que são incluídas exclusivamente com base em dados fenotípicos (Hsiang et al., 2015).	..... 4
<b>Figura 2.</b> Reconstrução da serpente ancestral do “crown-group” de acordo com o estudo de Hsiang et al. (2015). Arte: Julius Csotonyi.	..... 5
<b>Figura 3.</b> Distribuição das espécies de serpentes conhecidas até dezembro de 2020 através do globo (Uetz et al., 2021).	..... 5
<b>Figura 4.</b> Ilustração dos tipos de dentição encontrados nas serpentes: ágliga (A), opistóglifa (B), proteróglifa (C) e solenóglifa (D).	..... 6
<b>Figura 5.</b> Distribuição geográfica das serpentes <i>Bothrops moojeni</i> (A) (Giraudo et al., 2021) e <i>Crotalus durissus</i> (B) (Cacciali et al., 2021) na América do Sul.	..... 8
<b>Figura 6.</b> Repositionamento da bolsa flagelar (BF - em laranja) em relação ao cinetoplasto (kDNA - em verde) e ao núcleo (em roxo) em diferentes formas de um flagelado (modificado de FIELD; CARRINGTON, 2009).	..... 11

<b>Figura 7.</b> Clados de espécies do gênero <i>Trypanosoma</i> . Fonte: RODRIGUES (2019), adaptado de BOTERO et al., 2013 e FERREIRA et al., 2017.	.....15
<b>Figura 8.</b> Análise evolutiva da família Trypanosomatidae baseada na região de codificação da sequência do maxicírculos (Solana et al., 2022).	.....18
<b>Figura 9.</b> Pontos de instalação de armadilhas luminosas tipo CDC-LT (ícones) o Biotério UCDB e no entorno da reserva Surucuá. <b>A:</b> ampliação da estrutura física do Biotério evidenciando os pontos de instalação das armadilhas na parte interna e externa do prédio; <b>B:</b> ampliação da sala em que as serpentes eram mantidas com duas armadilhas instaladas no interior; <b>C:</b> armadilha instalada na parte externa do prédio.	.....25
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica da detecção de DNA de Kinetoplastea através do sequenciamento de nova geração (NGS) por indivíduo (todos <i>C. durissus</i> - exceção de UCDB687, único <i>B. moojeni</i> ) e separados por tempo de cativeiro.	.....29
<b>Figura 11.</b> Árvore filogenética do clado <i>Trypanosoma cruzi</i> baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (TIM2 + G) e BI - Inferência Bayesiana (SYM + I + G). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). O fundo verde indica o grupo formado por <i>T. cruzi</i> DTU TcII/TcVI e o fundo azul indica as sequências identificadas como <i>Trypanosoma</i> sp. DID.	.....30

- Figura 12.** Árvore filogenética de *Leishmania* spp. baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (TN93e) e BI - Inferência Bayesiana (K80e). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). Os quadrados vermelho, amarelo e azul correspondem aos complexos *L. infantum/donovani*, *Leishmania* (*Leishmania*) e *L. (Viannia)*, respectivamente. A ASV6 ficou agrupada com sequências de *Leishmania* do complexo *L. infantum/donovani*, enquanto que AV7 ficou agrupada com sequências do complexo *Leishmania* (*Leishmania*). ..... 31
- Figura 13.** Rede de haplótipos de *Trypanosoma cascavelli* construída com sequências do gene 18S rDNA de amostras de diferentes vertebrados. O tamanho de cada nó é proporcional à frequência da sequência. O círculo preto pequeno representa o vetor mediano. O fundo vermelho representa *T. cascavelli* que ocorre apenas em marsupiais; o fundo azul representa *T. cascavelli* que ocorre em serpentes e marsupiais; o fundo verde representa *T. cascavelli* que ocorre apenas em serpentes. O ponto cinza representa *Trypanosoma* sp. 910 (EU095838), intimamente relacionado à tripanossomatídeo de serpentes que ocorrem em flebotomíneo (grupo externo). As sequências de *T. cascavelli* utilizadas na análise foram: PCE51 (MH411650); PCE53 (MH411651); PCE55 (MH411652); PCE384 (MH411653); PCE410 (MH411656); COLTRYP00624 (MF141867); 693 (EU095845); 632 (EU095844); 631 (EU095843); 630 (EU095842); 629 (EU095841); 621 (EU095840); 425 (EU095837); LBT12589 (OP508234); LBT12598 (OP508235); ASV6 (OQ282855); ASV4 (presente estudo - OR434344). ..... 32

- .....33
- Figura 14.** Árvore filogenética da ordem Trypanosomatida baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (TIM2 + I + G) e BI - Inferência Bayesiana (GTR + I + G). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). O fundo vermelho representa um novo gênero de tripanossomatídeo estreitamente relacionado à Trypanosomatidae sp.
- .....34
- Figura 15.** Árvore filogenética da classe Kinetoplastea baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (GTR + I +G) e BI - Inferência Bayesiana (GTR + I + G). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). As cores de fundo representam as seguintes ordens: azul - Trypanosomatida; verde – Eubodonida; amarelo – Neobodonida; roxo – Parabodonida. A ASV5 agrupou-se com sequências de Neobodo da ordem Neobodonida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
BF	Bolsa Flagelar
BI	Inferência Bayesiana
cm	Centímetros
cyt b	Citocromo b
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTU	Unidade Discreta de Tipagem
g	Gramas
gRNA	RNA guia
gGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h	hora
HSP70	Proteína de Choque Térmico de 70 kD
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ITS1	Espaçador Interno Transcrita 1
kDNA	DNA mitocondrial
kb	Quilobase
LIT	Liver Infusion Tryptose
m	metro
ML	Máxima Verossimilhança
mm	Milímetro
MOTU	Unidade Taxonômica Molecular Operacional
MS	Mato Grosso do Sul
ng	Nanograma
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NNN	Nicole, Novy, McNeal
nPCR	<i>nested</i> PCR
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossómico
SSU	<i>Small Subunit</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UCDB	
µl	microlitro

## RESUMO

Embora reportada uma vasta riqueza de serpentes no mundo, os estudos que envolvem a diversidade parasitária desse grupo e possíveis relações ecológicas com o efeito do parasitismo ainda são escassos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a riqueza de tripanosomatídeos em 33 *Bothrops moojeni* e 73 *Crotalus durissus* resgatadas no Estado de Mato Grosso do Sul e mantidas em cativeiro no Biotério UCDB. O sangue dos animais foi coletado para cultura, exame a fresco, diagnóstico molecular e esfregaço sanguíneo. A extração de DNA ocorreu a partir do coágulo. O DNA foi utilizado no diagnóstico molecular com alvo específico para a família Trypanosomatidae que revelou 36 animais parasitados (apenas uma *B. moojeni*) em 106 avaliados. As amostras das serpentes infectadas foram enviadas para sequenciamento de nova geração (NGS), que revelou a presença de *Trypanosoma cruzi* TcII/TcVI, *Leishmania* sp., *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cascavelli*, *Trypanosoma* sp. DID e uma nova Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU), Trypanosomatidae sp. CROT. Além disso, análise filogenética revelou a presença de *Neobodo* sp. Todos os testes parasitológicos foram negativos. Não houve diferença estatística quanto a infecção em relação aos machos e fêmeas. Apesar da relação com marsupiais, a rede haplotípica sugere que as serpentes foram hospedeiras originais de *T. cascavelli*. As serpentes apresentam a capacidade de manter infecção por *T. cruzi* e *L. infantum* por até 20 anos. Além disso, a utilização de NGS (sequenciamento de nova geração) contribui significativamente para o conhecimento da diversidade de Kinetoplastea e de seus hospedeiros, entretanto essa diversidade ainda é subestimada.

Palavras-chave: tripanosomatídeos, Viperidae, NGS, serpentes

## ABSTRACT

Although a large richness of snakes is reported in the world, studies involving the parasitic diversity of this group and possible ecological relationships with the effect of parasitism are still scarce. Therefore, the present study aimed to investigate the richness of trypanosomatids in 33 *Bothrops moojeni* and 73 *Crotalus durissus* rescued in the State of Mato Grosso do Sul and kept in captivity at the UCDB bioterium. Blood samples were collected for culture, thick blood smear, molecular diagnosis and blood smear. DNA was extracted from blood clots and used in molecular diagnosis with a specific target for the Trypanosomatidae family, which revealed 36 parasitized animals (only one *B. moojeni*) out of 106 assessed. Samples from parasitized snakes were sent for Next Generation Sequencing (NGS), which revealed the presence of *Trypanosoma cruzi* TcII/TcVI, *Leishmania* sp., *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cascavelli*, *Trypanosoma* sp. DID and a new Molecular Operational Taxonomic Unit (MOTU), Trypanosomatidae sp. CROT. Additionally, phylogenetic analysis revealed the presence of *Neobodo* sp. All parasitological tests were negative. There was no statistical difference regarding infection in males and females. Despite the relationship with marsupials, the haplotypic network suggests that snakes were the original hosts of *T. cascavelli*. Snakes have the capacity to maintain infection by *T. cruzi* and *L. infantum* for up to 20 years. Furthermore, the use of NGS (next generation sequencing) significantly contributes to the knowledge of the diversity of Kinetoplastea and their hosts, however this diversity is still underestimated.

Keywords: trypanosomatids, Viperidae, NGS, snakes

## INTRODUÇÃO

Atualmente há descrito em literatura 4.038 espécies de serpentes (Uetz et al., 2022), sendo 430 espécies encontradas no Brasil (Costa et al., 2022). As serpentes desempenham um importante papel ecológico, seja como predadores ou presas dentro da estrutura da teia alimentar, além da importância no fluxo de energia devido à sua abundância e tamanho considerável (Pomianowska-Pilipiuk, 1974). Além disso, muitas espécies podem ser utilizadas como bioindicadoras da condição ambiental devido às suas associações com microhabitats específicos (Burger et al. 2007).

Répteis são conhecidos hospedeiros de uma grande variedade de parasitos, (Davies; Johnston, 2000; Telford, 2009) que variam de protozoários cinetoplastídeos (Killick-Kendrick et al., 1986; Telford, 1995) e apicomplexos (Levine, 1988; Viana et al., 2013; O'donoghue, 2017), à nematoídes microfilarídeos (Thoisy et al., 2000; Halla et al., 2014), assim como vírus e bactérias (Telford, 2009). Esses microrganismos estão ecologicamente envolvidos em mecanismos que regulam as populações silvestres, como especiação e extinção de espécies (Tompkins; Begon 1999, Thomas et al., 2000), porém, existe uma escassez de trabalhos com répteis, que pode estar relacionada com a dificuldade na captura e manejo dos animais (Cubas et al., 2014).

Dentre os hemoparasitas, os tripanossomatídeos constituem um táxon com grande sucesso evolutivo por parasitar diferentes grupos de hospedeiros como plantas (Jaskowska et al., 2015), insetos (Runckel et al., 2014) e mamíferos (Roque; Jansen, 2014) ao redor do mundo. Embora existam alguns estudos acerca da investigação de tripanossomatídeos em serpentes (Viola et al., 2008 e 2009; Halla et al., 2014; Chen et al., 2019), a utilização de ferramentas moleculares com maior poder analítico vem revelando em hospedeiros vertebrados que a riqueza de tripanosomatídeos é bem maior do que se tinha conhecimento, como observado em Alves et al. (2023) e Santos et al. (2022a).

Hipótese: o tempo de cativeiro de *B. moojeni* e *C. durissus* possui uma relação inversa à riqueza de tripanosomatídeos, ou seja, quanto maior o tempo de cativeiro menor a riqueza de tripanosomatídeos.

## OBJETIVOS

### **Objetivo Geral**

Identificar as espécies de tripanossomatídeos que infectam *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* resgatadas no Estado de Mato Grosso do Sul e mantidas em cativeiro entre 2000 e 2022.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Padronizar a *nested* PCR do gene 18S rDNA para amostras de coágulo de serpentes;
- 2) Investigar se existe diferença de riqueza e/ou taxa de infecção por tripanossomatídeos entre *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro;
- 3) Determinar se existe diferença na taxa de infecção por tripanossomatídeos entre machos e fêmeas de *Crotalus durissus* mantidas em cativeiro;
- 4) Verificar se o tempo de cativeiro pode influenciar na riqueza de tripanossomatídeos em *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus*;
- 5) Coletar e identificar flebotomíneos no Biotério UCDB e seu entorno.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

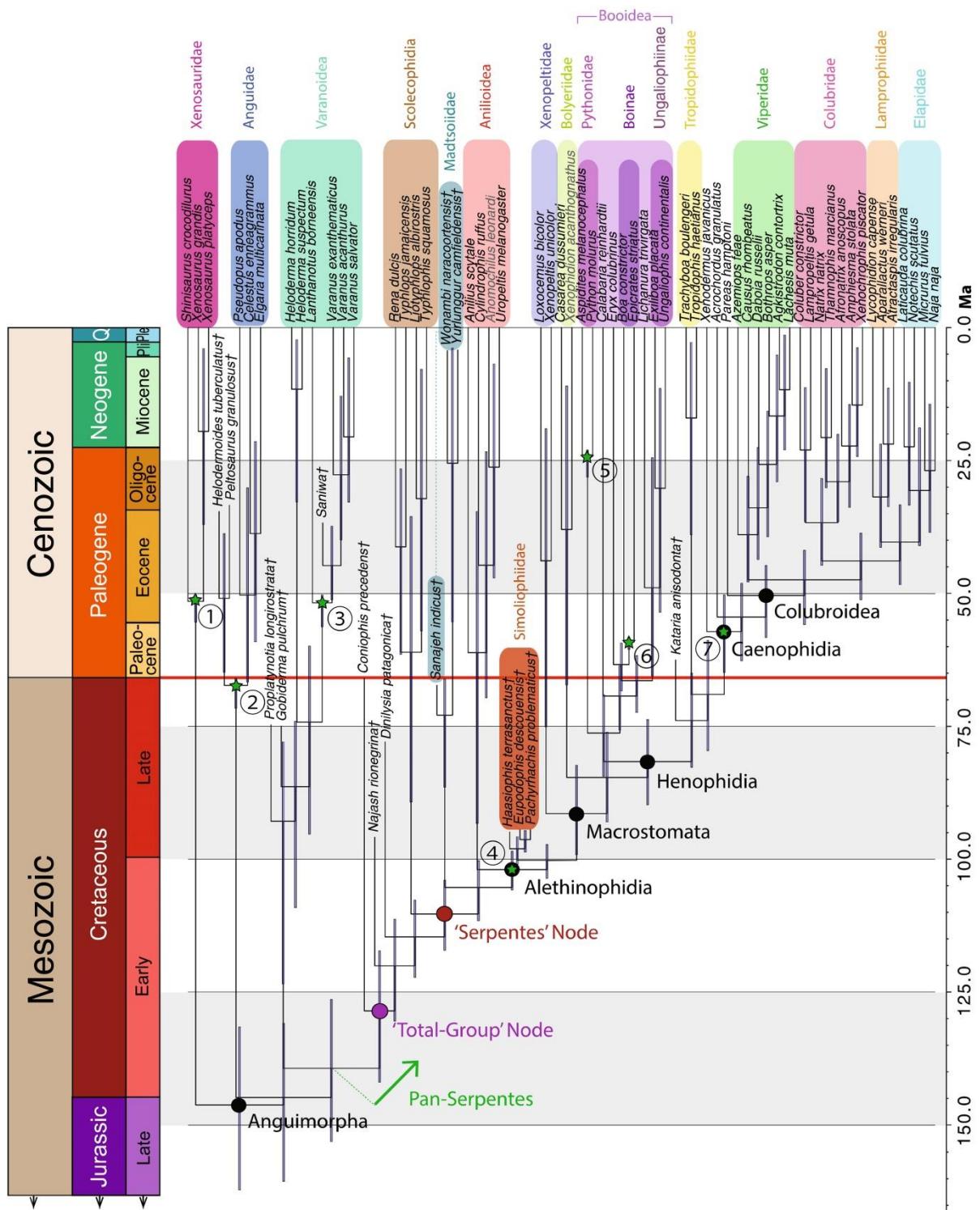
### 1. SERPENTES

O táxon de serpentes, em sua totalidade, inclui todas as espécies modernas e extintas, independentemente de serem ancestrais diretos ou não. Já o grupo *crown snakes* inclui as serpentes modernas e seu ancestral comum mais recente, focando no seu ramo evolutivo direto. Sendo assim, a origem do grupo total de serpentes pode ter ocorrido há aproximadamente 128,5 milhões de anos durante o Cretáceo Inferior Médio e o grupo *crown snakes* 20 milhões de anos depois (Hsiang et al., 2015).

Embora o grupo *crown snakes* tenha provável surgimento no supercontinente de Gondwana (Vidal et al. 2009), Hsiang et al. (2015) sugerem a possibilidade de que o grupo total de serpentes tenha se originado na Laurásia. Ainda, segundo Hsiang et al. (2015), a família Viperidae tem origem datada há cerca de 50 milhões de anos durante o Eoceno (Figura 1).

De acordo com a reconstrução de Hsiang et al. (2015), o táxon ancestral do grupo *crown snakes* (Figura 2) devia ter hábitos noturnos e terrestres, caçando por emboscada e sem o uso de constrição, com provável consumo de vertebrados e invertebrados que eram inferiores ao tamanho da sua cabeça.

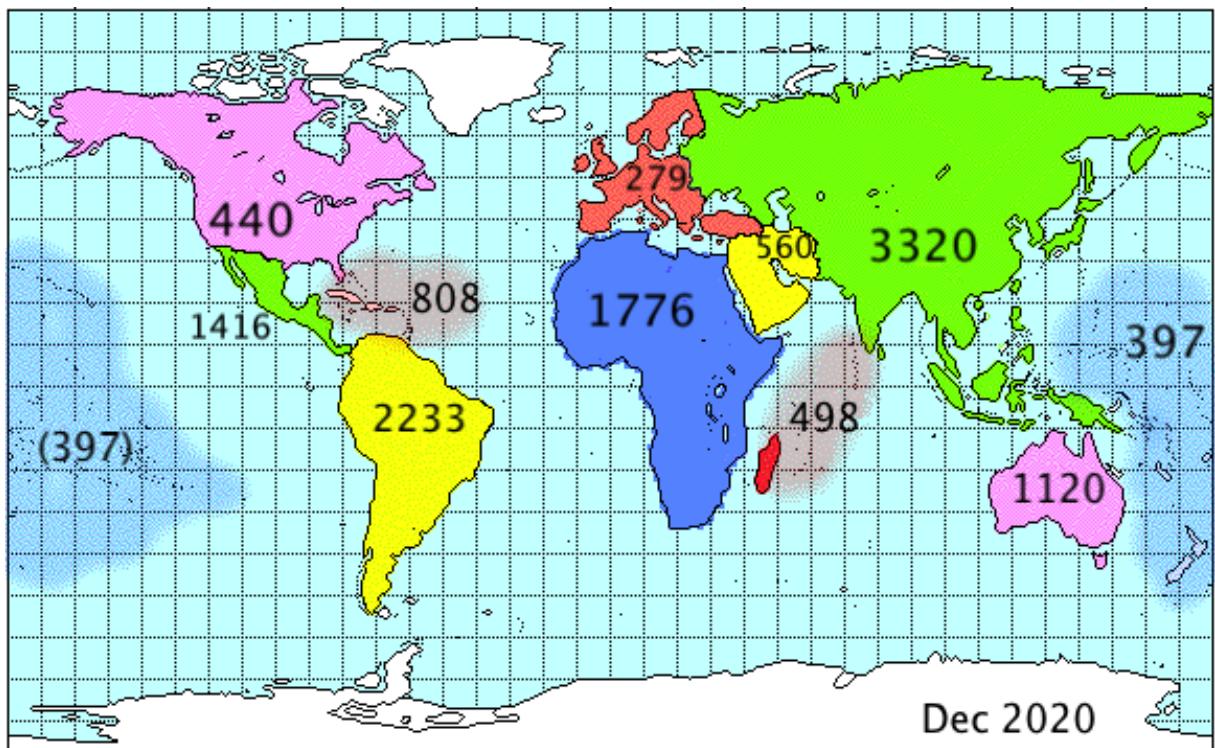
Atualmente, as serpentes compreendem um grupo com mais de mais de 4000 espécies (Uetz et al., 2022). Com exceção da Antártida, são encontradas em todos os continentes e são capazes de utilizar diferentes ambientes (subterrâneo, arbóreo, terrestre e aquático), além de climas que vão desde desertos áridos ao oceano aberto (Scanlon; Lee, 2011), como visto na figura 3. A subordem Serpentes é dividida em duas infraordens: Scolecophidia e Alethinophidia (Scanlon; Lee, 2011) e 30 famílias (Uetz et al., 2022).



**Figura 1.** Origem evolutiva do clado Serpentes por tempo de divergência inferida usando topologia restrita. A linha vermelha que separa as eras Mesozóica e Cenozóica marca a fronteira Cretáceo-Paleógeno (K-Pg) em 66 Ma. A escala de tempo é em milhões de anos. As caixas coloridas indicam os principais clados. Os táxons fósseis são marcados com uma adaga (†). Os nomes dos táxons acinzentados indicam espécies existentes que são incluídas exclusivamente com base em dados fenotípicos (Hsiang et al., 2015).



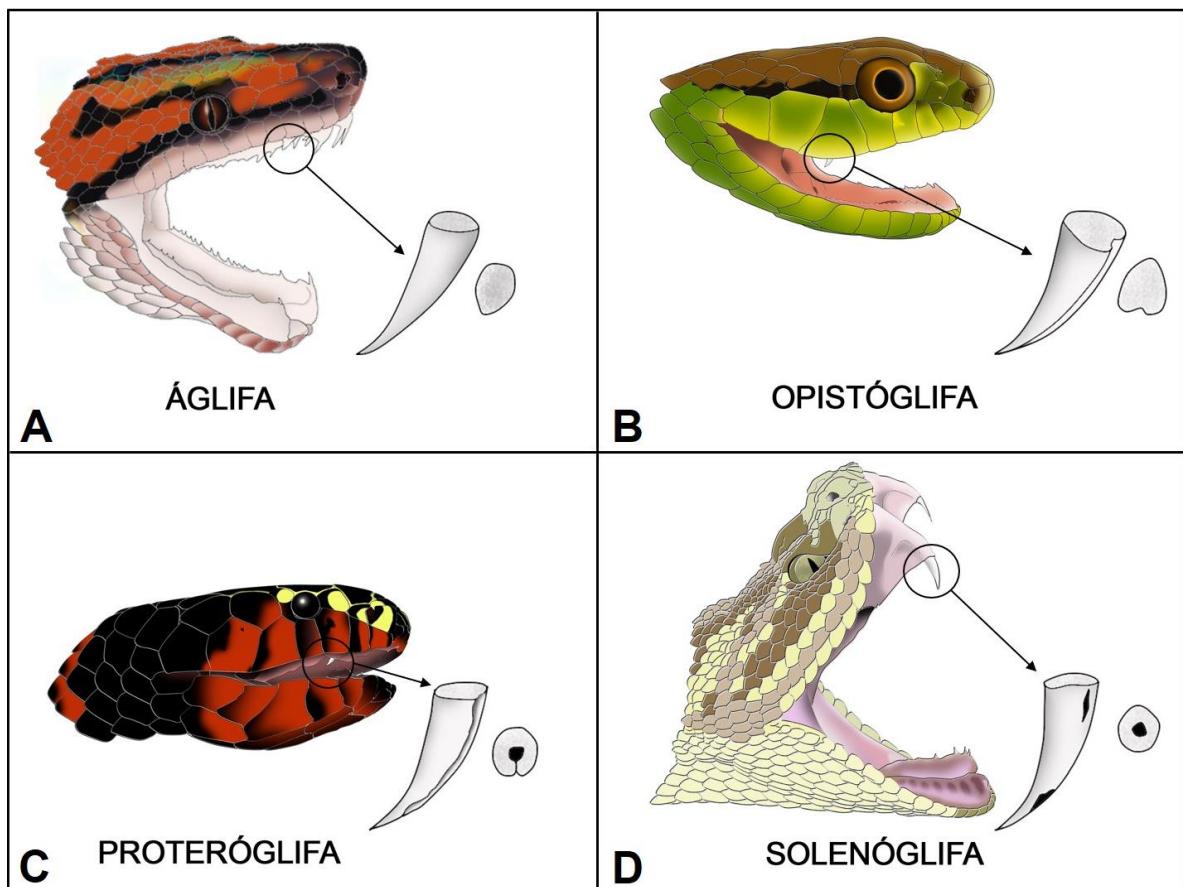
**Figura 2.** Reconstrução da serpente ancestral do “crown-group” de acordo com o estudo de Hsiang et al. (2015). Arte: Julius Csotonyi.



**Figura 3.** Distribuição das espécies de serpentes conhecidas até dezembro de 2020 através do globo (Uetz et al., 2021).

Em relação ao tipo de dentição as serpentes podem ser divididas em quatro grupos: 1) áglifa – não apresentam dentição capaz de inocular veneno (Figura 4A); 2) opistóglifa - na parte superior, região posterior, existe um dente com um sulco que

permite que o veneno escorra (Figura 4B); 3) proteróglifa - na parte superior, região anterior, existe um dente sulcado que permite que o veneno escorra (Figura 4C); 4) solenóglifa: na parte superior, região anterior, existe um dente oco e móvel por onde o veneno escorre (Figura 4D) (Marques et al., 2015).



**Figura 4.** Ilustração dos tipos de dentição encontrados nas serpentes: áglifa (A), opistóglifa (B), proteróglifa (C) e solenóglifa (D).

Os predadores de um modo geral, são categorizados em dois tipos de forrageamento: ativo – que saem em busca da sua presa; e por emboscada – que escolhem um local e esperam pela presa (Schoener, 1971; Huey; Pianka, 1981). Em relação às especializações predatórias das serpentes, o subjugamento de suas presas ocorre através de dois mecanismos eficientes, constrição e envenenamento (Pough et al., 2003; Marques et al., 2015).

O veneno das serpentes pode ser classificado em três categorias principais de acordo com a sua composição química: 1) citotóxico - causa efeito direto nas células e tecidos podendo ocasionar necroses; 2) hemotóxico - causa hemorragias através da modificação da capacidade coagulatória do sangue; 3) neurotóxico – altera o

funcionamento do sistema nervoso central e, em humanos, afeta a capacidade respiratória e podendo até levar à morte (Ceríaco; Marques, 2021).

## 1. 2. SERPENTES NO BRASIL

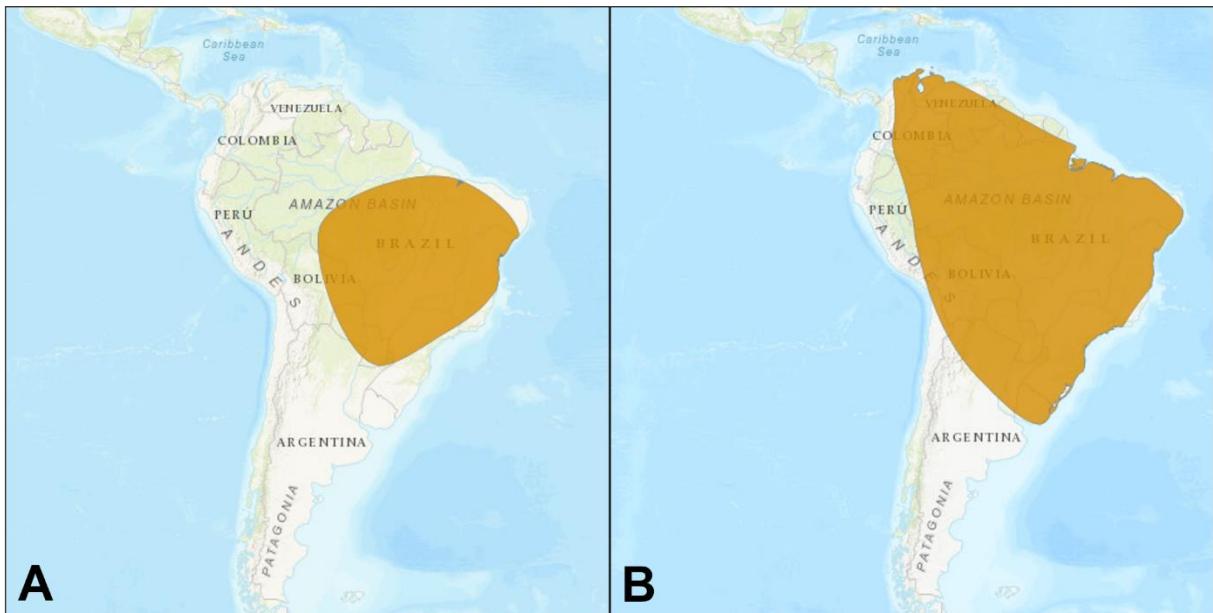
No Brasil, as 430 espécies de serpentes descritas estão distribuídas em 83 gêneros e 11 famílias, sendo as famílias Elapidae (representada por dois gêneros: *Leptomicrurus* e *Micrurus*) e Viperidae (representada por quatro gêneros: *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) de interesse por causarem acidentes ofídicos (Costa et al., 2022).

O grupo das jararacas (gênero *Bothrops*) é composto por 28 espécies, sendo que *Bothrops bilineatus* apresenta duas subespécies, enquanto que para cascavel (gênero *Crotalus*) encontramos uma única espécie, *Crotalus durissus*, com seis subespécies (Costa et al., 2022). Dentre as mais abundantes no centro-oeste brasileiro, podemos citar *B. moojeni* e *C. durissus*.

A distribuição geográfica da jararaca caiçaca (*B. moojeni*) (Figura 5A), engloba as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e na porção noroeste do Paraná (Campbell; Lamar, 2004). É uma serpente tipicamente terrestre que ocupa campos abertos do Cerrado (Nogueira et al., 2003) e que pode superar 150cm de comprimento (Melgarejo, 2009). Possui hábito alimentar generalista e entre suas presas descritas estão roedores, anfíbios, anuros, lagartos, outras serpentes, pássaros e centopeias (Bernarde, 2014).

A *C. durissus* é uma espécie de cascavél exótica no Brasil e possui ampla distribuição geográfica (Figura 5B), sendo presentes no Norte, Cerrado, Sudeste e algumas regiões do Nordeste e Sul (Melgarejo, 2003). São animais que medem até 180cm com dieta baseada em roedores e marsupiais, mas também podendo predar lagartos (Cadle, et al., 1987; Lema, 2002; Bernarde, 2014).

Os estudos em serpentes neotropicais em relação à tripanossomatídeos são principalmente voltados para bioprospecção de veneno das espécies de *Bothrops* e *Crotalus*, principalmente com ação antiparasitária (Carone et al., 2017; Grabner et al., 2017; Bandeira et al., 2018; Alfonso et al., 2019; Valentim et al., 2020; Katz et al., 2020; Barbosa et al., 2021; Dematei et al., 2021).



**Figura 5.** Distribuição geográfica das serpentes *Bothrops moojeni* (A) (Giraudo et al., 2021) e *Crotalus durissus* (B) (Cacciali et al., 2021) na América do Sul.

Embora existam alguns estudos recentes quanto ao parasitismo de uma forma geral em viperídeos no Brasil (De Oliveira Toledo et al., 2022; De Oliveira Simões et al., 2022; Lobão et al., 2023), sabe-se que tripanossomas de serpentes são incomuns, apesar de alguns relatos de infecção em diferentes famílias e ambientes ao redor do mundo e a patogenicidade desses tripanosomatídeos nesse grupo de réptil ainda é pobemente conhecida (Telford, 1995). Outros tripanosomatídeos são ainda mais incomuns.

## 2. FLEBOTOMÍNEOS

Os dípteros da família Psychodidae Newman, popularmente conhecidos como mosca-dos-filtros ou mosquitos-palha, constituem um grupo cosmopolita, com cerca de 3400 espécies descritas (Cordeiro; Wagner, 2018; Galati, 2018; Curler et al., 2019; Andrade et al., 2022). Possuem distribuição pantropical com encontros pontuais de algumas espécies em regiões temperadas (Lewis, 1971).

A atividade dos flebotomíneos é crepuscular ou noturna, embora algumas espécies possam se alimentar durante o dia. Os locais de descanso durante o dia são frescos e úmidos, incluindo: casas, estabulos, vegetação densa, buracos de árvores, tocas de roedores e outros mamíferos e ninhos de pássaros (Killick-Kendrick, 1999). Quanto à capacidade de voo, os flebotomíneos se dispersam por até 200m (Alexander; Young, 1992; Morrison et al., 1993), sendo que fêmeas de *Lutzomyia*

*longipalpis* se voam por até 100m (Galvis-Ovallos et al., 2018) e *Lutzomyia neivai* por até 128m (Casanova et al., 2005).

Apenas as fêmeas são hematófagas, enquanto os machos são nectarívoros. As fêmeas de Phlebotominae e Sycoracinae possuem probóscide e mandíbulas alongadas. As duas primeiras subfamílias citadas são hematófagas; Sycoracinae se alimentam em anfíbios (Bravo; Salazer-Valenzuela, 2009, Ježek et al., 2015) e as fêmeas de Phlebotominae se alimentam em animais homeotérmicos e pecilotérmicos (Chaniotis, 1967; Lewis, 1975), estando inclusive, associadas a transmissão de vírus, bactérias e tripanossomatídeos, entre vertebrados (Depaquit et al., 2010; Maroli et al., 2013; Shaw et al., 2018).

### 3. CLASSE KINETOPLASTEA

A classe Kinetoplastea pode parasitar vertebrados (Stevens et al., 1998; Viola et al., 2009; Costa et al., 2015), invertebrados (Svobodová et al., 2007) e plantas (Jaskowska et al., 2015; Seward et al., 2017). Esse táxon é composto pelas ordens Prokinetoplastida, Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida e Trypanosomatida (Moreira et al., 2004; Yazaki et al., 2017; Kostygov et al., 2021).

A ordem Prokinetoplastida é representada por dois gêneros: *Ichthyobodo* e *Perkinsela* (Moreira et al., 2004; Adl et al., 2019). O gênero *Ichthyobodo* é composto por parasitas flagelados presentes em água salgada e doce que infectam células epiteliais causando manifestação clínica em peixes (Lom; Diková, 1992). Já *Perkinsela* é um endossimbionte obrigatório de *Neopamoeba*, vivendo no citoplasma da ameba em uma relação considerada mutualística (Dyková et al., 2003).

A ordem Neobodonida é formada por espécies de vida livre (algumas possivelmente endocomensais) dos gêneros *Actuariola*, *Azumiobodo*, *Cruzella*, *Cryptaulax*, *Dimastigella*, *Klosteria*, *Neobodo*, *Phanerobia*, *Rhynchobodo*, *Rhynchosomonas* (Moreira et al., 2004). As espécies *Neobodo designis*, *N. saliens* e *Rhynchosomonas nasuta* estão entre os 20 flagelados heterotróficos mais frequentes em amostras naturais no mundo (Patterson; Lee, 2000).

Fagotróficos ou osmotróficos, os representantes da ordem Parabodonida são de vida livre ou comensal/parasitária. Para esse grupo são descritos os seguintes gêneros: *Cryptobia*, *Jarrellia*, *Parabodo*, *Procryptobia*, *Trypanoplasma* (Moreira et al., 2004; Adl et al., 2019).

A ordem Eubodonida é formada por espécies de vida livre, representadas pelo gênero *Bodo*, família Bodonidae (Moreira et al., 2004). Essa família é comum em ambientes aquáticos, e desempenha papel fundamental nas redes alimentares microbianas consumindo bactérias e outros pequenos eucariotos (Arndt et al., 2000), entretanto Alves et al. (2023) detectaram a presença de *Bodo* sp. em coágulo sanguíneo de *Artibeus lituratus* (Stenodermatinae, Phyllostomidae).

Por fim, a ordem Trypanosomatida que compreende espécies exclusivamente parasitas, divididas em ciclos monoxênicos (p.e.: *Leptomonas*, *Paratrypanosoma* e *Sergeia*) e heteroxênicos (p.e.: *Phytomonas*, *Leishmania* e *Trypanosoma*) e é representado uma única família, Trypanosomatidae. Além disso, possuem um único flagelo (Moreira et al., 2004; Adl et al., 2019).

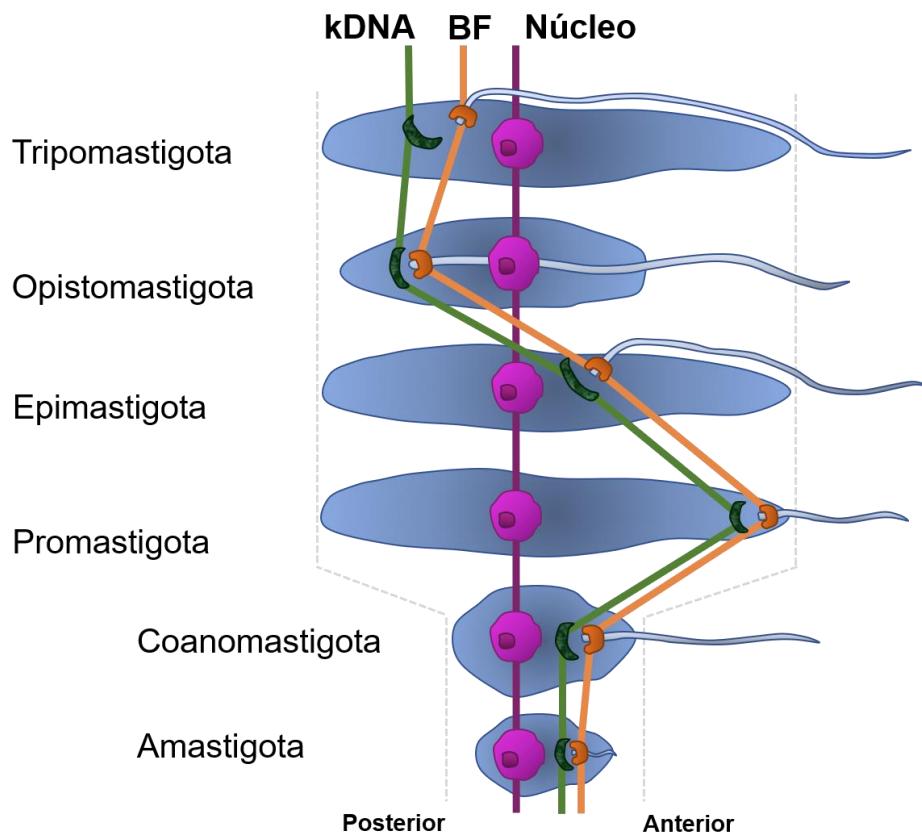
### 3.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

A família Trypanosomatidae Doflein, 1951 (Trypanosomatida Hollande, 1952), é composta por protozoários flagelados (Sobhy et al., 2017) predominantemente monoxênicos, mas que também apresentam espécies heteroxênicas (Overath et al., 2001). Os tripanosomatídeos são compostos por 25 gêneros que apresentam diferentes tipos de hospedeiros e ciclos evolutivos (D'avila-Levy et al., 2015; Kaufer et al., 2017; Maslov et al., 2019; Kostygov et al., 2020; Lukeš et al., 2021).

Os tripanosomatídeos são caracterizados pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, uma organela que contém numerosas cópias de DNA extranuclear (kDNA) (Vickman et al., 1976). Provavelmente foram um dos primeiros a divergir das linhagens celulares eucarióticas ancestrais, sendo considerados organismos eucariotos primitivos (Stevens et al., 2001; Moreira et al., 2004). O cinetoplasto é localizado próximo ao corpo basal do flagelo e a posição organela-flagelo em relação ao núcleo é uma importante ferramenta para classificação dos diferentes estágios do ciclo de vida desses protozoários (Hoare; Wallace, 1966) (Figura 6).

O DNA do cinetoplasto, ou kDNA, consiste em uma rede de moléculas circulares entrelaçadas classificadas em dois tipos: minicírculos (de 0.5 a 10kb – dependendo da espécie) e maxicírculos variando de 20 a 40kb (Shapiro; Englund, 1995; Jensen; Englund, 2012). Os minicírculos codificam RNAs guias (gRNAs) que participam da edição dos transcritos produzidos pelos maxicírculos, responsáveis pela produção de rRNAs e proteínas da cadeia respiratória (Jensen; Englund, 2012).

Dentre os tripanosomatídeos, podemos destacar: i) *Crithidia*, protozoário que até recentemente era conhecido com ciclo de vida monoxênico restrito a insetos (Runckel et al., 2014; Olsen, 1986), porém recentemente foi relatada a infecção por *Crithidia mellifica* em morcegos (Rangel et al., 2019) e outros mamíferos (Dario et al., 2021); ii) *Phytomonas*, com ciclo de vida heteroxênico, é relatado infectando plantas em diferentes tecidos (Jaskowska et al., 2015) e transmitido por insetos (Camargo, 1999; De Oliveira et al., 2017); iii) *Leishmania*, transmitida por flebotomíneos, pode infectar aproximadamente 70 espécies de animais, incluindo répteis (Chen et al., 2019), roedores (Rose et al., 2004), cães (Best et al., 2014) e outros mamíferos (Dougall et al., 2009; Roque; Jansen, 2014); iv) *Trypanosoma*, transmitido por insetos hematófagos (Campos-Soto et al., 2020) e sanguessugas (Corrêa et al., 2016) , infecta peixes (Hayes et al., 2014), anuros (Leal et al., 2009), répteis (Dvořáková et al., 2015), aves (Sehgal et al., 2001) e mamíferos (Aregawi et al., 2019).



**Figura 6.** Repositionamento da bolsa flagelar (BF - em laranja) em relação ao cinetoplasto (kDNA - em verde) e ao núcleo (em roxo) em diferentes formas de um flagelado (ilustração criada a partir da figura de Field; Carrington, 2009).

### 3.1.1. GÊNERO *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843 são transmitidas por diversos hospedeiros invertebrados hematófagos, variando de mutucas e barbeiros a sanguessugas (Who, 2012; Fermino et al., 2015) e já foram descritos em mais de 500 espécies de diferentes grupos de hospedeiros (Spodareva et al., 2018), como mamíferos (Herrera et al., 2011; Jansen et al., 2018; Barros et al., 2020), anuros (Lemos et al., 2008; Attias et al., 2016), peixes (Hayes et al., 2014; Corrêa et al., 2016; Smit et al., 2020), répteis (Viola et al., 2009; Fermino et al., 2019) e aves (Votýpka et al., 2012; Cooper et al., 2017; Pornpanom et al., 2019; Galen et al., 2020).

As espécies do gênero *Trypanosoma* que infectam mamíferos foram classificadas por Hoare (1972) em dois grandes grupos: seção Salivaria e seção Stercoraria. O primeiro, comprehende os protozoários com parte de seu ciclo de vida no interior de glândulas salivares do inseto vetor, sendo transmitido durante o repasto sanguíneo das formas adultas nos vertebrados. O segundo grupo corresponde àqueles cuja transmissão ocorre através da deposição do conteúdo intestinal do inseto vetor sobre a pele do vertebrado durante o repasto sanguíneo daquele (Stevens; Gibson, 1999).

De acordo com árvores filogenéticas construídas a partir dos genes 18S (rRNA) e gGAPDH, a família é, portanto o gênero *Trypanosoma*, são monofiléticos (Stevens et al., 1999; Hamilton et al., 2004), mas a ausência de registros fósseis e a falta de especificidade com os hospedeiros não permite datação por coevolução, o que dificulta explicar o surgimento de determinadas linhagens. Porém, a divergência do clado *T. brucei* e *T. cruzi* foi associada à divisão de Gondwana durante o Cretáceo há cerca de 100 milhões de anos (Stevens et al., 1999).

Atualmente, o gênero *Trypanosoma* pode ser dividido em 11 clados principais por meio de uma análise dos genes 18S (SSU rDNA) e gGAPDH (Acosta et al., 2013; Botero et al., 2013; Ferreira et al., 2017; Hamilton; Stevens, 2017; Ortiz et al., 2018) (Figura 7).

Clado Aquático: comprehende tripanossomas de ornitorrinco (Mackerras, 1959; Noyes et al., 1999; Paparini et al., 2014), quelônios (Ray, 1987; Dvořáková et al., 2015), isolados de peixes, anuros e outros vertebrados aquáticos (Maslov et al., 1996; Stevens et al., 2001; Ferreira et al., 2007). A transmissão ocorre através de

sanguessugas e flebotomíneos (Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Paparini et al., 2014).

Clado de Aves: agrupa os tripanosomas que infectam diversas espécies de aves, entre eles *Trypanosoma corvi*, *Trypanosoma avium* e *Trypanosoma bennetti* (Nandi; Bennett, 1994; Zídková et al., 2012). Porém, segundo Averis et al. (2009) e Cooper et al. (2017), esse clado mostrou baixa especificidade quanto ao hospedeiro, já que *T. avium*, *Trypanosoma* sp. AAT e outros genótipos do clado foram reportados infectando marsupiais na Austrália.

Clado *T. brucei*: neste agrupamento estão presentes espécies que ocorrem principalmente no continente africano, incluídas nos subgêneros *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. equiperdum* e *T. evansi*), *Duttonella* (*T. vivax*), *Pycnomonas* (*T. suis*) e *Nannomonas* (*T. congolense* e *T. simiae*) (Hoare, 1972). Ainda no subgênero *Nannomonas*, é reportado *T. godfreyi*, espécie que infecta moscas tsé-tsé e o único relato de hospedeiros vertebrados foi uma infecção experimental em porcos (Mcnamara et al., 1994). A infecção por espécies deste clado ocorre através da transmissão pela via anterior do tubo digestivo de moscas dos gêneros *Glossina* (Adams et al., 2010), *Stomoxys* ou *Tabanus* (Abebe et al., 2017).

Clado *T. theileri*: apesar da inclusão de espécies como *T. cyclops* descrito em primatas (*Macaca nemestrina* e *Macaca ira*) (Weinman, 1972), esse grupo é característico pela espécie *Trypanosoma theileri* que infecta búfalos, veados e gado (Rodrigues et al. 2006), sendo que bois e búfalos podem apresentar diferentes genótipos (Garcia et al., 2011). Além disso, Ramírez et al. (2014) encontraram *T. theileri* em *Desmodus rotundus*, um morcego hematófago.

Clado de tripanosomas de marsupiais australianos: incluía isolados em coala (*Phascolarctos cinereus*), como *T. gilletti* (Mcinnes et al., 2011) e *T. copemani* (Noyes et al., 1999; Austen et al., 2009). Outras espécies foram adicionadas a esse grupo, como *Trypanosoma* sp. KG1 isolado em carrapato (*Haemaphysalis hystricis*) no Japão (Thekisoe et al., 2007) e *T. pestanai* com isolados em diferentes espécies de mamíferos da Europa (Rioux et al., 1966; Peirce; Neal, 1974; Dyachenko et al., 2017; Sgroi et al., 2021).

Clado *T. lewisi*: é composto por espécies isoladas em coelho (*Oryctolagus cuniculus*) como *T. nabiasi* (Railliet, 1895; Merino-Espinosa et al., 2016), e isolados em roedores como *T. microti* (Beldomenico et al., 2009). Além disso, a espécie que dá nome ao clado, *T. lewisi*, é globalmente distribuída e já foi reportada em roedores

(Cassan et al., 2018), primatas não-humanos (Da Silva et al., 2010) e humanos (Truc et al., 2013; Lin et al., 2015).

Clado *T. cruzi*: inclui espécies do subgênero *Schizotrypanum* como a espécie-tipo, *T. cruzi*, encontrada em centenas de espécies de mamíferos de diferentes ordens e transmissão associada à diversas espécies de triatomíneos (Noireau et al., 2009; Jansen et al., 2015). Muitas espécies desse clado foram reportadas em morcegos, entre as quais, *T. dionisii* (Mafie et al., 2018; Austen et al., 2020), *T. vespertilionis* (Baker; Thompson, 1971; Molyneux, 1991) e *T. livingstonei* (Lima et al., 2013), além de *T. minasense* em primatas (Coimbra et al., 2020). As inferências filogenéticas de *T. rangeli*, também isolado em morcegos (Da Silva et al., 2009), e de *T. cruzi* deram origem à “*The Bat Seeding Hypothesis*” (Hamilton et al. 2012). Uma vez que a maioria das espécies desse clado foram descritas em morcegos, atualmente é aceito que esses animais podem ter sido os hospedeiros ancestrais do clado.

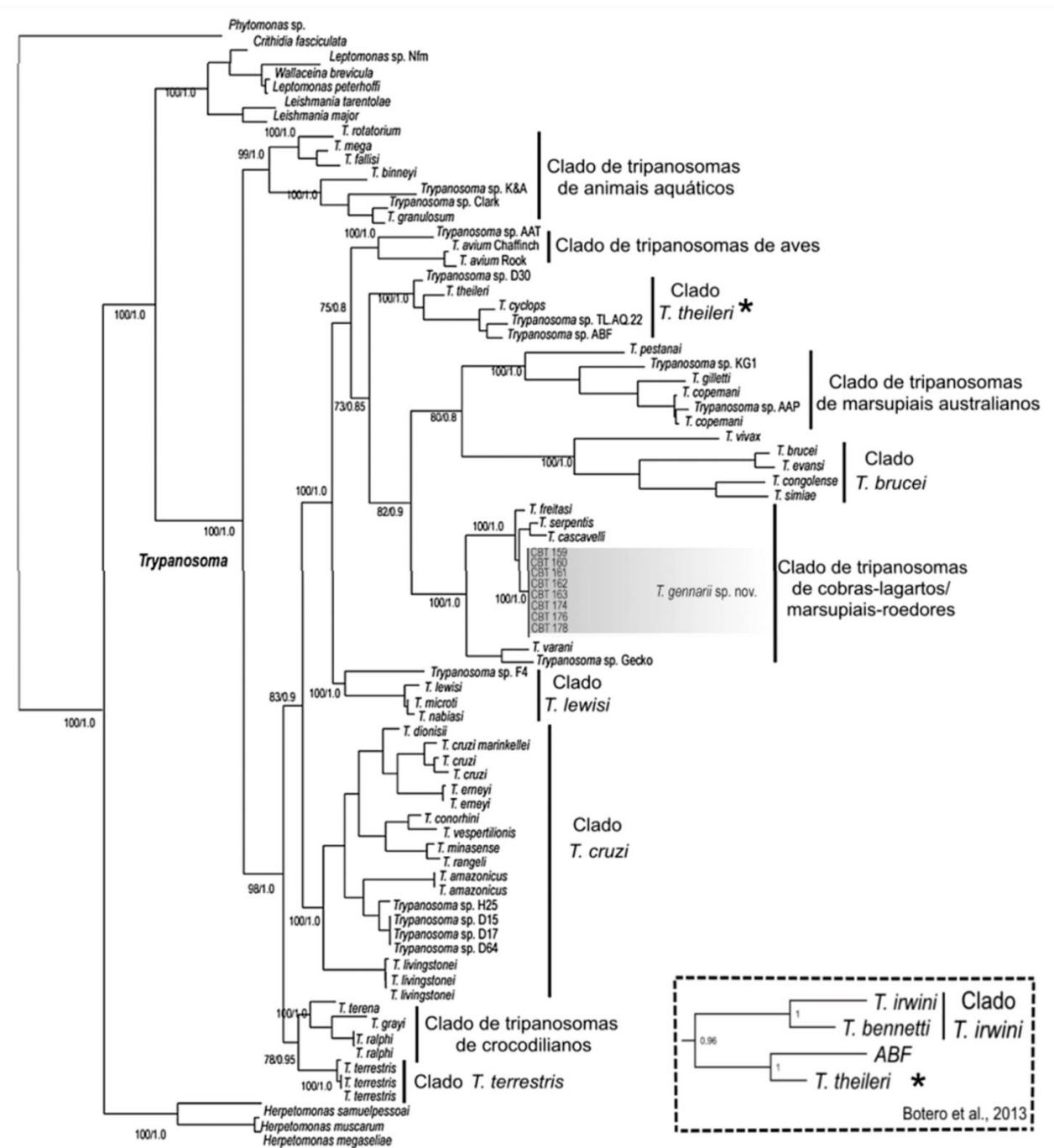
Clado *T. terrestris*: inclui unicamente a espécie *Trypanosoma terrestris* descrito em *Tapirus terrestris* (anta) na Floresta Atlântica (Acosta et al., 2013). Atualmente, sabe-se que *T. terrestris* também é capaz de estabelecer infecção em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Torres et al., 2018).

Clado *T. irwini*: é composto pela espécie-tipo *Trypanosoma irwini* descrita em coalas (McInnes et al., 2009) e *T. bennetti* isolado de um falcão (*Falco sparverius*) (Kirkpatrick et al., 1986).

Clado de tripanosomas crocodilianos: inclui espécies como *T. ralphi* isolado de *Melanosuchus niger*, *T. terena* isolado de *Caiman yacare* (Fermino et al., 2013) e *T. grayi* (Hoare, 1929). Moscas tsé-tsé e sanguessugas são relatadas como vetores de tripanosomas em crocodilianos (Hoare, 1931; Fermino et al., 2015).

Clado de tripanosomas de serpentes-lagartos/marsupiais-roedores: antes exclusivo de hospedeiros reptilianos, como *Pseudoboa nigra* de onde foi descrito *T. serpentis* (Viola et al., 2009), o clado conta com espécies como *T. freitasi*, descrito em *Didelphis* (Rêgo et al., 1957), *T. gennari* descrito em *Monodelphis domestica* (Ferreira et al., 2017) e *T. cascavelli* descrito por Pessôa e De Biasi (1972) e redescrito por VIOLA et al. (2009). Apesar de descrito em *Crotalus durissus*, *T. cascavelli* já foi encontrado em *Monodelphis americana* por Dario et al. (2017). Esses protozoários apresentam uma ampla distribuição geográfica (Jansen et al., 2018; Rodrigues, 2019a; Galen et al., 2020) e são transmitidos predominantemente por dípteros (Viola et al., 2008; Telford, 2009; Mantilla et al., 2017), sifonápteros (Lizundia et al., 2011),

hemípteros (Siqueira, 2016) e anelídeos (Telford, 2009; Correa *et al.*, 2016). Os vetores de tripanossomas de serpentes são insuficientemente conhecidos, pois a maioria dos ciclos de vida não foram totalmente elucidados (Telford, 2009). As espécies de *Trypanosoma* que parasitam as serpentes aquáticas são, provavelmente, transmitidas por meio de sanguessugas (Brumpt, 1914; Telford, 2009). No caso de répteis terrestres, segundo Telford (1995), os parasitas são, aparentemente, transmitidos por flebotomíneos.



**Figura 7.** Clados de espécies do gênero *Trypanosoma*. Fonte: Rodrigues (2019b), adaptado de Botero et al., 2013 e Ferreira et al., 2017.

### 3.1.2. GÊNERO *Leishmania*

O gênero *Leishmania* remete a um grupo de protozoários parasitas que infectam principalmente mamíferos, com exceção do subgênero *Sauroleishmania*, que infecta lagartos (Klatt et al., 2019) e serpentes (Chen et al., 2019). Esse subgênero possui os flebotomíneos do gênero *Sergentomyia* como vetores (Lewis, 1987), entretanto ainda há controvérsias quanto ao papel dos répteis na propagação da infecção (Belova, 1971).

No homem, a leishmaniose é uma doença preocupante, mas ainda negligenciada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Otranto; Dantas-Torres, 2013), com 20 espécies do gênero associadas à infecção em humanos (Okwor; Uzonna, 2016) e transmissão através da picada de flebotomíneos infectados, dos quais cerca de 166 espécies são prováveis vetores em todo o mundo (Akhouni et al., 2016) com destaque para os gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo (Maroli et al., 2013) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Dantas-Torres et al., 2012). No cão, a infecção por *L. infantum* pode resultar em uma doença de caráter víscero-dermotrópica que pode levar o animal à morte. Esses animais são reconhecidos reservatórios naturais de *L. infantum* (Roque; Jansen, 2014).

Recentemente, os membros do gênero *Leishmania* foram divididas em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia*; (Espinosa et al., 2016; Solana et al., 2022) e seis complexos: complexo *L. tropica*, complexo *L. major*, complexo *L. donovani*, complexo *L. mexicana*, complexo *L. guyanensis* e complexo *L. braziliensis* (Figura 8) (Solana et al., 2022).

Complexo *Leishmania tropica*: inclui espécies bastante heterogêneas com cepas que podem ser distinguidas geneticamente (Schörian et al., 2001), bioquimicamente (Mebrahtu et al., 1992) e sorologicamente (Schnur et al., 2004). A espécie que dá nome ao complexo é responsável pela leishmaniose cutânea na Ásia e Oriente Médio, porém, em raros casos podem também ser associada a um quadro visceral em humanos e cães (Mebrahtu et al. 1989; Magill et al. 1993; Sacks et al. 1995; Guessous-Idrissi et al. 1997; Mohebali et al. 2005; Alborzi et al. 2006).

Complexo *Leishmania major*: *L. major* é distribuída desde a África Subsaariana ao Sul do subcontinente Indiano - Ásia Central, sendo uma das responsáveis pelos casos de leishmaniose cutânea nessas regiões (Elfari et al., 2005; Al-Jawabreh et al., 2008). A *L. major* está associada à roedores do gênero *Gerbillus* nessas regiões,

sendo considerada uma zoonose por também infectar humanos (Benallal et al., 2023; Azizi et al., 2011).

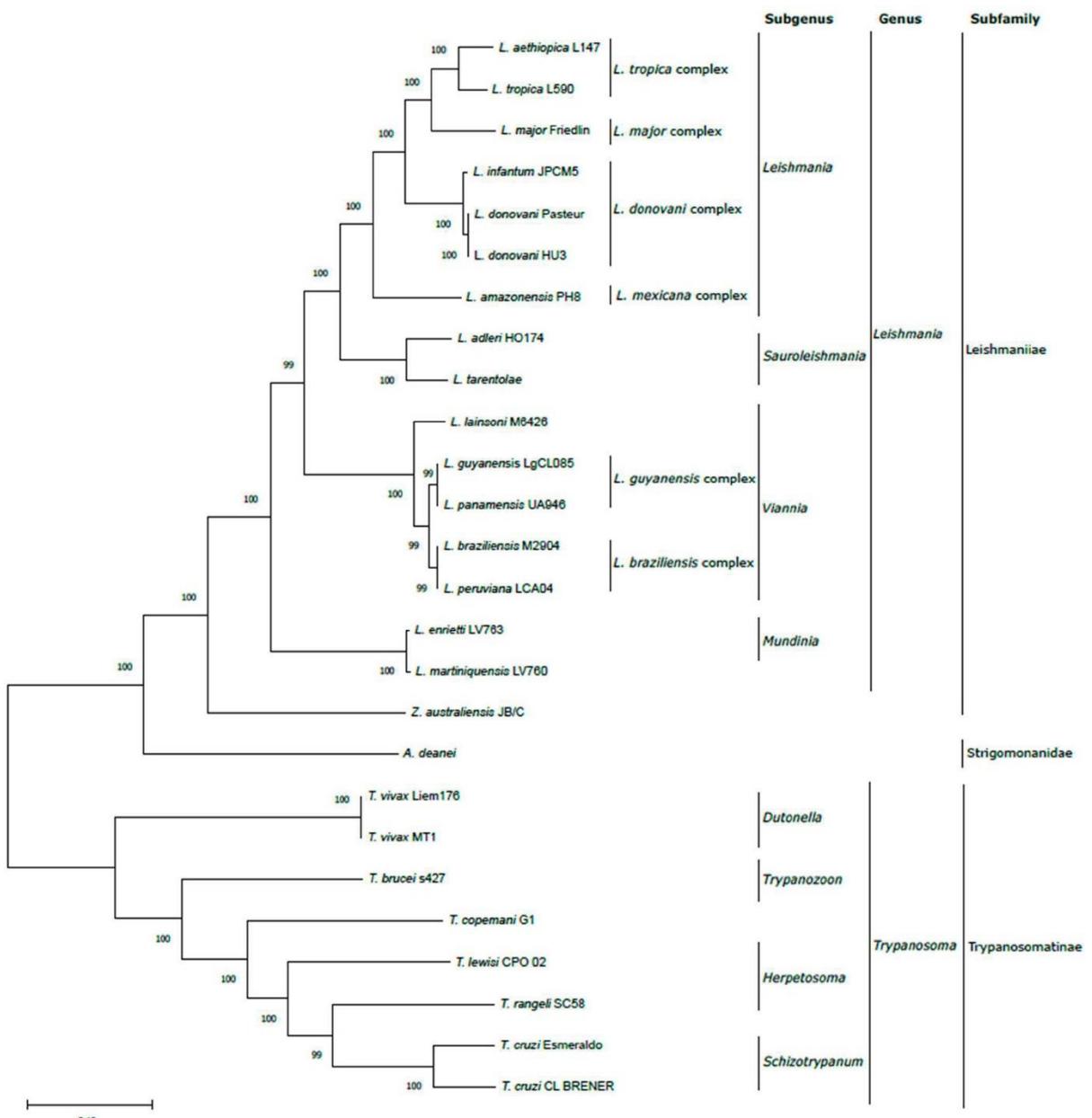
Complexo *Leishmania donovani*: comprehende as espécies responsáveis pelos casos de leishmaniose visceral humana (manifestação potencialmente fatal da infecção), causada pela *L. donovani* no Leste da África e Índia e pela *L. infantum* no Médio Oriente e na Ásia Central, em toda a bacia do Mediterrâneo e na América Latina (Who, 2023). No Brasil, a *L. infantum* já foi descrita em diversos hospedeiros vertebrados além do cão e do homem: *Lycalopex vetulus* (Deane e Deane, 1954), *Cerdocyon thous* (Roque; Jansen, 2014), *Didelphis albiventris* (Humberg et al., 2012), *Nasua nasua* (De Macedo et al., 2023) e *Rattus rattus* (Caldart et al., 2017).

Complexo *Leishmania mexicana*: *L. mexicana* é a principal espécie responsável pelos casos de leishmaniose cutânea na América do Norte e Central (Kevric et al., 2015; Pace, 2014). *Leishmania amazonenses* infecta mamíferos silvestres de diferentes ordens (Roque; Jansen et al., 2014) e também é responsável por diferentes manifestações cutâneas da leishmaniose no homem (Silveira et al., 2004), sendo distribuída principalmente pela América do Sul, como Brasil, Venezuela e Bolívia (Steverding, 2017). Ainda, leishmaniose visceral provocada por *L. amazonensis* já foi reportada em cães (Tolezano et al., 2007) e humanos (De Souza et al., 2018) no Brasil.

Complexo *Leishmania guyanensis*: *L. guyanensis* é distribuída no Brasil, Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela (Borges et al., 2018), sendo responsável pela manifestação da forma tegumentar da doença em humanos (Steverding, 2017). Vários mamíferos são considerados reservatórios naturais para essa espécie, como *Choloepus didactylus* (preguiça), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), marsupiais e roedores (Lainson et al., 1981). Outra espécie pertencente ao complexo é *Leishmania panamensis*, principal responsável por leishmaniose tegumentar na Colômbia (Ramírez et al., 2016) e no Panamá (Vásquez et al., 1998).

Complexo *Leishmania braziliensis*: *L. braziliensis* é a espécie mais difundida nas Américas, sendo presente em 18 países (Paho, 2019). É capaz de infectar diferentes mamíferos de diversas ordens, porém, não há descrito uma espécie de mamífero que atue como reservatório, provavelmente é o conjunto de mamíferos infectados que atua como sistema complexo de reservatório para *L. braziliensis*. A

outra espécie do complexo, *L. peruviana*, está limitada às regiões dos vales interandinos do Peru e causa no homem lesões cutâneas, raramente afetando a mucosa (Davies et al., 2000; Perez et al., 2007; Kato et al., 2019).



**Figura 8.** Análise evolutiva da família Trypanosomatidae baseada na região de codificação da sequência do maxicírculos (Solana et al., 2022).

#### 4. TRYPANOSOMATIDAE EM SERPENTES

Atualmente são reconhecidas 24 espécies de *Trypanosoma* parasitando serpentes africanas (Wenyon, 1909; Bouet, 1909; Macfie, 1919; Fantham; Porter, 1950; Brygoo, 1965; Sato et al., 2009; Halla et al., 2014), americanas (Wenyon, 1908;

Brumpt, 1914; Pessôa, 1928; Arantes; Fonseca, 1931; Fonseca, 1935; Fantham; Porter, 1953; Pessôa, 1968; Pessôa; Fleury, 1969; Pessôa; De Biasi, 1972; Pessôa et al., 1974; Ayala et al., 1983; Viola et al., 2008; Telford, 2009; Viola et al., 2009; Halla et al., 2014) e asiáticas (Mathis; Léger, 1909; Sinha; Mandal, 1976; Lun, 1985). Na China, Chen et al. (2019) detectaram DNA de *Leishmania donovani*, *L. turanica*, *L. infantum* e *L. (Sauroleishmania) sp.* em tecidos de diferentes espécies de serpentes.

Dos trabalhos de descrição de tripanossomatídeo em serpentes citados acima, até o ano de 1985 as espécies foram descritas a partir de dados morfométricos, possibilitando que, de acordo com Telford (2009), algumas delas sejam sinônimas. Somente a partir de 2008 os trabalhos tiveram a inserção da biologia molecular como ferramenta auxiliar para descrição, utilizando como alvo os genes cyt b, HSP70, ITS1 (Chen et al., 2019), gGAPDH e SSU (Sato et al., 2009; Viola et al., 2009). O sequenciamento de nova geração ainda não foi utilizado como ferramenta para descrição de riqueza de tripanossomatídeos em amostras de serpentes até o presente.

No Brasil, poucos grupos de pesquisa desenvolvem trabalhos envolvendo a investigação de tripanossomatídeos em serpentes, sendo os trabalhos de Viola et al. (2008) e Viola et al. (2009) os mais recentes e ainda assim já se passaram quase 15 anos desde suas publicações. Entre os motivos que explicam as ausências desses estudos, destaca-se que: i) serpentes são animais de difícil captura e manejo e; ii) tripanossomas de serpentes supostamente não infectavam hospedeiros mamíferos; e iii) não havia a consciência da importância da inclusão de parasitos em estudos de biodiversidade.

## METODOLOGIA

### **Animais**

Foram utilizados animais resgatados no Estado de Mato Grosso do Sul e mantidos em cativeiro no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (Campo Grande-MS). Foi selecionada uma espécie de cada gênero de Viperidae que ocorrem no Mato Grosso do Sul, jararaca-caiçaca (*Bothrops moojeni*, n=33) e cascavel (*Crotalus durissus*, n=73). Todos os indivíduos com peso mínimo de 300g. As serpentes são mantidas em cativeiro intensivo, acondicionadas individualmente em caixas de polietileno (39 cm x 59 cm x 31 cm) com tampas perfuradas, alimentação mensal com roedores de padrão sanitário convencional, provenientes do próprio Biotério UCDB e água *ad libitum*. Os animais amostrados foram agrupados de acordo com o tempo de cativeiro no Biotério UCDB: G1 (2000-2005), G2 (2006-2011), G3 (2012-2017) e G4 (2018-2022).

### **Procedimentos éticos**

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo a licença concedidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (78932-1) e Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Católica Dom Bosco (nº de protocolo 006/2021), Campo Grande, MS.

### **Coleta de Sangue**

O animal foi manejado com o auxílio de um gancho herpetológico, sendo retirado do cativeiro intensivo (caixas de polietileno com 39cm x 59cm x 31cm) e contido com o uso de um tubo de PVC transparente. Após esse processo a serpente era encaminhada para a mesa de coleta.

Seguindo Redrobe e MacDonald (1999), foi coletado até 10% do volume total de sangue do animal de acordo com o peso de cada espécime. A antisepsia foi

realizada com sabão antisséptico, álcool 70% iodado e álcool 70% (na respectiva ordem, com três aplicações para cada) e o sangue coletado por punção da veia caudal (Campbell, 2006) com seringas de 1 mL e agulha (13x0,45mm-26G). O sangue coletado foi direcionado para hemocultura (500 $\mu$ L), para o exame a fresco, esfregaço sanguíneo e o restante acondicionado em tubo sem anticoagulante para posterior análise molecular.

## **Diagnóstico das espécies de Tripanosomatídeos**

### **Testes parasitológicos**

O cultivo de 250 $\mu$ L de sangue total foi realizado em meios bifásicos NNN (Nicole, Novy, McNeal) + LIT (Liver Infusion Tryptose) e NNN/Schneider. Os procedimentos foram realizados dentro do campo de segurança de um fogareiro. Os tubos foram incubados a 27°C e monitorados quinzenalmente por quatro meses.

Foi realizado esfregaço sanguíneo em duplicata para cada animal e a coloração utilizada foi com solução comercial pronta para uso (Panótico Rápido – Laborclin, código 620529) com três corantes em série. As lâminas foram submersas em pé no fixador por 20 segundos; logo após retirar a lâmina do fixador, o excesso foi retirado e a mesma colocada no corante I por 20 segundos; em seguida a lâmina era removida do corante I e colocada no corante II por 30 segundos. Após esse processo as lâminas foram dispostas em uma estante para secagem e posterior armazenamento em caixas porta-lâmina.

Além disso foi realizado exame de sangue a fresco, sendo adicionado aproximadamente 5 $\mu$ l de sangue em uma lâmina e coberto com uma lamínula. Tanto o exame a fresco, como o esfregaço sanguíneo foram examinados em microscópio óptico de luz sob a objetiva de 100x para busca do protozoário.

## **Diagnóstico molecular**

### *Extração de DNA*

O DNA foi extraído a partir de coágulo (diferentes pedaços do mesmo coágulo foram selecionados na tentativa de uma amostragem heterogênea) com base no protocolo de precipitação por acetato de amônio como descrito previamente por Bruford et al. (1998).

## *Padronização da concentração de DNA para PCR de sangue animais com hemácias nucleadas*

O DNA de coágulo de uma serpente comprovadamente parasitada por Trypanosomatidae foi diluído em água ultrapura nas seguintes razões: 1) 1:1; 2) 1: 0,500; 3) 1: 0,250; 4) 1: 0,125 e 5) 1: 0,0625 e a quantificação foi realizada no Fluorômetro Qubit com *dsDNA broad range kit* (Thermo Fisher Scientific, Wal-tham, MA, EUA). O critério de escolha foi a concentração que não inibisse a reação da PCR, que não apresentasse rastros durante a visualização em gel de agarose e que apresentasse uma banda nítida correspondente a presença de DNA de tripanossomatídeos.

## *Reação em cadeia da polimerase (PCR)*

Para detecção de tripanosomatídeos foi utilizado como alvo uma região variável do gene 18S rDNA, com primers externos TRY927F e TRY927R, e primers internos SSU561F e SSU561R, de acordo com Smith et al. (2008). Para cada reação foram incluídas amostras de controles negativo e positivo. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% após coloração com GelRed (Biotium, Inc., California, USA).

## *Clonagem*

A clonagem do produto amplificado na nPCR foi realizada em uma amostra de um indivíduo de *C. durissus* (UCDB696), sendo selecionada pela qualidade da banda correspondente a ~650 pb observada no gel de agarose. O procedimento foi realizado diretamente no *pGEM-T easy vector* (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram escolhidas quatro colônias aleatoriamente para sequenciamento. Os *minipreps* foram realizados com o *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, Wisconsin, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

## *Sequenciamento*

Os produtos amplificados por nPCR foram quantificados no Fluorômetro Qubit com *dsDNA broad range kit* (Thermo Fisher Scientific, Wal-tham, MA, EUA) e preparados para sequenciamento convencional (Sanger) e sequenciamento de nova geração (NGS) de acordo com os protocolos recomendados para o *Illumina* (*Illumina*

*Demonstrated Protocol: Metagenomic Sequencing Library Preparation)* e sequenciadas no *Illumina HiSeq2500* (PE250) de acordo com os primers descritos por Barbosa et al. (2017).

### **Análise de bioinformática**

Os dados gerados pelo NGS foram importados e analisados no software R (R Development Core Team, 2021). As sequências foram analisadas usando o pacote DADA2 v1.14.0 de acordo com o tutorial (<https://benjneb.github.io/dada2/tutorial.html> (acessado em 02 de março de 2023)) (Callahan et al., 2016). Além disso, a taxonomia das ASVs (*Amplicon Sequence Variant*) geradas foram atribuídas a partir de uma base de dados adaptada de SILVA v132., e as informações foram combinadas em *phyloseq object* de acordo com McMurdie e Holmes (2013). O total de leituras obtido por amostra na tabela ASV foi normalizado para 100.000 leituras e as ASVs que apresentaram ≤50 leituras na amostra foram excluídas da análise como parâmetro de determinação de ocorrência de espécies por amostra (Dario et al., 2022).

### **Análises estatísticas**

Um teste Chi-quadrado foi utilizado para verificar se havia diferenças significativas entre em machos e fêmeas quanto à infecção por tripanosomatídeos através do software R (R Development Core Team, 2021).

### **Análise filogenética**

Para identificação de espécies/genótipos de cinetoplastídeos e agrupamento genético, as leituras de ASV foram alinhadas às sequências de espécies de rDNA 18S de cinetoplastídeos recuperadas do banco de dados GenBank usando o algoritmo L-INS-I, disponível no software MAFFT v.7.0 (Japão) (KATOH et al., 2013). O alinhamento foi inspecionado e editado manualmente no MEGA7 (Kumar et al., 2016). As análises de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI) foram realizadas. Os melhores modelos de substituição de base foram escolhidos de acordo com o critério de informação Akaike corrigido em *jModelTest*-2.1.10 para cada modelo (Darriba et al., 2012). A reconstrução ML foi realizada usando o software *IQ-Tree* (Viena, Áustria) (Nguyen et al., 2015). O *bootstrap* ultrarrápido (Hoang et al., 2018) foi realizado com 5.000 réplicas com 1.000 interações máximas e coeficientes de correlação mínimos de 0,99 para suporte de ramificação, e o teste de ramificação SH-

aLRT foi realizado com 5.000 réplicas para validar o resultado da inicialização ultrarrápida. O método de busca heurística utilizado foi o padrão do programa, e o algoritmo para obtenção da árvore final foi o *Neighbor Joining*. A inferência bayesiana foi realizada no programa *MrBayes* (Huelsenbeck et al., 2001; Ronquist et al., 2003), usando o método de Cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) para atribuir tripanosomatídeos antes da informação. Quatro execuções independentes foram realizadas para 20 milhões de cadeias MCMC, com amostragem a cada 2.000 gerações e 25% de *burn-in* de cada execução. Todos os programas foram disponibilizados na plataforma *Phylosuite* v1.2.2 (China) (Zhang et al., 2020) e as árvores de reconstrução foram visualizadas no software *FigTree* v.1.4.3.

Para verificar a intraespecificidade de *Trypanosoma cascavelli*, foi construída uma rede de haplótipos por *median-joining* (Bandelt et al., 1999) e máxima parcimônia (Polzin; Daneshmand, 2003).

### **Coleta de flebotomíneos e identificação**

Para excluir a possibilidade de transmissão vetorial por *Lutzomyia*, único vetor com tamanho suficiente para entrar na caixa que as serpentes são mantidas, foi realizada coleta de flebotomíneos em dois pontos na Universidade Católica Dom Bosco (Campo Grande/MS), dentro e fora do setor Biotério UCDB (20° 24' 33" S e 54° 36' 56" O) e no entorno da reserva Surucuá (20°24'39" S e 54°36'54" O) (Figura 9). Foram utilizadas seis armadilhas luminosas tipo CDC-LT (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA, USA), armadas entre 1m e 1,5m de altura do solo. As coletas ocorreram entre dezembro de 2022 e maio de 2023, com instalação entre 17h e 8h. A montagem da lâmina para fixação do flebotomíneo foi realizada conforme Forattini (1973) e a identificação da espécie seguiu a classificação proposta por Galati (2021).



**Figura 9.** Pontos de instalação de armadilhas luminosas tipo CDC-LT (ícones) o Biotério UCDB e no entorno da reserva Surucuá. **A:** ampliação da estrutura física do Biotério evidenciando os pontos de instalação das armadilhas na parte interna e externa do prédio; **B:** ampliação da sala em que as serpentes eram mantidas com duas armadilhas instaladas no interior; **C:** armadilha instalada na parte externa do prédio.

## RESULTADOS

### Padronização da concentração de DNA para PCR de sangue animais com hemácias nucleadas

A padronização da concentração de DNA de coágulo sanguíneo de serpentes está contida na Tabela 1 e resultou em reconhecer, somada a visualização em gel de agarose, que a concentração de aproximadamente 100 ng/µL foi a ideal para realização do diagnóstico molecular.

**Tabela 1.** Valores dos testes de diluição de DNA genômico de serpente com concentração em ng/µL e os valores de absorbância (A260/A280).

Diluições	ng/µL	A260/A280
Original	2593.2	1.559
1:1	1818.9	1.792
1: 0,500	908.8	1.833
1: 0,250	510.4	1.860
1: 0,125	261.2	1.837
<b>1: 0,0625</b>	<b>86.49</b>	<b>1.648</b>

### Diagnóstico molecular de Trypanosomatidae

O diagnóstico molecular revelou que 33,96% (36/106) dos animais apresentaram DNA de tripanosomatídeos, sendo 47,94% (35/73) em *C. durissus* e somente um indivíduo entre 33 de *B. moojeni*. Das 36 amostras que apresentaram DNA de Trypanosomatidae, cinco apresentaram sobreposição de picos no sequenciamento Sanger, tratando-se de uma infecção mista, tornando necessário uma nova abordagem para classificação específica.

Das 35 cascavéis que apresentaram DNA de tripanosomatídeos, 23 eram fêmeas e 12 eram machos, entretanto não houve diferença significativa quanto a infecção em relação ao sexo em *C. durissus*. Todas as hemoculturas, exames à fresco e esfregaços sanguíneos realizados foram negativos. A variação do tempo de cativeiro

das serpentes no Biotério UCDB e presença de DNA de tripanosomatídeos podem ser observadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Amostras de *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* positivas para Trypanosomatidae e o período dos registros de entrada no Biotério UCDB.

GRUPO	INTERVALO DE TEMPO	n TOTAL	n POSITIVOS 18S rDNA	OCORRÊNCIA (%)
1	2000-2005	14	07	50
2	2006-2011	16	05	31,2
3	2012-2017	30	12	40
4	2018-2022	41	12	29,2

### Clonagem - Trypanosomatidae sp. CROT

A clonagem do produto amplificado, resultou em quatro sequências de 568pb. A análise dessas sequências por *BLASTn* revelou que essas compartilhavam uma cobertura que variou de 99.99 a 100% e identidade de 97.02 a 97.90% com uma sequência de Trypanosomatidae sp. depositada no GenBank (número de acesso: AF071866.1), nomeada ‘strain EVA’ (em referência a *Lutzomyia evansi*, espécie de flebotomíneo que foi coletado na Venezuela e que apresentou o DNA desse tripanossomatídeo). No entanto, posteriormente essas sequências de DNA foram confirmadas, em conjunto com a análise filogenética, como constituindo um novo gênero. Essa nova Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU) foi denominada “CROT” (Trypanosomatidae sp. CROT) em referência ao hospedeiro mais numeroso (*C. durissus*).

### Sequenciamento de nova geração

Todas as amostras de coágulo sanguíneo de serpentes que apresentaram DNA de Trypanosomatidae para o gene 18S rDNA descritas na Tabela 2 foram enviadas para sequenciamento de nova geração (NGS), sendo uma desconsiderada por não apresentar o número mínimo de *reads*.

Nossos resultados mostraram que, independentemente do tempo de cativeiro, as serpentes podem manter tanto a presença de DNA de tripanosomatídeos de mamíferos como de serpentes por até 20 anos (Figura 10). Assim, em 37 das 106

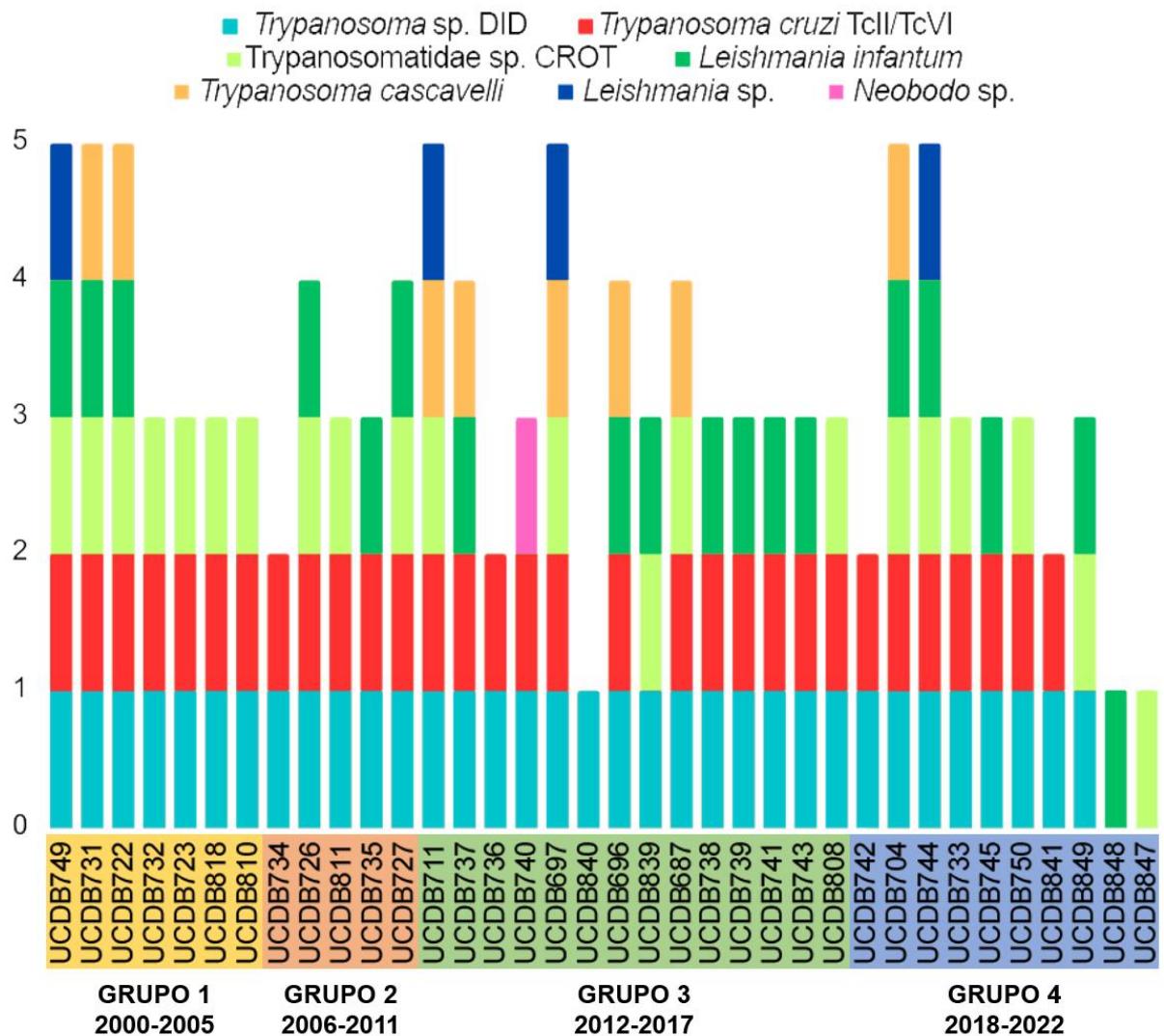
serpentes examinadas (*Bothrops* e *Crotalus*), foi possível demonstrar a presença de DNA de ao menos uma espécie de tripanossomatídeo.

O NGS mostrou a presença de DNA de quatro espécies de tripanosomatídeos classicamente reconhecidas como de hospedeiros mamíferos: *Trypanosoma cruzi* TcII/VI, *Leishmania* sp., *L. infantum*, *Trypanosoma* sp. DID. Além dessas, identificamos DNA de *T. cascavelli* e *Trypanosomatidae* sp. CROT em *B. moojeni* e *C. durissus*.

Três indivíduos, todos da espécie *C. durissus*, apresentaram DNA de uma única espécie de tripanossomatídeo (respectivamente, *L. infantum*, *Trypanosomatidae* sp. CROT e *Trypanosoma* sp. DID). Contudo, DNA desses três protozoários também foram encontrados simultaneamente com DNA das demais espécies de tripanosomatídeos nas outras amostras de serpentes analisadas (Figura 10).

Sequências de DNA de *T. cruzi* TcII/VI e *Trypanosoma* sp. DID foram encontradas na maioria das serpentes, 30/35 e 33/35 respectivamente, independentemente de seu tempo de cativeiro. O terceiro tripanossomatídeo mais comum (21/35), *Trypanosomatidae* sp. CROT, foi encontrado em todos os períodos amostrados (Figura 10).

Sequências de DNA de *L. infantum* foram detectadas em 18 de 35 indivíduos, independentemente do período amostrado. Sequências de DNA de *Leishmania* sp. foram encontradas em somente seis serpentes, não ocorrendo no grupo com 12 a 17 anos de cativeiro.



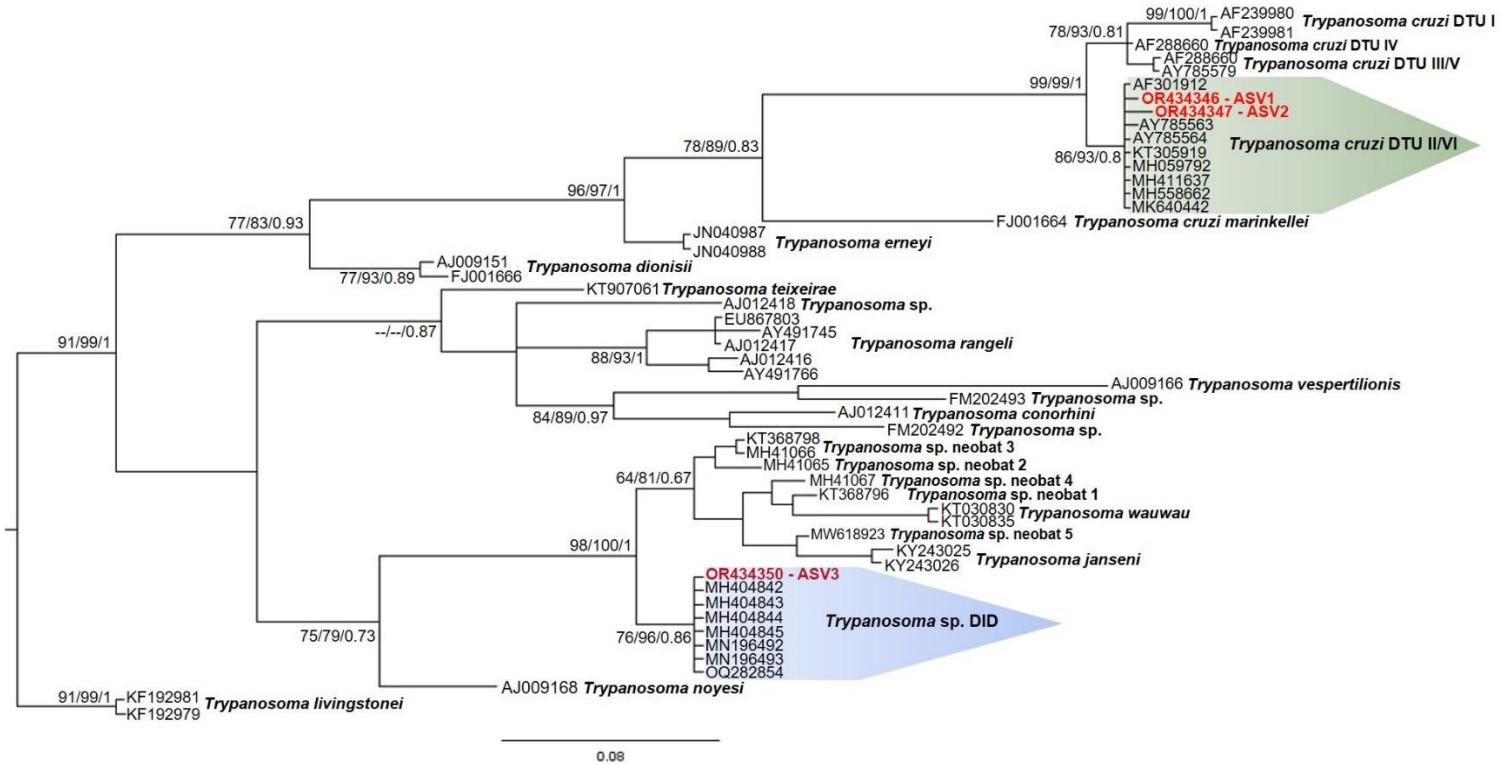
**Figura 10.** Representação gráfica da detecção de DNA de Kinetoplastea através do sequenciamento de nova geração (NGS) por indivíduo (todos *C. durissus* - exceção de UCDB687, único *B. moojeni*) e separados por tempo de cativo.

### Análise filogenética baseada nas sequências obtidas no NGS

#### Clado cruzi

A análise filogenética mostrou que as sequências de *T. cruzi* (ASV2) e *T. cruzi* TcII (ASV1) ficaram muito próximas, de forma que ambas devem ser tratadas como *T. cruzi* TcII/TcVI, pois não foi possível a separação desses genótipos como observado na figura 11. Além disso, observou-se que a sequência de *Trypanosoma*

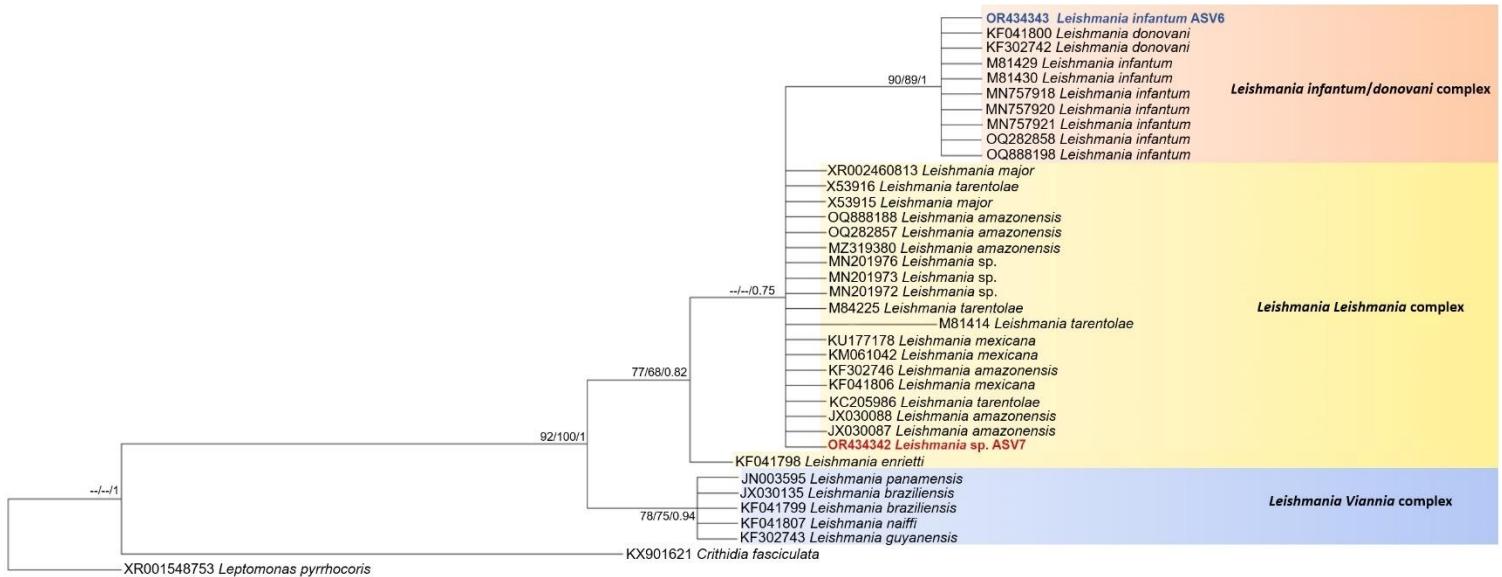
sp. DID (ASV3) se agrupou com as outras sequências de *Trypanosoma* sp. DID já previamente depositadas no GenBank.



**Figura 11.** Árvore filogenética do clado *Trypanosoma cruzi* baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (TIM2 + G) e BI - Inferência Bayesiana (SYM + I + G). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). O fundo verde indica o grupo formado por *T. cruzi* DTU TcII/TcVI e o fundo azul indica as sequências identificadas como *Trypanosoma* sp. DID.

### *Leishmania* spp.

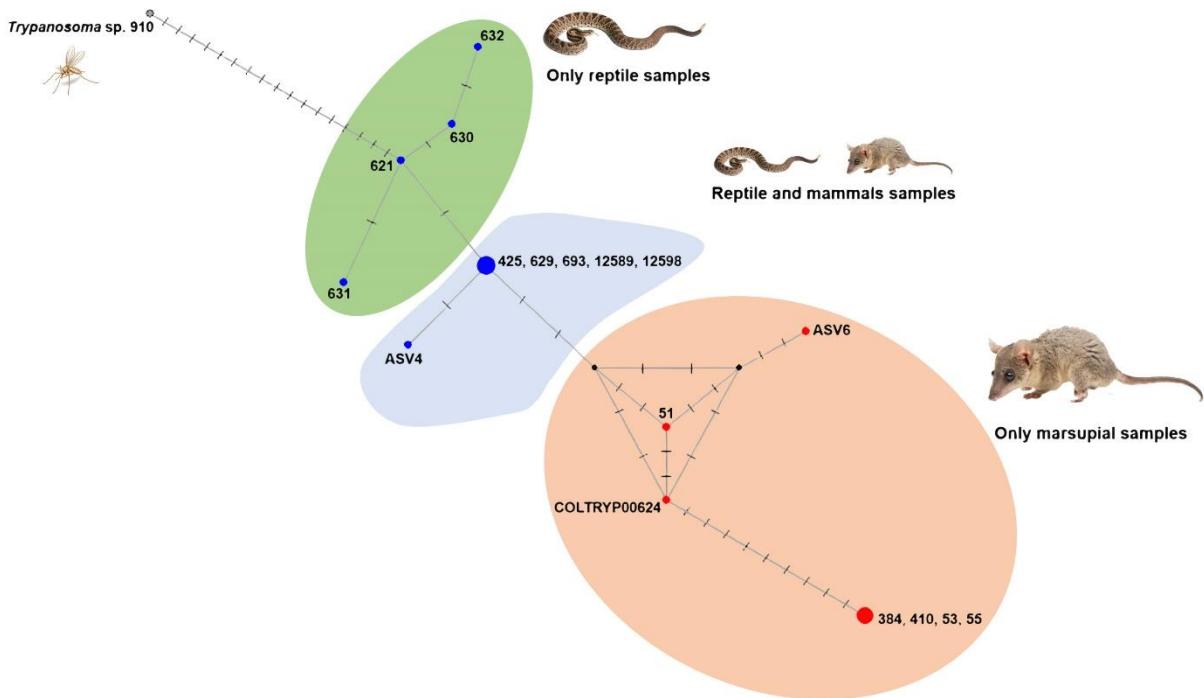
A sequência ASV6, previamente identificada como *L. infantum* através do sequenciamento de nova geração, confirmou seu status taxonômico na árvore filogenética de *Leishmania* spp. (Figura 12). A sequência ASV7 foi agrupada no complexo *Leishmania* *Leishmania*, sendo assim classificada como *Leishmania* sp.



**Figura 12.** Árvore filogenética de *Leishmania* spp. baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (TN93e) e BI - Inferência Bayesiana (K80e). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). Os quadrados vermelho, amarelo e azul correspondem aos complexos *L. infantum/donovani*, *Leishmania (Leishmania)* e *L. (Viannia)*, respectivamente. A ASV6 ficou agrupada com sequências de *Leishmania* do complexo *L. infantum/donovani*, enquanto que AV7 ficou agrupada com sequências do complexo *Leishmania (Leishmania)*.

### Rede de haplótipos de *T. cascavelli*

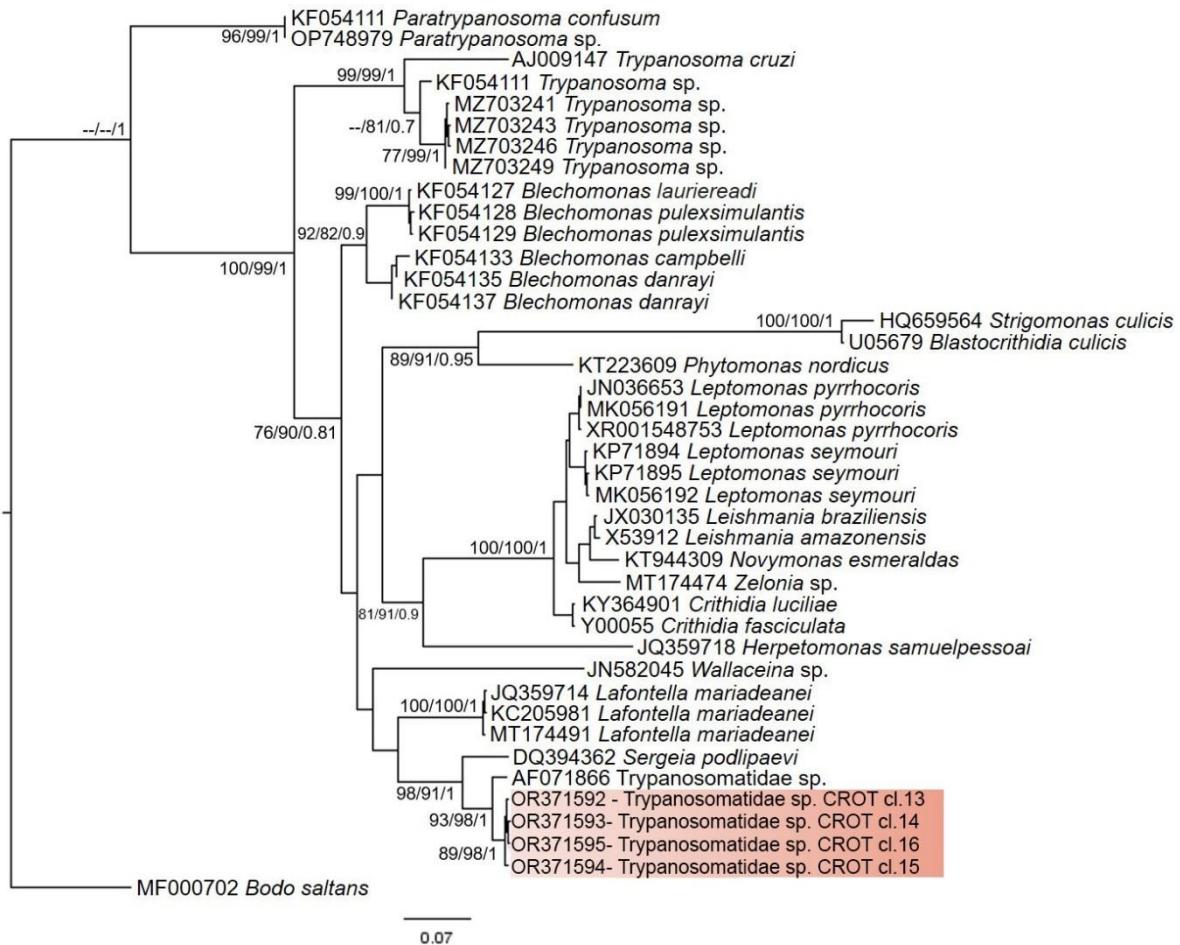
A rede haplotípica mostrou três haplogrupos em *T. cascavelli*, sendo: 1) exclusivos de serpentes (n=4); 2) exclusivos de marsupiais (n=7) e 3) encontrado em marsupiais e serpentes (n=6). A sequência ASV4 de *T. cascavelli*, do presente estudo, está incluída no haplogrupo 3 (Figura 13).



**Figura 13.** Rede de haplótipos de *Trypanosoma cascavelli* construída com sequências do gene 18S rDNA de amostras de diferentes vertebrados. O tamanho de cada nó é proporcional à frequência da sequência. O círculo preto pequeno representa o vetor mediano. O fundo vermelho representa *T. cascavelli* que ocorre apenas em marsupiais; o fundo azul representa *T. cascavelli* que ocorre em serpentes e marsupiais; o fundo verde representa *T. cascavelli* que ocorre apenas em serpentes. O ponto cinza representa *Trypanosoma* sp. 910 (EU095838), intimamente relacionado à tripanossomatídeo de serpentes que ocorrem em flebotomíneo (grupo externo). As sequências de *T. cascavelli* utilizadas na análise foram: PCE51 (MH411650); PCE53 (MH411651); PCE55 (MH411652); PCE384 (MH411653); PCE410 (MH411656); COLTRYP00624 (MF141867); 693 (EU095845); 632 (EU095844); 631 (EU095843); 630 (EU095842); 629 (EU095841); 621 (EU095840); 425 (EU095837); LBT12589 (OP508234); LBT12598 (OP508235); ASV6 (OQ282855); ASV4 (presente estudo - OR434344).

### Trypanosomatidae sp. CROT, um novo gênero

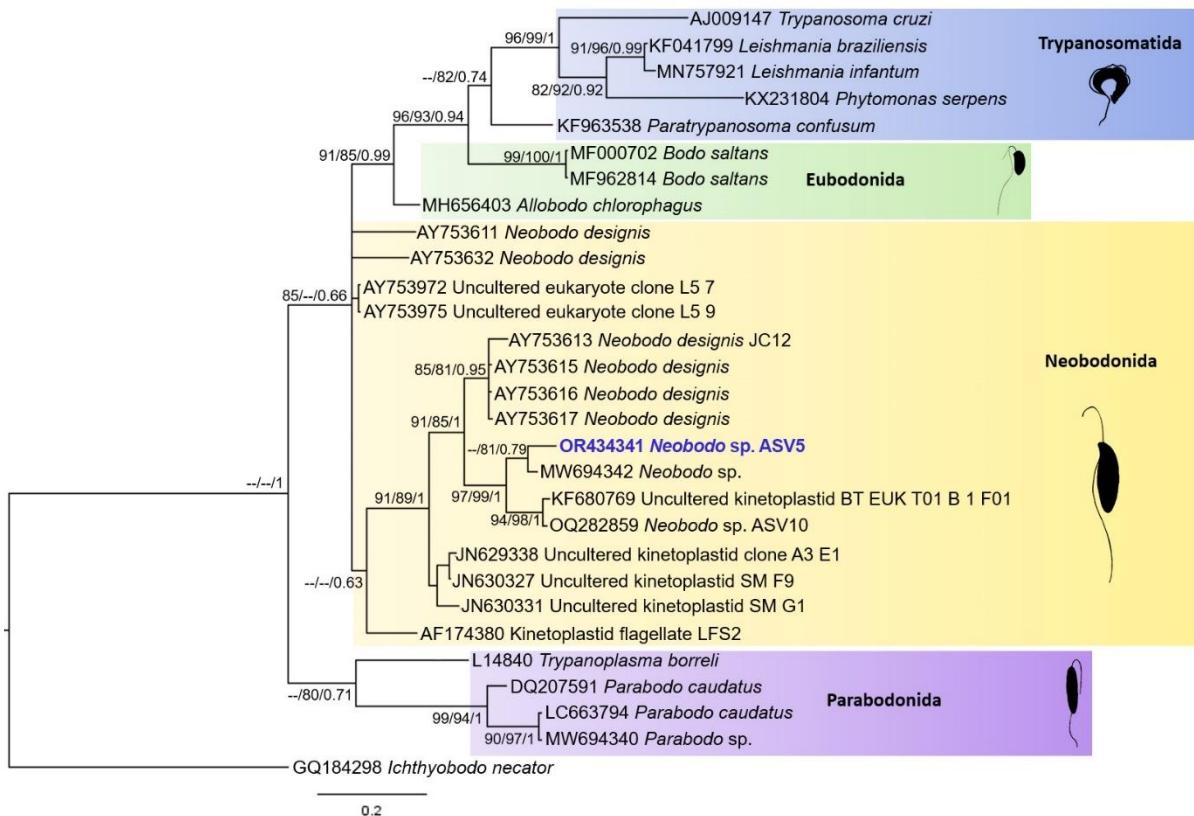
A análise filogenética das quatro sequências de DNA de Trypanosomatidae sp. CROT não as agrupou com nenhum outro gênero da família Trypanosomatidae, formando um grupo independente que apresentou pequenas variações intragrupo (Figura 14). As variações observadas sinalizam se tratar ao menos de genótipos distintos, quiçá, novas espécies.



**Figura 14.** Árvore filogenética da ordem Trypanosomatida baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (TIM2 + I + G) e BI - Inferência Bayesiana (GTR + I + G). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). O fundo vermelho representa um novo gênero de tripanossomatídeo estreitamente relacionado à Trypanosomatidae sp.

## Análise filogenética de Kinetoplastea

Os primers utilizados na nPCR com alvo para gene 18S rDNA são específicos para a família Trypanosomatidae, entretanto uma sequência de DNA gerada no NGS (ASV5) não gerou uma classificação específica, indicando a necessidade de uma análise complementar. Dessa forma, a análise filogenética agrupou a sequência ASV5 no gênero *Neobodo* (Figura 15), porém, a distância filogenética sugere ser uma nova espécie.



**Figura 15.** Árvore filogenética da classe Kinetoplastea baseada no gene 18S rDNA para amostras de DNA de serpentes. As árvores foram inferidas com duas abordagens: ML - Máxima Verossimilhança (GTR + I + G) e BI - Inferência Bayesiana (GTR + I + G). O número de nós corresponde a ML (ultrabootstrap e SH-aLRT) e BI (probabilidade posterior). A barra de escala mostra o número de substituições de nucleotídeos por sítio. Os traços representam os valores ultrabootstrap/SH-aLRT ausentes ou inferiores (<60). As cores de fundo representam as seguintes ordens: azul - Trypanosomatida; verde – Eubodonida; amarelo – Neobodonida; roxo – Parabodonida. A ASV5 agrupou-se com sequências de *Neobodo* da ordem Neobodonida.

### Coleta de flebotomíneos no entorno do serpentário

O esforço amostral foi de 15 horas armadilha/dia, totalizando 990 horas. A amostragem por área foi de 360 horas no Biotério UCDB e 630 horas no entorno da mata Surucuá. Um único flebotomíneo foi capturado no entorno da mata há 137m do Biotério UCDB, sendo classificado como *Psathyromyia campograndensis*.

## DISCUSSÃO

### DNA DE PARASITOS NOS TECIDOS: INFECÇÃO OU NÃO?

Existem diversos conceitos de infecção disponíveis (Barreto et al., 2006; Silva; Angerami et al., 2008; Brussow et al., 2019), todos tem a ideia comum de que se trata da invasão de um microrganismo e seu desenvolvimento no corpo de um animal causando ou não doença. No entanto, na era da genômica, faltam definições no vocabulário que refletem o significado da presença de DNA de microrganismos em tecidos de animais.

A técnica de PCR tem sido defendida como ferramenta de identificação de organismos que não podem ser cultivados *in vitro* ou em casos em que as técnicas de cultura existentes são insensíveis e/ou precisam de tempos de incubação prolongados (Yang; Rothman, 2004), inclusive novas tecnologias como a PCR Digital têm sido descritas como ferramentas de diagnóstico de infecções parasitárias (Pomari et al., 2019).

A presença de DNA de parasitas em hospedeiros não usuais tem sido recentemente documentada pela biologia molecular, Martínez-Hernández et al. (2022) utilizaram o termo infecção para a presença de DNA de *T. cruzi* em diferentes tecidos (coração, intestino, fígado e peito) de coruja *Tyto furcata*. Chen et al. (2019) relataram como infecção natural a presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de fígado de serpentes. No Brasil, Dario et al. (2016) também descreveram como infecção a presença de DNA de *T. cruzi* (DTUs I, II, III e IV) e *Trypanosoma dionisii* em tecido cardíaco humano fixado em parafina. Pelo exposto, a presença de DNA deve ser interpretada como evidência de infecção.

### DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A técnica de PCR com primers específicos para família Trypanosomatidae em conjunto com o sequenciamento de nova geração mostrou ser uma estratégia eficiente e sensível para a detecção de tripanossomatídeos em serpentes. Contudo, alguns ajustes foram necessários para alcançar esses

resultados. O DNA extraído de amostras de coágulo de serpentes revelou uma concentração muito elevada em relação a, por exemplo, DNA de mamíferos extraído com a mesma técnica e isso se deve ao fato de répteis apresentarem hemácias nucleadas. Essa concentração média de 2000 ng/μl inibe a reação da PCR, sendo necessário testar uma concentração de DNA que permita a reação da PCR e a detecção dos tripanossomatídeos. As diluições foram testadas com a utilização de DNA total de uma serpente comprovadamente parasitada por Trypanosomatidae. Foi concluído que a concentração de ~100 ng/μl permitiu a detecção de tripanossomatídeos sem inibição da reação por excesso de DNA. Esse procedimento provavelmente resultou em que a riqueza amostrada seja subestimada. Mesmo assim, foi possível observar seis táxons diferentes de Kinetoplastea nas amostras de serpentes, portanto, sugere-se que essa riqueza seja ainda maior.

A expressiva diferença na taxa de infecção em *C. durissus* (35/73) em relação à *B. moojeni* (01/33), pode representar a existência de micro diferenças ecológicas ainda não descritas (tanto na serpente, como no parasito), possibilitando esse resultado discrepante, ou uma maior resistência de *B. moojeni* à infecção por tripanosomas de serpentes. A infecção experimental de um isolado de *T. cascavelli* mostrou que *B. moojeni* apresentou parasitemia mais baixas em comparação à *C. durissus* (Viola et al., 2008).

Era esperado que o grupo de serpentes com menor tempo de cativeiro, por estarem expostos à infecção no ambiente natural recentemente, apresentasse maior riqueza de tripanossomatídeos em relação à animais com maior tempo de cativeiro, o que não aconteceu. Observamos que a capacidade de serpentes manterem DNA de tripanossomatídeos de mamíferos estendeu-se por mais de 20 anos.

Embora a passagem de moléculas de DNA do interior do tubo digestivo para outros tecidos já tenha sido comprovada (Spisák et al., 2013), para que ocorra uma dispersão sistêmica de microrganismos ou moléculas é necessária uma condição de lesão do muco externo e do epitélio para acesso da barreira vascular intestinal interna (Paone; Cani, 2020; Takiishi et al., 2017). Além disso, o tempo de permanência de DNA livre no sangue é curto: por volta de uma a duas horas (Xing et al., 2022; Thierry et al., 2010), podendo ser reduzido entre quatro (Rumore et al., 1992) e 30 minutos (Moreira et al., 2006) em condições patológicas. Portanto, é improvável que o DNA de tripanossomatídeos que encontramos nas serpentes seja remanescente da aquisição

de DNA por via oral há 20 anos. Sendo assim, hipotetizamos que esses animais se infectaram na natureza antes do cativeiro e mantiveram essa infecção até o presente.

*Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) é reportada como um dos principais vetores de *L. infantum* nas Américas (Cabrera et al., 2023; Thomaz-Soccol et al., 2023). No Mato Grosso do Sul, além de *Lu. longipalpis*, outras espécies também podem ser encontradas esporadicamente infectadas por *Leishmania* spp., são elas: *Lu. cruzi*, *Lu. almerioi* (Savani et al., 2009), *Lu. forattinii* (Pita-Pereira et al., 2008) e *Nyssomyia whitmani* (Ribeiro et al., 2015), entretanto, não se sabe o papel das mesmas na epidemiologia das leishmanioses. O único espécime capturado no presente estudo foi através de uma armadilha que estava a 137m do Biotério UCDB e a limitação da distância de voo descrita em literatura é de até 100m (Galvis-Ovallos et al., 2018), descartando assim a hipótese de transmissão vetorial nas serpentes avaliadas.

A hipótese da ocorrência de algum ciclo de transmissão dentro do serpentário não deve ser levada em consideração, pois seria necessário provar a entrada de possíveis vetores desses tripanosomatídeos (p.e. *Lutzomyia* spp.) dentro do biotério, o que não pode ser comprovado como descrito na seção resultados.

Os resultados consistentemente negativos dos testes parasitológicos (exames de sangue à fresco, hemocultura e esfregaço sanguíneo corado) indicaram a ausência de flagelados circulantes no momento de coleta, mas não invalidam a possibilidade de que esses flagelados estivessem presentes em um outro momento da infecção.

A presença de *T. cruzi* nas serpentes examinadas é interessante pelo fato de que até então aves e répteis eram considerados refratários para infecção por esse protozoário (Kierszenbaum et al., 1976; Urdaneta-Morales; McLure, 1981). Entretanto, essa refratariedade possa ter evitado outras investigações com aplicação de novas ferramentas de diagnóstico não disponíveis na época. O elevado número de serpentes positivas por *T. cruzi* em nosso estudo, juntamente com os recentes achados da infecção em *Tyto furcata* (coruja-da-igreja ou suindara) (Martinéz-Hernández et al., 2022) e em quatro espécies de lagartos, sendo que uma delas (*Liolaemus platei*) teve a habilidade de transmitir o protozoário para um barbeiro (*Mepraia spinolai*) não infectado (Botto-Mahan et al., 2022), sugere que *T. cruzi* pode estar se estabelecendo em novos hospedeiros.

A infecção por *L. infantum* em répteis já foi confirmada através da PCR de formas amastigotas de medula de lagarto (*Tarentola mauritanica*) (Mendoza-Roldan

et al., 2022) e por PCR de fígado nas serpentes *Psammophis lineolatus* e *Gloydius halys* (Chen et al., 2019). A ocorrência simpática de répteis, animais domésticos e humanos em áreas de transmissão, segundo Mendoza-Roldan et al. (2022), podem facilitar a transmissão de *L. infantum*, contudo os autores não apresentam uma hipótese explicativa. Campo Grande é uma região endêmica e enzoótica para leishmaniose e outras cidades do Estado já apresentaram surtos da doença em humanos. Esses dados mostram a expressiva dispersão de *L. infantum* no Estado do Mato Grosso do Sul, no entanto, a importância ou não das serpentes no ciclo enzoótico de transmissão ainda precisa ser estudado.

Tripanosomas de serpentes apresentam baixa especificidade quanto a seus hospedeiros (Viola et al., 2008) e *T. cascavelli* não é exceção, uma vez que, além de *C. durissus* (Viola et al., 2009), já foi reportado ainda em marsupiais: *Monodelphis domestica* (Santos et al., 2022a), *D. albiventris*, *Marmosa demerarae* (Rodrigues et al., 2019a), *M. americana* (Dario et al., 2017) e agora em outra espécie de serpente, a *B. moojeni*. Diferente de outros mamíferos, os marsupiais nascem ectotérmicos e desenvolvem gradualmente a endotermia durante a lactação dentro do marsúpio termicamente estável (Ikonomopoulou; Rose, 2006; Gaughan et al., 2015) e esses animais tendem a apresentar uma baixa temperatura corporal (25°C à 33°C) em relação a outros mamíferos (Dawson; Olson, 1988; Busse et al., 2014). Embora ectotérmicas, as serpentes apresentam comportamento termo regulatório em busca de temperaturas ideais. Foi observado em *B. insularis* preferência por temperaturas oscilando entre 24.9°C e 26.3°C (Bovo et al., 2012). Nesse sentido, pode-se considerar que tanto viperídeos, como marsupiais, apresentam uma faixa de temperatura comum, fator que pode ser crucial para estabelecimento de *T. cascavelli* em dois grupos tão distintos. A capacidade adaptativa de tripanosomatídeos às variações de temperatura já foi observada, por exemplo, em *C. mellifcae* que resistiu à três temperaturas diferentes e apresentou curvas de crescimento em 27°C e 36°C (Dario et al., 2021).

A rede haplotípica de *T. cascavelli*, que utilizou como grupo externo um isolado de flebotomíneo (*Trypanosoma* sp. 910) muito próximo filogeneticamente de tripanosomas de serpentes (Viola et al., 2008), mostrou três clados distintos: um clado exclusivo de serpentes, outro exclusivo de marsupiais e um terceiro clado, capaz de infectar ambos, serpentes e marsupiais. O haplogrupo exclusivo de serpentes mostrou-se filogeneticamente mais próximo ao grupo externo (*Trypanosoma* sp. 910).

O haplogrupo exclusivo de marsupiais está mais distante filogeneticamente do grupo externo (*Trypanosoma* sp. 910). O haplogrupo comum a marsupiais e serpentes estava inserido na rede haplotípica entre os dois grupos citados anteriormente. Dessa forma, sugere-se que as serpentes foram os hospedeiros originais de *T. cascavelli* e que o processo de adaptação a mamífero esteja acontecendo lentamente como visualizado na rede haplotípica através do posicionamento filogenético do haplogrupo de serpentes e marsupiais. Possivelmente, o potencial de infectar mamíferos já era pré-existente em *T. cascavelli*, um fenômeno conhecido como pré-adaptação ecológica (Agosta; Klemens, 2008). Esses três clados podem ser explicados através do processo que pode ter ocorrido há milhões de anos quando ambos os ancestrais dos hospedeiros utilizavam o mesmo habitat ou por um processo recente devido à ação antrópica em ambientais naturais e consequente proximidade entre os dois táxons de hospedeiros. Vale lembrar que serpentes do grupo *crown* e marsupiais didelfídeos tem sua origem datada em 100 milhões de anos a.p.

Heterogeneidade genética de *T. cascavelli* já havia sido descrita por Viola et al. (2008). O mesmo autor descreveu que *Crotalus durissus* nascidas em laboratório e infectadas experimentalmente com *T. cascavelli* isolado 621, apresentaram parasitemias significativas mantidas por um mês, apresentaram sinais clínicos e vieram à óbito após quatro meses. No entanto, quando infectadas com *T. cascavelli* isolado 425, também apresentaram parasitemia patente, porém sem registro de óbito. A rede haplotípica (Figura 13) mostra que o isolado 621, que causou óbito, pertence ao haplogrupo exclusivo de serpentes enquanto que o isolado 425, que não resultou em óbito, pertence ao haplogrupo de serpentes e marsupiais.

Dos animais que apresentaram DNA de Kinetoplastea em coágulo sanguíneo (n=35), *Trypanosoma* sp. DID esteve presente em amostras de 32 serpentes das duas espécies. Esse é o primeiro registro dessa MOTU em répteis (*C. durissus* e *B. moojeni*). *Trypanosoma* sp. DID é uma MOTU que foi relatada até aqui, pelo encontro de DNA em marsupiais e roedores. Utilizando como alvo o gene 18S e posterior clonagem, DNA de *Trypanosoma* sp. DID foi encontrado em *D. albiventris* de Goiás e *D. aurita* do Rio de Janeiro (Rodrigues et al., 2019b). Seguindo a mesma metodologia, Nantes et al. (2021) encontraram a mesma MOTU em *D. albiventris* de Campo Grande/MS. A partir do uso do gene 18S e sequenciamento de nova geração (NGS), Santos et al., (2022a) encontraram *Trypanosoma* sp. DID na espécie marsupial *T. macrurus* e nas espécies de roedores *Clyomys laticeps* e *Oecomys mamorae* do

Pantanal Sul-mato-grossense. Nenhuma diferença filogenética entre as MOTUs foi observada na análise realizada pelos mesmos autores e no presente estudo.

Todas as informações disponíveis para *Trypanosoma* sp. DID são de amostras de DNA de animais examinados no centro-oeste e sudeste do país, logo, não é possível concluir nada sobre essa aparente homogeneidade do táxon, que de fato é possível que se trate de uma MOTU geneticamente homogênea ou nossa amostragem não foi ampla suficiente para amostrar outros genótipos caso existam.

O táxon descrito nesse trabalho como *Trypanosomatidae* sp. CROT ficou agrupado em um clado de tripanossomatídeos descritos em invertebrados: *Trypanosomatidae* sp. 'strain EVA' derivada de um exemplar de *Lutzomyia evansi* da Venezuela e *Sergeia podlipaevi* originário de *Culicoides festivipennis* e *Culicoides truncorum* da República Tcheca (Svobodová et al., 2007). A análise filogenética da família *Trypanosomatidae*, incluindo *Trypanosomatidae* sp. CROT (Figura 14) mostra que esse táxon está inteiramente à parte dos outros gêneros da família, sugerindo se tratar de um novo gênero de tripanossomatídeo que inclui quatro genótipos (OR371592, OR371593, OR371594, OR371595).

A presença de DNA de *Neobodo* sp., um cinetoplastídeo de vida livre, em coágulo sanguíneo de um vertebrado (roedor) foi relatada pela primeira vez em 2022 (Santos et al., 2022a), também por NGS. Embora a análise filogenética tenha mostrado que o posicionamento da sequência de DNA *Neobodo* sp. estivesse agrupado junto de uma sequência de *Neobodo* sp. de *Glossina fuscipes*, foi observada uma diferença significativa no posicionamento de ambas, mostrando que a sequência encontrada nesse trabalho se trata de uma nova MOTU.

A detecção de DNA de *Neobodo* sp. no sangue de uma serpente, sugere que essa espécie de protozoário de vida livre é capaz de se estabelecer nesse tecido como já descrito em *Bodo* sp. em sangue de *Artibeus lituratus* e *Neobodo* sp. em sangue de *Oecomys mamorae* (Alves et al., 2023; Santos et al. 2022a). Também foi observada, por microscopia óptica, a presença de *Bodo* em amostra de saliva humana (Knowles; Gupta, 1924) e *Parabodo caudatus* em amostra de urina e sangue de cães domésticos (Vandersea et al., 2015; Huggins et al., 2019). A identificação de *Neobodo* sp. em um único animal pode estar associada a não utilização de um primer específico para esse grupo (p.e. Mukherjee et al., 2015) e caso isso fosse realizado, provavelmente poderia ter sido descrita uma maior taxa de infecção por outros Kinetoplastea nos animais amostrados.

A presença de *Neobodo* sp. em *C. durissus* pode ser considerada como infecção, pois mesmo que seja um flagelado heterotrófico comum em água (Patterson; Lee, 2000), seria necessário um conjunto de condições patológicas no intestino do hospedeiro que permitisse que o parasito tivesse acesso ao sangue por essa via (Paone; Cani, 2020; Takiishi et al., 2017). Também, é preciso considerar que o DNA permanece viável no sangue por um período de até duas horas em condições normais (Xing et al., 2022; Thierry et al., 2010).

Deste modo, é mais provável que *Neobodo* sp. tenha acessado a corrente sanguínea do hospedeiro já antes de chegar ao intestino, por exemplo através de uma lesão na mucosa oral. Assim, esse flagelado teria ficado viável até, ao menos, o momento da coleta de sangue tendo conseguido sobreviver aos mecanismos da resposta imune inata.

O presente estudo trouxe resultados considerados inesperados, como a infecção por tripanossomatídeos considerados como exclusivos de mamíferos em serpentes. Embora esses animais tenham apresentado a capacidade de manter esses tripanossomatídeos associados à mamíferos por mais de 20 anos em cativeiro intensivo, não se sabe qual o papel epidemiológico que esses répteis poderiam desenvolver na natureza. Mamíferos e répteis apresentam diferentes mecanismos de termorregulação, dessa forma, percebe-se que existe um ponto comum entre os grupos que, somada à plasticidade adaptativa desses tripanossomatídeos, permite o estabelecimento desses flagelados em diferentes grupos de hospedeiros.

O encontro de um parasito é frequentemente associado à alguma manifestação clínica por parte do hospedeiro; no entanto, é preciso levar em consideração que raramente um hospedeiro de vida livre é parasitado por uma única espécie, ao contrário do que acontece nas infecções experimentais. Assim sendo, qualquer manifestação clínica provavelmente resulta do sistema complexo resultante da interação do conjunto de parasitos desse hospedeiro. Os resultados mostraram que serpentes podem manter infecções mistas por até cinco táxons de tripanossomatídeos por até duas décadas e, ainda assim, permaneceram sem sinais clínicos aparentes em cativeiro com as condições em que estavam. Esse achado mostra que a hipótese formulada nesse trabalho foi rejeitada, já que as infecções mistas foram observadas em todos os grupos independente de seu tempo de cativeiro.

Adicionalmente, a identificação de novos táxons que possivelmente incluem um gênero e cinco espécies reforçam a noção da complexidade desse sistema

Kinetoplastea-hospedeiro como um modelo representativo do fenômeno parasitismo. Interpretar esses achados é um desafio, porém o encontro de outros Kinetoplastea classicamente não associados à vertebrados evidencia a importância de esclarecer esse fenômeno em trabalhos futuros.

## CONCLUSÕES

- É possível extrair DNA parasitário de sangue de animais que apresentam hemácias nucleadas a partir de diluições seriadas;
- A utilização de NGS (sequenciamento de nova geração) contribui significativamente para o conhecimento da diversidade de Kinetoplastea e de seus hospedeiros;
- Trypanosomatidae infecta indistintamente machos e fêmeas de *C. durissus*;
- As infecções mistas por tripanosomatídeos na natureza são a maioria dos casos e não a exceção;
- A diversidade de Kinetoplastea ainda é subestimada, como comprova o encontro de novas unidades moleculares taxonômicas operacionais (MOTUs);
- Serpentes apresentam a capacidade manter infecção por *T. cruzi* e *L. infantum* por até 20 anos;
- O DNA de *T. cruzi* nas serpentes infectadas por esse táxon foi identificado como sendo do genótipo TcII/TcVI;
- *Trypanosoma* sp. DID, reportado até o presente somente em mamíferos, é capaz de infectar serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*;
- A rede haplotípica de *T. cascavelli* reconheceu três grupos: 1) exclusivo de serpentes, 2) exclusivo de marsupiais e 3) ambos, serpentes e marsupiais;

- Trypanosomatidae sp. CROT constitui um novo gênero que inclui quatro genótipos/espécies;
- O encontro de DNA de *Neobodo* sp. no coágulo de uma *C. durissus* sugere fortemente que esse gênero pode infectar vertebrados.

## REFERÊNCIAS

- ABEBE, R.; GUTE, S.; SIMON, I. Bovine trypanosomosis and vector density in Omo-Ghible tsetse belt, South Ethiopia. **Acta Trop.** v. 167, p. 79–85. 2017.
- ACOSTA, I. DA. C. L.; COSTA, A. P.; NUNES, P. H.; GONDIM, M. F. N.; GATTI, A.; JR., J. L. R.; ET AL. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. **Parasit. Vectors.** v. 6, n. 349, p.1–12. 2013.
- ADAMS, E. R.; HAMILTON, P. B.; RODRIGUES, A. C.; MALELE, I. I.; DELESPAUX, V.; TEIXEIRA, M. M. G.; GIBSON, W. New *Trypanosoma (Duttonella) vivax* genotypes from tsetse flies in East Africa. **Parasitology.** v. 137, n. 4, p. 641-650. 2010.
- ADL, S. M.; BASS, D.; LANE, C. E.; LUKEŠ, J.; SCHOCH, C. L.; SMIRNOV, A.; AGATHA, S.; BERNEY, C.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; CÁRDENAS, P.; ČEPIČKA, I.; CHISTYAKOVA, L.; DEL CAMPO, J.; DUNTHORN, M.; EDVARDSEN, B.; EGLIT, Y.; GUILLOU, L.; HAMPL, V.; HEISS, A. A.; HOPPENRATH, M.; JAMES, T. Y.; KARNKOWSKA, A.; KARPOV, S.; KIM, E.; KOLISKO, M.; KUDRYAVTSEV, A.; LAHR, D. J. G.; LARA, E.; LE GALL, L.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MASSANA, R.; MITCHELL, E. A. D.; MORROW, C.; PARK, J. S.; PAWLOWSKI, J. W.; POWELL, M. J.; RICHTER, D. J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SHIMANO, S.; SPIEGEL, F. W.; TORRUELLA, G.; YOUSSEF, N.; ZLATOGURSKY, V.; ZHANG, Q. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 66, p. 4–119. 2019.
- AGOSTA, S. J.; KLEMENS, J. A. Ecological fitting by phenotypically flexible genotypes: implications for species associations, community assembly and evolution. **Ecol. Lett.** v.11, n. 11, p. 1123–1134. 2008.
- AKHOUNDI, M.; KUHLS, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 10. 2016.
- ALBORZI, A.; RASOULI, M.; SHAMSIZADEH, A. *Leishmania tropica*-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 74, n. 2. 2006.
- ALEXANDER, J. B.; YOUNG, D. G. Dispersal of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 87, p. 397-403. 1992.
- ALFONSO, J. J.; KAYANO, A. M.; GARAY, A. F. G.; SIMÕES-SILVA, R.; SOBRINHO, J. C.; VOURLIOTIS, S.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A.; GÓMEZ, M. C. V. Isolation, Biochemical Characterization and Antiparasitic Activity of BmatTX-IV, A Basic Lys49-Phospholipase A2 from the Venom of *Bothrops mattogrossensis* from Paraguay. **Curr. Top. Med. Chem.** v.19, n. 22, p. 2041–2048. 2019.

- AL-JAWABREH, A.; DIEZMANN, S.; MÜLLER, M.; WIRTH, T.; SCHNUR, L.F.; STRELKOVA, M.V.; KOVALENKO, D.A.; RAZAKOV, S.A.; SCHWENKENBECHER, J.; KUHLS, K.; SCHÖNIAN, G. Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania* (*Leishmania*) *major* by microsatellite analysis. **BMC Evol. Biol.** v. 8, p. 183, 2008.
- ALVES, F. M.; LISBOA, C. V.; DARIO, M. A.; NOVAES, R. L. M.; TIEPOLO, L.M.; MORATELLI, R.; JANSEN, A. M. Old Methods, New Insights: Reviewing Concepts on the Ecology of Trypanosomatids and *Bodo* sp. by Improving Conventional Diagnostic Tools. **Pathogens** v. 12, 71. 2023.
- ANDRADE, A. J.; CORDEIRO, D. P.; COSTA, J. C. R.; GALATI, E. A. B. **Diptera: Psychodidae**. In: ZAMPAULO, R. A.; PROUS, X. (org.). Fauna cavernícola do Brasil. Belo Horizonte, Ed. Rupestre, p 285–30. 2022.
- ARANTES, J.; FONSECA, F. Pesquisas sobre Trypanosomas. I. *Trypanosoma butantanense*, sp. n., parasita da serpente *Ophis merremii* Wagler, 1824. **Mem. Inst. Butantan**, v. 6, p. 215-22, 1931.
- AREGAWI, W. G.; AGGA, G. E.; ABDI, R. D.; BÜSCHER, P. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. **Parasit. Vectors**. v. 12, n. 1. 2019.
- ARNDT, H.; DIETRICH, D.; AUER, B.; CLEVEN, E.; GRAFENHAM, T.; WEITERE, M.; MYLNIKOV, A. P. **Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems**. In: LEADBEATER, B. S. C.; GREEN, J. C. (org.), The Flagellates. Taylor & Francis, London. p. 240–268. 2000.
- ATTIAS, M.; SATO, L. H.; FERREIRA, R. C.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M.; DE SOUZA, W. Developmental and Ultrastructural Characterization and Phylogenetic Analysis of *Trypanosoma herthameyeri* n. sp. of Brazilian Leptodactylidae Frogs. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 63, n. 5, p. 610-622. 2016.
- AUSTEN, J. M.; VAN KAMPEN, E.; EGAN, S. L.; O'DEA, M. A.; JACKSON, B.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J.; PRADA, D. First report of *Trypanosoma dionisii* (Trypanosomatidae) identified in Australia. **Parasitology**. v. 147, n. 14, p. 1801-1809. 2020.
- AUSTEN, J. M.; JEFFERIES, R.; FRIEND, J. A.; RYAN, U.; ADAMS, P.; REID, S. A. Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n. sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gilbert's potoroo (*Potorous gilbertii*) and quokka (*Setonix brachyurus*). **Parasitology**. v. 136, p. 783–792. 2009.
- AVERIS, S.; THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; WAYNE, A. F.; MORRIS, K. D.; SMITH, A. The diversity, distribution and host-parasite associations of trypanosomes in Western Australian wildlife. **Parasitology**. v. 136, n. 11, p. 1269–1279. 2009.
- AZIZI, K.; MOEMENBELLAH-FARD, M.D.; FAKOORZIBA, M.R.; FEKRI, S. *Gerbillus nanus* (Rodentia: muridae): a new reservoir host of *Leishmania major*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** v.105, n. 6, p. 431–437. 2011.
- AYALA, S. C.; ATKINSON, C.; VAKALIS, N. Two new trypanosomes from North American snakes. **J. Parasitol.** v. 69, n. 2, p. 391-396, 1983.
- BAKER, J. R.; THOMPSON, G. B. Two species of *Trypanosoma* from British bats. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 65, n. 4, p. 427. 1971.
- BANDEIRA, I. C. J.; BANDEIRA-LIMA, D.; MELLO, C. P.; PEREIRA, T. P.; DE MENEZES, R. R. P. P. B.; SAMPAIO, T. L.; FALCÃO, C. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A. M. C. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like

- vipericidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. **Parasitology**. v. 145, n. 8, p. 1059–1064. 2018.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol.** v. 16, p. 37–48. 1999.
- BARBOSA, A. D.; GOFTON, A. W.; PAPARINI, A.; CODELLO, A.; GREAY, T.; GILLETT, A.; WARREN, K.; IRWIN, P.; RYAN, U. Increased Genetic Diversity and Prevalence of Co-Infection with *Trypanosoma* Spp. in Koalas (*Phascolarctos cinereus*) and Their Ticks Identified Using Next-Generation Sequencing (NGS). **PLoS one**. v. 12, n. 7. 2017.
- BARBOSA, L. G.; COSTA, T. R.; BORGES, I. P.; COSTA, M. S.; CARNEIRO, A. C.; BORGES, B. C.; SILVA, M. J. B.; AMORIM, F. G.; QUINTON, L.; YONEYAMA, K. A. G.; DE MELO RODRIGUES, V.; SAMPAIO, S. V.; RODRIGUES, R. S. A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjussuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian *Bothrops* snake venoms. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 167, p. 267–278. 2021.
- BARROS, J. H. D. S.; ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. D. C.; NASCIMENTO, K. C. S.; TOMA, H. K.; MADEIRA, M. F. Biological and Genetic Heterogeneity in *Trypanosoma dionisii* Isolates from Hematophagous and Insectivorous Bats. **Pathogens**. v. 9, n. 9, p. 736. 2020.
- BELDOMENICO, P. M.; TELFER, S.; GEBERT, S.; LUKOMSKI, L.; BENNETT, M.; BEGON, M. The vicious circle and infection intensity: the case of *Trypanosoma microti* in field vole populations. **Epidemics**. v. 1, n. 3, p. 162-167. 2009.
- BELOVA, E. M. Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. **Bull. World Health Organ.** v. 44. 553p. 1971.
- BENALLAL, K. E.; MEZAI, G.; MEFISSEL, M.; KLARI, N.; LARDJANE, C.; KHARDINE, A. F.; KHERACHI, I.; DIB, Y.; BRAHMI, K.; SADLOVA, J.; VOLF, P.; HARRAT, Z. Host competence of Algerian *Gerbillus amoenus* for *Leishmania major*. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 21, p. 69–73. 2023.
- BERNARDE, P. S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Anolisbooks, 2014. 224p.
- BEST, M. P.; ASH, A.; BERGFELD, J.; BARRETT, J. The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. **Vet. Parasitol.** v. 202, n. 3–4, p. 292–295. 2014.
- BORGES, A. F.; GOMES, R. S.; RIBEIRO-DIAS, F. *Leishmania (Viannia) guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. **Pathog. Dis.** v. 76, n. 4, 2018.
- BOTERO, A.; THOMPSON, C. K.; PEACOCK, C. S.; CLODE, P. L.; NICHOLLS, P. K.; WAYNE, A. F.; ET AL. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 2, n. 1, p. 77–89. 2013.
- BOTTO-MAHAN, C.; CORREA, J. P.; ARAYA-DONOSO, R.; FARÍAS, F.; SAN JUAN, E.; QUIROGA, N.; CAMPOS-SOTO, R.; REYES-OLIVARES, C.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D. Lizards as Silent Hosts of *Trypanosoma cruzi*. **Emerg Infect Dis.** v. 28, n. 6, p.1250-1253. 2022.
- BOUET, G. Sur quelques trypanosomes des vertébrés à sang froid de l'Afrique Occidentale Française. **C. R. Séances Soc.** v. 66, p. 609-611, 1909.
- BRAVO, F.; SALAZER-VALENZUELA, D. A new species of *Sycorax* Curtis (Diptera, Psychodidae, Sycoracinae) collected on harlequin frogs (Anura: Bufonidae, *Atelopus*) in the Ecuatorian Andes. **Zootaxa**. v. 2093, n. 1. p. 37–42. 2009.

- BRUFORD, M. W., HANOTTE, O., BROOKFIELD, J. F. Y., BURKE, T. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. In: Hoelzel, A.R. (Ed.), Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. **IRL Press, Oxford**. p. 287–336. 1998.
- BRUMPT, E. Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomiase de Chagas. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** v. 7, n. 10, p. 706-710, 1914.
- BRYGOO, E. R. Hematozoaires de reptiles Malgaches. III. Deux Trypanosomes nouveaux: *Trypanosoma haranti* n. sp. d'Ophidien et *Trypanosoma domerguei* n. sp. parasite d'Iguane. **Arch. Inst. Pasteur. Madag.** v. 34, p. 47-54, 1965.
- BURGER, J.; CAMPBELL, K. R.; MURRAY, S.; CAMPBELL, T. S.; GAINES, K. F.; JEITNER, C.; SHUKLA, T.; BURKE, S.; GOCHFELD, M. Metal levels in blood, muscle and liver of water snakes (*Nerodia* spp.) from New Jersey, Tennessee and South Carolina. **Sci. Total Environ.** v. 15, p. 556-563. 2007.
- BUSSE, S.; LUTTER, D.; HELDMAIER, G.; JASTROCH, M.; MEYER, C.W.; Torpor at high ambient temperature in a neotropical didelphid, the grey short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). **Sci. Nat.** v. 101, p. 1003–1006. 2014.
- CABRERA, A.; PITA, S.; GONZÁLEZ, T.; VIERA, A.; VERGER, L.; PIEGAS, S.; WILLAT, G.; FREZIA, P.; BASMADJIÁN, Y. Genetic variability highlights the invasion route of the *Lutzomyia longipalpis* complex, the main vector of Visceral Leishmaniasis in Uruguay. **Zoonoses Public Health.** v. 70, n. 5, p. 383-392. 2023.
- CACCIALI, P.; CAICEDO, J. R.; CARREIRA, S.; FITZGERALD, L.; GUTIÉRREZ-CÁRDENAS, P.; KACOLIRIS, F.; MONTERO, R.; RENJIFO, J.; RIVAS, G.; RODRÍGUEZ, J.; SCOTT, N. *Crotalus durissus*. **The IUCN Red List of Threatened Species**. 2021.
- CADLE, J. E. **Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography**. In: SEIGEL, R.; COLLINS J.; NOVAK, S. Snakes: Ecology and Evolutionary Biology. 1. ed. New York: Macmillian Publishing, p. 77-105, 1987.
- CALDART, E. T.; FREIRE, R. L.; FERREIRA, F. P.; RUFFOLO, B. B.; SBEGHEN, M. R.; MAREZE, M.; GARCIA, J. L.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 26, n. 1, p. 17–27. 2017.
- CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nat. Methods**. v. 13, p. 581–583. 2016.
- CAMARGO, E. P. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Adv. Parasitol.** v. 42, p. 29–112. 1999.
- CAMPBELL, T. W. **Clinical pathology of reptiles**. In: Mader, D. R. (org.). Reptile medicine and surgery. 2. ed. St. Louis: Elsevier, p. 460–465. 2006.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press, Ithaca. 528 pp. 2004.
- CAMPOS-SOTO, R.; DÍAZ-CAMPUSANO, G.; QUIROGA, N.; MUÑOZ-SAN MARTÍN, C.; RIVES-BLANCHARD, N.; TORRES-PÉREZ, F. *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines and rodents co-occur in a coastal island of northern Chile. **PeerJ**. v. 8. 2020.
- CARONE, S. E. I.; COSTA, T. R.; BURIN, S. M.; CINTRA, A. C. O.; ZOCCAL, K. F.; BIANCHINI, F. J.; TUCCI, L. F. F.; FRANCO, J. J.; TORQUETI, M. R.; FACCIOLE, L. H.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO, F. A.; SAMPAIO, S. V. A new I-amino acid

- oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 103, p. 25–35. 2017.
- CASANOVA, C.; COSTA, A. I. P.; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 7, p. 719–724. 2005.
- CASSAN, C.; DIAGNE, C. A.; TATARD, C.; GAUTHIER, P.; DALECKY, A.; BÂ, K.; KANE, M.; NIANG, Y.; DIALLO, M.; SOW, A.; BROUAT, C.; BAÑULS, A. L. *Leishmania major* and *Trypanosoma lewisi* infection in invasive and native rodents in Senegal. **PLoS Negl Trop Dis.** v.12, n. 6. 2018.
- CERÍACO, L. M. P.; MARQUES, M. P. Serpentes venenosas e acidentes ofídicos, **Rev. Ciência Elem.** v. 9, n. 4. 2021.
- CHEN, H.; LI, J.; ZHANG, J.; GUO, X.; LIU, J.; HE, J.; SONG, Q.; ZHANG, J.; CHEN, M.; ZHENG, Z.; CHEN, D.; CHEN, J. Multi-locus characterization and phylogenetic inference of *Leishmania* spp. in snakes from Northwest China. **PLoS One.** v. 14, n. 4. 2019.
- COIMBRA, D. P.; PENEDO, D. M.; SILVA, M. O. M.; ABREU, A. P. M.; SILVA, C. B.; VERONA, C. E.; HELIODORO, G. C.; MASSARD, C. L.; NOGUEIRA, D. M. Molecular and morphometric identification of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in blood samples of marmosets (*Callithrix*: Callithrichidae) from the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol. Int.** v. 75. 2020.
- COOPER, C.; THOMPSON, R. C. A.; BOTERO, A.; KRISTANCIC, A.; PEACOCK, C.; KIRILAK, Y.; CLODE, P. L. A comparative molecular and 3-dimensional structural investigation into cross-continental and novel avian *Trypanosoma* spp. in Australia. **Parasit. Vectors.** v. 10, n. 234. 2017.
- CORDEIRO, D.; WAGNER, R. **Family Psychodidae.** In: HAMADA, N.; THORP, J.; CHRISTOPHER ROGERS, D. (org.). Thorp and Covich's freshwater invertebrates. 4th Edition. Volume 3: Keys to Neotropical Hexapoda. 4. ed. Elsevier. p. 765–770. 2018.
- CORRÊA, L. L.; OLIVEIRA, M. S.; TAVARES-DIAS, M.; CECCARELLI, P. S. Infections of *Hypostomus* spp. by *Trypanosoma* spp. and leeches: a study of hematology and record of these hirudineans as potential vectors of these hemoflagellates. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 25, n. 3, p. 299-305. 2016.
- COSTA, A. P.; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G.; MESQUITA, E. T.; GENNARI, S. M.; MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.** p. 656-566. 2015.
- COSTA, H. C.; GUEDES, T.; BÉRNILS, R. S. Lista de répteis do Brasil: padrões e tendências. **Herpetol. Bras.** v. 10, n. 3, p. 110–279. 2022.
- CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2470 pp., 2014.
- CURLER, G. R.; KRZEMIŃSKI, W.; SKIBIŃSKA, K. The first record of fossil *Horaiellinae* (Diptera: Psychodidae) from mid-Cretaceous amber of northern Myanmar. **Cretac. Res.** v. 98, p. 305–315. 2019.
- DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEG, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; DE PAIVACAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol.** v. 28, n. 12, p. 531–538. 2012.

- DARIO, M. A.; FURTADO, C.; LISBOA, C. V.; DE OLIVEIRA, F.; SANTOS, F. M.; D'ANDREA, P. S.; ROQUE, A. L. R.; XAVIER, S. C. D. C.; JANSEN, A. M. Trypanosomatid Richness Among Rats, Opossums, and Dogs in the Caatinga Biome, Northeast Brazil, a Former Endemic Area of Chagas Disease. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 12, 2022.
- DARIO, M. A.; LISBOA, C. V.; SILVA, M. V.; HERRERA, H. M.; ROCHA, F. L.; FURTADO, M. C.; MORATELLI, R.; ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. *Crithidia mellifica* infection in different mammalian species in Brazil. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 15, p. 58-69. 2021.
- DARIO, M. A.; LISBOA, C. V.; COSTA, L. M.; MORATELLI, R.; NASCIMENTO, M. P.; COSTA, L. P.; ET AL. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo State, Brazil. **PLoS One**. v. 12. 2017.
- DARIO, M. A.; RODRIGUES, M. S.; BARROS, J. H.; XAVIER, S. C.; D'ANDREA, P. S.; ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasit. Vectors**. v. 9, n. 1, p. 477. 2016.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nat. Methods** v. 9. 2012.
- DA SILVA, F. M.; MARCILI, A.; ORTIZ, P. A.; EPIPHANIO, S.; CAMPANER, M.; CATAO-DIAS, J. L.; SHAW, J. J.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. **Infect Genet Evol**. v. 10, n. 4, p. 522-9. 2010.
- DA SILVA, F. M.; MARCILI, A.; LIMA, L.; CAVAZZANA, M.; JR, ORTIZ, P. A.; CAMPANER, M.; TAKEDA, G. F.; PAIVA, F.; NUNES, V. L.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Trop**. v. 109, n. 3, p. 199–207. 2009.
- DAVIES, A. J.; JOHNSTON, M. R. L. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. **Adv. Parasitol.** v. 45, p. 1-107, 2000.
- DAVIES, C. R.; REITHINGER, R.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; FELICIANGELI, D.; BORGES, R.; RODRIGUEZ, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cad. Saude Publica**. v. 16, n. 4, p. 925–950. 2000.
- D'AVILA-LEVY, C. M.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, H. L.; MORELLI, K. A.; GRYBCHUKIEREMENKO, A.; DUVAL, L.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; GRELLIER, P.; LUKE'S, J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the highthroughput DNA sequencing era. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 8, p. 956–965. 2015.
- DAWSON, T. J.; OLSON, J. M. Thermogenic capabilities of the opossum when warm and cold acclimated: similarities between American and Australian marsupials. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 89, p. 85–91. 1988.
- DEANE, M. P.; DEANE, L. M. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente parasitada pela *Leishmania donovani*. **O Hospital**. v. 46, n. 6, p. 651-653, 1954.
- DE MACEDO, G. C.; BARRETO, W. T. G.; DE OLIVEIRA, C. E.; SANTOS, F. M.; PORFÍRIO, G. E. O.; XAVIER, S. C. D. C.; ALVES, F. M.; DA SILVA, A. R.; DE ANDRADE, G. B.; RUCCO, A. C.; DE ASSIS, W. O.; JANSEN, A. M.; ROQUE, A. L. R.; HERRERA, H. M. *Leishmania infantum* infecting the carnivore *Nasua nasua* from urban forest fragments in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazilian Midwest. **Front. cell. infect. microbiol.** v. 12. 2023.

- DE SOUZA, C. S. F.; CALABRESE, K. S.; ABREU-SILVA, A. L.; CARVALHO, L. O. P.; CARDOSO, F. O.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; QUARESMA, P. F.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; ROSSI, M. I. D.; DA COSTA, S. C. G.; ZAVERUCHA DO VALLE, T. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. **Histol. Histopathol.** v. 33, n. 7, p. 705–716. 2018.
- DEMATEI, A.; NUNES, J. B.; MOREIRA, D. C.; JESUS, J. A.; LAURENTI, M. D.; MENGARDA, A. C. A.; VIEIRA, M. S.; DO AMARAL, C. P.; DOMINGUES, M. M.; DE MORAES, J.; PASSERO, L. F. D.; BRAND, G.; BESSA, L. J.; WIMMER, R.; KUCKELHAUS, S. A. S.; TOMÁS, A. M.; SANTOS, N. C.; PLÁCIDO, A.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A. Mechanistic Insights into the Leishmanicidal and Bactericidal Activities of Batroxocidin, a Cathelicidin-Related Peptide from a South American Viper (*Bothrops atrox*). **J. Nat. Prod.** v. 84, n. 6, p. 1787–1798. 2021.
- DE OLIVEIRA SIMÕES, R.; DE ANDRADE-SILVA, B. E.; CARDOSO, T. D. S.; GENTILE, R.; GONÇALVES-OLIVEIRA, J.; VILELA, R. D. V.; MALDONADO JÚNIOR, A. New hosts for a snake's helminth: First report of intermediate and definitive hosts naturally infected by *Ophidascaris arndti* (Ascarididae) in the wild. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 19, p. 285–293. 2022.
- DE OLIVEIRA, S. S. C.; GONCALVES, D. D.; GARCIA-GOMES, A. D.; GONCALVES, I. C.; SEABRA, S. H.; MENNA-BARRETO, R. F.; et al. Susceptibility of *Phytomonas serpens* to calpain inhibitors in vitro: interference on the proliferation, ultrastructure, cysteine peptidase expression and interaction with the invertebrate host. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 112(1):31–43. 2017.
- DE OLIVEIRA TOLEDO, F. A.; ALVES, P. V.; ARTHUSO VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, A. R.; DOS SANTOS, D. O.; GOMES CABRAL, J. A.; RIGHI DE TOLEDO, R. A.; PINTO, H. A.; HENRIQUES CUNHA, P. H.; OLIVEIRA PAES LEME, F.; NOGUEIRA DE CARVALHO, M. P.; DA PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Parasitologic and pathologic study of free-ranging south american rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) in Brazil. **J. Zoo Wildl. Med.** v. 53, n. 3, p. 515–527. 2022.
- DEPAQUIT, J.; GRANDADAM, M.; FOUQUE, F.; ANDRY, P.; PEYREFitte, C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. **Euro Surveill.** v. 15, n. 10. 2010.
- DOUGALL, A.; SHILTON, C.; CHOY, J. L.; ALEXANDER, B.; WALTON, S. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. **Epidemiol. Infect.** v. 137, n. 10, p. 1516–1520. 2009.
- DVOŘÁKOVÁ, N.; ČEPIČKA, I.; QABLAN, M. A.; GIBSON, W.; BLAŽEK, R.; ŠIROKÝ, P. Phylogeny and Morphological Variability of Trypanosomes from African Pelomedusid Turtles with Redescription of *Trypanosoma mocambicum* Pienaar, 1962. **Protist.** v. 166, n. 6, p. 599-608. 2015.
- DYACHENKO, V.; STEINMANN, M.; BANGOURA, B.; SELZER, M.; MUNDERLOH, U.; DAUGSCHIES, A.; BARUTZKI, D. Co-infection of *Trypanosoma pestanai* and *Anaplasma phagocytophilum* in a dog from Germany. **Vet. Parasitol.: Reg. Stud. Rep.** v. 9, p. 110–114. 2017.
- DYKOVÁ, I.; FIALA, I.; LOM, J.; LUKES, J. *Perkinsiella amoebae*-like endosymbionts of *Neoparamoeba* spp., relatives of the kinetoplastid *Ichthyobodo*. **Europ. J. Protistol.** v. 39, p. 37–52. 2003.
- ELFARI, M.; SCHNUR, L. F.; STRELKOVA, M. V.; EISENBERGER, C. L.; JACOBSON, R. L.; GREENBLATT, C. L.; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from

- Central Asia, the Middle East and Africa. **Microbes. Infect.** v.7, n.1, p. 93-103, 2005.
- ESPINOSA, O. A.; SERRANO, M. G.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G.; SHAW, J. J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**. v. 145, p. 430–442. 2016.
- FANTHAM, H. B.; PORTER, A. The endoparasites of some North American snakes and their effects on the ophidia. **Proc. Zool. Soc. Lond.** v. 123, p. 867-98, 1953.
- FANTHAM, H. B.; PORTER, A. The endoparasites of certain South African snakes, together with some remarks on their structure and effects on their hosts. **Proc. Zool. Soc. Lond.** v. 120, p. 599-647, 1950.
- FERMINO, B. R.; PAIVA, F.; VIOLA, L. B.; RODRIGUES, C. M. F.; GARCIA, H. A.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A.; SHEFERAW, D.; KISAKYE, J. J.; KATO, A.; JARED, C. A. G. S.; TEIXEIRA, M. M. G.; CAMARGO, E. P. 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. **Parasit. Vectors.** v. 12, n. 1. 2019.
- FERMINO, B. R.; PAIVA, F.; SOARES, P.; TAVARES, L. E.; VIOLA, L. B.; FERREIRA, R. C.; BOTERO-ARIAS, R.; DE-PAULA, C. D.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S.; TEIXEIRA, M. M.; CAMARGO, E. P. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 4, n. 3, p. 368–378. 2015.
- FERMINO, B. R.; VIOLA, L. B.; PAIVA, F.; GARCIA, H. A.; DE PAULA, C. D.; BOTERO-ARIAS, R.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; HAMILTON, P. B.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. 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. **Parasit. Vectors.** v. 6, n. 1. 2013.
- FERREIRA, J. I. G. S.; DA COSTA, A. P.; NUNES, P. H.; RAMIREZ, D.; FOURNIER, G. F. R.; SARAIVA, D.; TONHOSOLO, R.; MARCILI, A. New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from South American marsupial in Brazilian Cerrado. **Acta Trop.** v. 176, p. 249–255. 2017.
- FERREIRA, R. C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L. B.; TAKATA, C. S.; TAKEDA, G. F.; TEIXEIRA, M. M. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**. v. 134, n. 11, p. 1623-38. 2007.
- FIELD, M. C.; CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nat. Rev. Microbiol.** v.7, p. 775–786. 2009.
- FONSECA, F. *Trypanosoma matogrossense*, sp. n. **Mem. Inst. Butantan.** v. 9, p. 191-193, 1935.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica: psychodidae, phlebotominae, leishmanioses, bartoneloses**. 4. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1973.
- GALATI, E.A.B. **Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas**. Vol. I. Apostila da Disciplina Bioecologia e Identificação de Phlebotominae do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 133 pp. 2021. Disponível em: <<http://www.fsp.usp.br/egalati>>. Acesso em agosto de 2023.

- GALATI, E. A. B. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classification, morphology and terminology of adults and identification of American taxa.** In: RANGEL, E. F.; SHAW, J. J. (org.). Brazilian Sand Flies. Springer International Publishing AG, Cham. p. 9–212. 2018.
- GALEN, S. C.; BORNER, J.; PERKINS, S. L.; WECKSTEIN, J. D. Phylogenomics from transcriptomic "bycatch" clarify the origins and diversity of avian trypanosomes in North America. **PLoS One.** v. 15, n. 10. 2020.
- GALVIS-OVALLOS, F.; CASANOVA, C.; PIMENTEL BERGAMASCHI, D.; BIANCHI GALATI, E. A. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 12, n. 4. 2018.
- GARCIA, H. A.; PAIVA, F.; NUNES, V. L. B.; RODRIGUES, A. C.; TEIXEIRA, M. M. G.; MINERVINO, A. H.; CAMPANER, M.; NUNES, V. L.; PAIVA, F.; HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. **Int. J. Parasitol.** v. 41, n. 13–14, p. 1385–1396. 2011.
- GAUGHAN, J. B.; HOGAN, L. A.; WALLAGE, A. **Thermoregulation in marsupials and monotremes.** Marsupials and monotremes: nature's enigmatic mammals. New York, NY, United States: Nova Science Publishers. p. 85-144. 2015.
- GIRAUDO, A.; CARREIRA, S.; SCOTT, N.; CACCIALI, P.; MONTERO, R. *Bothrops moojeni. The IUCN Red List of Threatened Species.* 2021.
- GRABNER, A. N.; ALFONSO, J.; KAYANO, A. M.; MOREIRA-DILL, L. S.; DOS SANTOS, A. P. A.; CALDEIRA, C. A. S.; SOBRINHO, J. C.; GÓMEZ, A.; GRABNER, F. P.; CARDOSO, F. F.; ZULIANI, J. P.; FONTES, M. R. M.; PIMENTA, D. C.; GÓMEZ, C. V.; TELES, C. B. G.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. BmajPLA2-II, a basic Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasiticidal potential. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 102, p. 571–581. 2017.
- GUESSOUS-IDRISSI, N.; BERRAG, B.; RIYAD, M.; SAHIBI, H.; BICHICHI, M.; RHALEM, A. Short report: *Leishmania tropica*: Etiologic agent of a case of canine visceral Leishmaniasis in Northern Morocco. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 57, n. 2, p. 172–173. 1997.
- HALLA, U.; KORBEL, R.; MUTSCHMANN, F.; RINDER, M. Blood parasites in reptiles imported to Germany. **Parasitol. Res.** v. 113, p. 4587-4599, 2014.
- HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. Em: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. (Eds.). American trypanosomiasis (Chagas disease) One hundred years of research. **Elsevier.** p. 321-44. 2017.
- HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M. M.; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends Parasitol.** v. 28, n. 4, p. 136-41. 2012.
- HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol. Phylogenetic Evol.** v. 44, p. 15–25. 2007.
- HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R.; GAUNT, M. W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W. C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int. J. Parasitol.** v.34, n. 12, p.1393–1404. 2004.
- HAYES, P. M.; LAWTON, S. P.; SMIT, N. J.; GIBSON, W. C.; DAVIES, A. J. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from

- South Africa, including its development in a leech vector. **Parasit. Vectors.** v. 7, n. 1. 2014.
- HERRERA, H. M.; ROCHA, F. L.; LISBOA, C. V.; RADEMAKER, V.; MOURÃO, G. M.; JANSEN, A. M. Food web connections and the transmission cycles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the Pantanal Region, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 105, n. 7, p. 380–387. 2011.
- HSIANG, A. Y.; FIELD, D. J.; WEBSTER, T. H.; BEHLKE, A. D.; DAVIS, M. B.; RACICOT, R. A.; GAUTHIER, J. A. The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. **BMC Evol. Biol.** v. 15, n. 87. 2015.
- HOANG, D. T.; CHERNOMOR, O.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q.; VINH, L. S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Mol. Biol. Evol.** v. 35, p. 518–522. 2018.
- HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals:** a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972.
- HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature.** v. 212, pp. 1385-1386. 1966.
- HOARE, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. Life cycle in tsetse-fly and in the crocodile. **Parasitology.** v. 23, p. 449–484. 1931.
- HOARE, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi* II. Experimental transmission to the crocodile. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 23, p. 39–56. 1929.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinform.** v. 17, p. 754–755. 2001.
- HUEY, R. B.; PIANKA, E. R. Ecological consequences of foraging mode. **Ecol.** v. 62, p. 991–999. 1981.
- HUGGINS, L. G.; KOEHLER, A. V.; NG-NGUYEN, D.; WILCOX, S.; SCHUNACK, B.; INPANKAEW, T.; TRAUB, R. J. A novel metabarcoding diagnostic tool to explore protozoan haemoparasite diversity in mammals: a proof-of-concept study using canines from the tropics. **Sci. Rep.** v. 9. 2019.
- HUMBERG, R. M.; OSHIRO, E. T.; CRUZ, M. DOS.; RIBOLLA, P. E.; ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. M.; BONAMIGO, R. A.; TASSO, N. JR; DE OLIVEIRA, A. G. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 87, n. 3, p. 470–472. 2012.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. D. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasit. Vectors.** v. 11, n. 1, p. 502. 2018.
- JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C.C.; ROQUE, A. L. R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. **Acta Trop.** v. 151, p. 1–15. 2015.
- JASKOWSKA, E.; BUTLER, C.; PRESTON, G.; KELLY, S. *Phytomonas:* trypanosomatids adapted to plant environments. **PLoS Pathog.** v. 11, n. 1. 2015.
- JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. Network news: the replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** v 66, n. 1, p. 473–491. 2012.
- JEŽEK, J.; WAHAB, R. A.; ŠEVČÍK, J.; WAHAB, R. A.; ŠEVČÍK, J. Two new species of *Sycorax* (Diptera: Psychodidae: Sycoracinae) from the Oriental Region. **Zootaxa.** v. 4057, n. 4. 2015.
- KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L.; SOLER, F. P. M.; SOARES, A. M.; CHAVANTES, M. C.; ZAMUNER, S. R. Effect of Isolated Proteins from *Crotalus durissus terrificus*

- Venom on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*-Infected Macrophages. **Protein Pept. Lett.** v. 27, n. 8, p. 718–724. 2020.
- KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D.; BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasit. Vectors**. v. 10, p. 287. 2017.
- KATO, H.; CÁCERES, A. G.; SEKI, C.; SILUPU GARCÍA, C. R.; HOLGUÍN MAURICCI, C.; CASTRO MARTÍNEZ, S. C.; MORENO PAICO, D.; CASTRO MUNIZ, J. L.; TROYES RIVERA, L. D.; VILLEGAS BRIONES, Z. I.; GUERRERO QUINCHO, S.; SULCA JAYO, G. L.; TINEO VILLAFUERTE, E.; MANRIQUE DE LARA ESTRADA, C.; ARIAS, F. R.; PASSARA, F. S.; RUELAS LLERENA, N.; KUBO, M.; TABBABI, A.; YAMAMOTO, D. S.; HASHIGUCHI, Y. Further insight into the geographic distribution of *Leishmania* species in Peru by cytochrome b and mannose phosphate isomerase gene analyses. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 13, n. 6. 2019.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Mol. Biol. Evol.** v. 30, p. 772–780. 2013.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections: a practical review. **Dermatol. Clin.** v. 33, p. 579–593. 2015.
- KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J.; BUDZKO, D. B. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection, Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**. v. 30, p. 1–6. 1976.
- KILlick-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol.** v. 17, n. 3, p. 279–289. 1999.
- KILlick-KENDRICK, R.; LAINSON, R.; RIOUX, J. A.; SAF'ANOVA, V. M. **The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles**. In: RIOUX JA (org.), *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse, Application Éco-épidémiologiques* (Colloque International du CNRS/INSERM, 1984), IMEE, Montpellier, p. 143–148. 1986.
- KIRKPATRICK, C. E.; TERWAY-THOMPSON, C. A.; IYENGAR, M. R. Biochemical characterization of some raptor trypanosomes. II. Enzyme studies, with a description of *Trypanosoma bennettin* sp. **Canadian Journal of Zoology**. v. 64, p. 195–203. 1986.
- KLATT, S.; SIMPSON, L.; MASLOV, D. A.; KONTUR, Z. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 13. 2019.
- KNOWLES, R.; DAS GUPTA, B. M. A note upon a flagellate protozoon found in the saliva. **Indian J. Med. Res.** v. 11, p. 737. 1994.
- KOSTYGOV, A.Y.; FROLOV, A.O.; MALYSHEVA, M.N.; GANYUKOVA, A.I.; CHISTYAKOVA, L.V.; TASHYREVA, D.; TESAROVA, M.; SPODAREVA, V. V.; REZNAROV' A, J.; MACEDO, D. H.; BUTENKO, A.; D'AVILA-LEVY, C. M.; LUKES, J.; YURCHENKO, V. *Vickermania* gen. nov., trypanosomatids that use two joined flagella to resist midgut peristaltic flow within the fly host. **BCM Biology**. v. 18, n. 187. 2020.
- KOSTYGOV, A. Y.; KARNKOWSKA, A.; VOTÝPKA, J.; TASHYREVA, D.; MACISZEWSKI, K.; YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biol.** v. 11. 2021.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.** v. 33, p. 1870–1874. 2016.

- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; READY, P. D.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 75, p. 530–536. 1981.
- LEAL, D. D.; O'DWYER, L. H.; RIBEIRO, V. C.; SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L.; RODRIGUES, R. B. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 2, p. 199-206. 2009.
- LEMA, T. **Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografia – ofidismo.** 1. ed. Porto Alegre. EDIPUCRS, 247p, 2002.
- LEMOS, M.; MORAIS, D. H.; CARVALHO, V. T.; D'AGOSTO, M. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). **J. Parasitol.** v. 94, n. 1, p. 148-151. 2008.
- LEVINE, N. D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**, vols. I and II. CRC Press: Boca Raton, 665 p., 1988.
- LEWIS, D. J. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental Region. **Syst. Entomol.** v. 12, n. 2, p. 163-180. 1987.
- LEWIS, D. J. Functional morphology of the mouth parts in New World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Trans. R. Ent. Soc. Lond.** v. 126, n. 4, p. 497–532. 1975.
- LEWIS, D.J. Phlebotomid sandflies. **Bull. W.H.O.** v. 44, p. 535- 551. 1971.
- LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P. B.; NEVES, L.; TAKATA, C. S.; CAMPANER, M.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasit. Vectors** v. 6, n. 1. 2013.
- LIN, R. H.; LAI, D. H.; ZHENG, L. L.; WU, J.; LUKEŠ, J.; HIDE, G.; LUN, Z. R. Analysis of the mitochondrial maxicircle of *Trypanosoma lewisi*, a neglected human pathogen. **Parasit. Vectors**. v. 8. 2015.
- LIZUNDIA, R.; NEWMAN, C.; BUESCHING, C. D.; NGUGI, D.; BLAKE, D.; SIN, Y. W.; MACDONALD, D. W.; WILSON, A.; MCKEEVER, D. Evidence for a Role of the Host-Specific Flea (*Paraceras melis*) in the Transmission of *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* to the European Badger. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.
- LOBÃO, L. F.; CORRÉA, L. L.; BRUNO, S. F.; DA SILVA, S.; UCHÔA, C. M. A.; DA SILVA BARBOSA, A. Diagnosis of endoparasite species and subtypes of *Cryptosporidium* spp. with one health importance, in feces from captive snakes in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol. Int.** v. 97. 2023.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. Protozoan Parasites of Fishes. **Dev. Aquac. Fish. Sci.** v. 26.1992.
- LUKES, J.; TESAROVA, M.; YURCHENKO, V.; VOTÝPKA, J. Characterization of a new cosmopolitan genus of trypanosomatid parasites, *Obscuromonas* gen. nov. (Blastocrithidiinae subfam. nov.). **Eur. J. Protistol.** v. 79, 2021.
- LUN, Z. *Trypanosoma rostellata* sp. nov. du serpent d'eau douce *Enhydris plumbea* Boie. **Acta Zoot. Sinica**, v. 10, n. 2, p. 119-21, 1985.
- MACFIE, J. W. S. Two parasites of *Naja nigricollis*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 13, n. 1, p. 23-30, 1919.
- MACKERRAS, M. J. The haematozoa of Australian mammals. **Aust. J. Zool.** v. 7, 105–135. 1959.

- MAFIE, E.; RUPA, F. H.; TAKANO, A.; SUZUKI, K.; MAEDA, K.; SATO, H. First record of *Trypanosoma dionisii* of the *T. cruzi* clade from the Eastern bent-winged bat (*Miniopterus fuliginosus*) in the Far East. **Parasitol. Res.** v. 117, n. 3, p. 673-680. 2018.
- MAGILL, A. J.; GROGL, M.; GASSER, R. A.; SUN, W.; OSTER, C. N. Visceral Infection Caused by *Leishmania tropica* in Veterans of Operation Desert Storm. **N. Engl. J. Med.** v. 328, n. 19, p. 1383-1387. 1993.
- MANTILLA, B. S.; MARCHESE, L.; CASAS-SÁNCHEZ, A. et al. Proline Metabolism is Essential for *Trypanosoma brucei brucei* Survival in the Tsetse Vector. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, 2017.
- MARQUES, O. A. V.; ETEROVIC, A. & SAZIMA, I. **Serpentes do Cerrado: Guia Ilustrado**. Editora Holos. Ribeirão Preto, SP. 215 p., 2015.
- MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med. Vet. Entomol.** v. 27, n. 2, p. 123-147. 2013.
- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F.; ORIA-MARTÍNEZ, B.; RENDÓN-FRANCO, E.; VILLALOBOS, G.; MUÑOZ-GARCÍA, C. I. *Trypanosoma cruzi*, beyond the dogma of non-infection in birds. **Infect. Genet. Evol.** v. 99. 2022.
- MASLOV, D. A.; OPPERDOES, F. R.; KOSTYGOV, A. Y.; HASHIMI, H.; LUKES, J.; YURCHENKO, V. Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**. v. 146, p. 1-27. 2019.
- MASLOV, D. A.; LUKE, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 75, p. 197-205. 1996.
- MATHIS, C.; LÉGER, M. Sur un nouveau trypanosome des serpents du Tonkin. **C. R. Séances Soc.** v. 67, 1909.
- MCINNES, L. M.; HANGER, J.; SIMMONS, G.; REID, S. A.; RYAN, U. M. Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Parasitology**. v. 138, n. 1, p. 59-70. 2011.
- MCINNES, L. M.; GILLETT, A.; RYAN, U. M.; AUSTEN, J.; CAMPBELL, R. S.; HANGER, J.; REID, S. A. *Trypanosoma irwini* n. sp (Sarcostigophora: Trypanosomatidae) from the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Parasitology**. v. 136, n. 8, p. 875-885. 2009.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**. v. 8. 2013.
- MCNAMARA, J.; MOHAMMED, G.; GIBSON, W. *Trypanosoma (Nannomonas) godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: Biological and biochemical characterization. **Parasitology**. v. 109, n. 4, p. 497-509. 1994.
- MEBRAHTU, Y. B.; LAWYER, P. G.; NGUMBI, P. M.; KIRIGI, G.; MBUGUA, J.; GACHIHI, G.; WASUNNA, K.; PAMBA, H.; SHERWOOD, J. A.; KOECH, D. K. A new rural focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kenya. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 86, p. 381-387. 1992.
- MEBRAHTU, Y.; LAWYER, P.; GITHURE, J.; WERE, J. B.; MUIGAI, R.; HENDRICKS, L.; LEEUWENBURG, J.; KOECH, D.; ROBERTS, C. Visceral leishmaniasis unresponsive to Pentostam caused by *Leishmania tropica* in Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 41, n. 3, p. 289-294. 1989.

- MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhetas do Brasil**. In: CARDOSO, J. L. C. et al. (org.). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 1.ed. São Paulo: Sarvier, p. 33-71, 2003.
- MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonhetas do Brasil**. In: CARDOSO, J.; FRANÇA, F.; WEN, F.; MÁLAQUE, C.; HADDAD-JR., V. (org.). *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo, SP: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda. pp. 33-61. 2009.
- MENDOZA-ROLDAN, J. A.; ZATELLI, A.; LATROFA, M. S.; IATTA, R.; BEZERRA-SANTOS, M. A.; ANNOSCIA, G.; GERNONE, F.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; TICHÁ, L.; VOLF, P.; OTRANTO, D. *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* isolation and sympatric occurrence with *Leishmania (Leishmania) infantum* in geckoes, dogs and sand flies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 16, n. 8. 2022.
- MENDOZA-ROLDAN, J. A.; LATROFA, M. S.; IATTA, R.; R S MANOJ, R.; PANARESE, R.; ANNOSCIA, G.; POMBI, M.; ZATELLI, A.; BEUGNET, F.; OTRANTO, D. Detection of *Leishmania tarentolae* in lizards, sand flies and dogs in southern Italy, where *Leishmania infantum* is endemic: hindrances and opportunities. **Parasit. Vectors**. v. 14, n. 1. 2021.
- MERINO-ESPINOSA, G.; CORPAS-LÓPEZ, V.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; DÍAZ-SÁEZ, V.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. Genetic variability and infective ability of the rabbit trypanosome, *Trypanosoma nabiasi*, Railliet 1895, in southern Spain. **Infect. Genet. Evol.** v. 45, p. 98-104. 2016.
- MOHEBALI, M.; HAJJARAN, H.; HAMZAVI, Y.; MOBEDI, I.; ARSHI, S.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; NAEINI, K. M.; AVIZEH, R.; FAKHAR, M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. **Vet. Parasitol.** v. 129, n. 3-4, p. 243–251. 2005.
- MOLYNEUX, D. H. **Trypanosomes of bats**. In: KREIER, J. P.; BAKER, J. R. (org.). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, USA, pp. 195–223. 1991.
- MOREIRA, D.; LOPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, n. 5, p. 1861-1875. 2004.
- MOREIRA, V. G.; MARTÍNEZ, T. D. L. C.; GONZÁLEZ, E. G.; GARCÍA, B. P.; MENÉNDEZ, F. V. A. Increase in and clearance of cell-free plasma DNA in hemodialysis quantified by real-time PCR. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 44, n. 12, p. 1410–1415. 2006.
- MORRISON, A. C.; FERRO, C.; MORALES, A.; TESH, R. B.; WILSON, M. L. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **J. Med. Entomol.** v. 30, p. 427-35. 1993.
- MUKHERJEE, I.; HODOKI, Y.; NAKANO, S. Kinetoplastid flagellates overlooked by universal primers dominate in the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa, Japan. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 91, n. 8. 2015.
- NANDI, N. C.; BENNETT, F. Rediscription of *T. corvi* Stephans & Christophers, 1908, emend. Baker 1976 and remarks on the trypanosomes of the avian family Corvidae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 89, p. 145–151. 1994.
- NANTES, W. A. G.; SANTOS, F. M.; DE MACEDO, G. C.; BARRETO, W. T. G.; GONÇALVES, L. R.; RODRIGUES, M. S.; CHULLI, J. V. M.; RUCCO, A. C.; ASSIS, W. O.; PORFÍRIO, G. E. O.; DE OLIVEIRA, C. E.; XAVIER, S. C. D. C.; HERRERA, H. M.; JANSEN, A. M. Trypanosomatid species in *Didelphis albiventris* from urban forest fragments. **Parasitol. Res.** v. 120, n. 1, p. 223–231. 2021.

- NGUYEN, L.-T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Mol. Biol. Evol.** v. 32, p. 268–274. 2015.
- NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **J. Herpetol.** v. 37, p. 653-659. 2003.
- NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Vet. Res.** v. 40, n. 2, p. 26. 2009.
- NOYES, H.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN, J.; HOLZ, P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. **Int. J. Parasitol.** v. 29, p. 331–339. 1999.
- O'DONOGHUE, P. Haemoprotezoa: making biological sense of molecular phylogenies. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 6, p. 241-256, 2017.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.94, n. 3, p. 489–493. 2016.
- OLSEN, O. W. **Animal parasites: their life cycles and ecology**. New York Courier Corporation. 564 pp. 1986.
- ORTIZ, P. A.; GARCIA, H. A.; LIMA, L.; MAIA, F.; CAMPANER, M.; PEREIRA, C. L.; ET AL. Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed *Rattus*-borne *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* and its allied species in blood and fleas of rodents. **Infect. Genet. Evol.** v. 63, p. 380–390. 2018.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol.** v. 29, n. 7, p. 339–345. 2013.
- OVERATH, P.; HAAG, J.; LISCHKE, A.; O'HUIGIN, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. **Int. J. Parasitol.** v. 31, n. 5–6, p. 468–471. 2001.
- PACE, D. Leishmaniasis. **J. Infect.** v. 69, p. 510-518, 2014.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. 2019. Disponível em: < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838>>. Acessado em outubro de 2023.
- PAONE, P.; CANI, P. D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? **Gut**. v. 69, p. 2232–2243. 2020.
- PAPARINI, A.; MACGREGOR, J.; IRWIN, P. J.; WARREN, K.; RYAN, U. M. Novel genotypes of *Trypanosoma binneyi* from wild platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*) and identification of a leech as a potential vector. **Exp. Parasitol.** v. 145, p. 42-50. 2014.
- PATTERSON, D. J.; LEE, W. J. **Geographic distribution and diversity of free-living heterotrophic flagellates**. In: LEADBEATER, B. S. C.; GREEN, J. C. (org.). *The Flagellates: Unity, Diversity and Evolution*. Taylor & Francis, London and New York. p. 259–287. 2000.
- PEIRCE, M. A.; NEAL, C. *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* in British badgers (*Meles meles*). **Int. J. Parasitol.** v. 4, p. 439–440. 1974.
- PEREZ, J. E.; VELAND, N.; ESPINOSA, D.; TORRES, K.; OGUSUKU, E.; LLANOS-CUENTAS, A.; GAMBOA, D.; ARÉVALO, J. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruvensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 102, n. 5, p. 655–658. 2007.

- PESSÔA, S. B. Contribuição ao estudo dos hemoparasitos dos Ophideos. I. Nota. Nova espécie de *Trypanosoma* parasita de *Philodryas nattereri*. **Revista Biol. Hyg.** n. 1, p. 51-62, 1928.
- PESSÔA, S. B. *Trypanosoma hogei* n. sp. parasita da falsa muçurana (*Rachidelus brazili* Boul.). **O Hospital**. v. 73, n. 4, p. 1257-60, 1968.
- PESSÔA, S. B.; FLEURY, G. C. Duas novas espécies de tripanosomas parasitas de serpentes do Brasil. **Rev. Bras. Biol.** v. 29, n. 1, p. 81-86, 1969.
- PESSÔA, S. B.; DE BIASI, P. *Trypanosoma cascavelli* sp. n. parasita da cascavel: *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). **Atas Soc. Biol.** v. 15, n. 2, p. 67-70, 1972.
- PESSÔA, S. B.; DE BIASI, P.; PUORTO, G. Nota sobre a frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. **Mem. Inst. Butantan**, v. 38, p. 69-118, 1974.
- PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.** v. 107, n. 1, p. 66-69. 2008.
- POLZIN, T.; DANESHMAND, S.V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Oper. Res. Lett.** v. 31, p. 12-20. 2003.
- POMIANOWSKA-PILIPUK, I. Energy balance and food requirements of adult vipers (*Vipera berus*). **Ekol. Polska**. v. 22, p. 195-211, 1974.
- PORNPAKOM, P.; SALAKIJ, C.; PRASOPSOM, P.; LERTWATCHARASARAKUL, P.; KASORNDORKBUA, C.; SANTAVAKUL, M. Morphological and molecular characterization of avian trypanosomes in raptors from Thailand. **Parasitol. Res.** v. 118, n. 8, p. 2419-2429. 2019.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 3. ed. Atheneu Editora, São Paulo, pp. 699, 2003.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: **Vienna, Austria**, 2021.
- RAILLIET, A. **Traité de zoologie médicale et agricole**, 2. ed. Paris. 1895.
- RAMÍREZ, J. D.; HERNANDEZ, C.; LEON, C. M.; AYALA, M. S.; FLOREZ, C.; GONZALEZ, C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: a retrospective study. **Sci. Rep.** v. 6. 2016.
- RAMÍREZ, J. D.; TAPIA-CALLE, G.; MUÑOZ-CRUZ, G.; POVEDA, C.; RENDÓN, L. M.; HINCAPIÉ, E.; ET AL. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. **Infect. Genet. Evol.** v. 22, p. 250-256. 2014.
- RANGEL, D. A.; LISBOA, C. V.; NOVAES, R. L. M.; SILVA, B. A.; SOUZA, R. F.; JANSEN, A. M.; MORATELLI, R.; ROQUE, A. L. R. Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellifica*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 13, n. 7. 2019.
- RAY, R. *Trypanosoma balithaensis* sp. n. from a pond water turtle, *Lissemys punctata punctata* Bonnaterre and its development in the leech vector *Helobdella nociva* Harding. **Acta Protozool.** v. 26, p. 63-67. 1987.
- REDROBE, S.; MACDONALD, J. Sample collection and clinical pathology of reptiles. **Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.** v. 2, n. 3, p. 709-30, 1999.
- RÊGO, S. F. M.; MAGALHÃES, A. E. A.; SIQUEIRA, A. F. Um novo tripanossomo do gambá. *Trypanosoma freitasi*, n. sp. **Rev. Bras. Malar.** v. 9, p. 277-284. 1957.

- RIBEIRO, L. M.; OSHIRO, E. T.; DE SOUZA, D. A.; FERNANDES, M. F.; DOS SANTOS, K. M.; MATEUS, N. L. F.; DE OLIVEIRA, A. G. Biological aspects of immature stage of *Nyssomyia whitmani* (Antunes and Coutinho) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in laboratory conditions. **Rev. Bras. Entomol.** v. 59, n. 2, p. 100–103. 2015.
- RIOUX, J. A.; ALBARET, J. L.; BRES, A.; DUMAS, A. Presence of *Trypanosoma pestanai* Bettencourt and Franca, 1905, in badgers from the south of France. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** v. 41, p. 281–288. 1966.
- RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; TEIXEIRA, M. M. G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**. v. 132, p. 215-224. 2006.
- RODRIGUES, M. S. Diversidade, especificidade e distribuição geográfica de *Trypanosoma* spp. em mamíferos. **Tese (Doutorado em Biologia Parasitária)** – Ministério Da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 104 pp. 2019b.
- RODRIGUES, M. S.; LIMA, L.; XAVIER, S. C. C.; HERRERA, H. M.; ROCHA, F. L.; ROQUE, A. L. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; JANSEN, A. M. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 8, p. 171–181. 2019a.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. v. 19, p. 1572–1574. 2003.
- ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.** v. 3, n. 3, p. 251-62. 2014.
- ROSE, K.; CURTIS, J.; BALDWIN, T.; MATHIS, A.; KUMAR, B.; SAKTHIANANDESWAREN, A.; ET AL. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. **Int. J. Parasitol.** v. 34, n. 6, p. 655–64. 2004.
- RUMORE, P.; MURALIDHAR, B.; LIN, M.; LAI, C.; STEINMAN, C. R. Haemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance. **Clin. Exp. Immunol.** v. 90, p. 56-62. 1992.
- RUNCKEL, C.; DERISI, J.; FLENNIKEN, M. L. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellifica*. **PLoS One**. v. 9, n. 4. 2014.
- SACKS, D. L.; KENNEY, R. T.; KREUTZER, R. D.; JAFFE, C. L.; GUPTA, A. K.; SHARMA, M. C.; SINHA, S. P.; NEVA, F. A.; SARAN, R. Indian kalaazar caused by *Leishmania tropica*. **Lancet**. 1995.
- SANTOS, F. M.; SANO, N. Y.; LIBERAL, S. C.; DARIO, M. A.; NANTES, W. A. G.; ALVES, F. M.; DA SILVA, A. R.; DE OLIVEIRA, C. E.; ROQUE, A. L. R.; HERRERA, H. M.; JANSEN, A. M. Kinetoplastid Species Maintained by a Small Mammal Community in the Pantanal Biome. **Pathogens** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 10. 2022a.
- SANTOS, F. M.; SANO, N. Y.; LIBERAL, S. C.; NANTES, W. A. G.; SANABRIA, I. P. M.; DOS SANTOS, G. S.; MARTINELLI, A. L. A.; DE OLIVEIRA, C. E.; ALMEIDA-GOMES, M.; JANSEN, A. M.; HERRERA, H. M. The influence of abiotic and biotic variables on the patent parasitemias of *Trypanosoma* spp. in *Thrichomys fosteri* (Rodentia: Echimyidae) in the southern Pantanal. **Parasitol. res.** v. 121, n. 6, p. 1719–1724. 2022b.

- SATO, H.; TAKANO, A.; KAWABATA, H. et al. *Trypanosoma* cf. *varani* in an imported ball Python (*Python regius*) from Ghana. **J. Parasitol.** v. 95, n. 4, p. 1029-33, 2009.
- SAVANI, E. S.; NUNES, V. L.; GALATI, E. A.; CASTILHO, T. M.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 160, n. 1-2, p. 18-24. 2009.
- SCANLON, J. D.; LEE, M. S. Y. **The major clades of living snakes.** In: ALDRIDGE, R. B.; SEVER, D. M. (org.). *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc. v. 9. p. 55-95. 2011.
- SCHNUR, L. F.; NASEREDDIN, A.; EISENBERGER, C. L.; JAFFE, C. L.; EL FARI, M.; AZMI, K.; ANDERS, G.; KILLICK-KENDRICK, M.; KILLICK-KENDRICK, R.; DEDET, J. P.; PRATLONG, F.; KANAAN, M.; GROSSMAN, T.; JACOBSON, R. L.; SCHONIAN, G.; WARBURG, A. Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a Judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 70. 2004.
- SCHOENER, T. W. Theory of feeding strategies. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 2, p. 369-404. 1971.
- SCHÖNIAN, G.; SCHNUR, L.; EL FARI, M.; OSKAM, L.; KOLESNIKOV, A. A.; SOKOLOWSKA-KÖHLER, W.; PRESBER, W. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 95. 2001.
- SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Mol Ecol.** v. 10, n. 9, p. 2319-2327. 2001.
- SEWARD, E. A.; VOTYPKA, J.; KMENT, P.; LUKES, J.; KELLY, S. Description of *Phytomonas oxyacareni* n. sp. from the Salivary Glands of *Oxycarenus lavaterae*. **Protist.** v. 168, p. 71-79. 2017.
- SGROI, G.; IATTA, R.; PAOLO LIA, R.; LATROFA, M. S.; SAMARELLI, R.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* in Eurasian badgers (*Meles meles*) and Ixodidae ticks, Italy. **Parasitology.** 2021.
- SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, 1, p. 117-143. 1995.
- SHAW, J. J.; DE ROSA, A. T.; CRUZ, A. C.; VASCONCELOS, F. V. **Brazilian phlebotomines as hosts and vectors of viruses, bacteria, fungi, protozoa (excluding those belonging to the genus Leishmania) and nematodes.** In: SHAW, J. J.; RANGEL, E. F. (org.). *Brazilian Sand Flies*. Springer International Publishing AG, Cham. pp 417-441. 2018.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil — A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 3, p. 239-251. 2004.
- SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** v. 22, p. 168-174. 2006.
- SINHA, C. K.; MANDAL, A. K. *Trypanosoma enhydris* sp. n. from a fresh snake *Enhydris enhydris* (Schneider). **Acta Protozool.** v. 15, n. 4, p. 393-398. 1976.
- SIQUEIRA, R. V. Distribuição geográfica e fonte alimentar de triatomíneos e o papel do cão como possível fonte de infecção do *Trypanosoma cruzi*. 2016. 113 f. **Tese**

- (Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal)** - Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2016.
- SMIT, N. J.; JOUBERT, A.; LAWTON, S. P.; HAYES, P. M.; COOK, C. A. Morphological and molecular characterization of an African freshwater fish trypanosome, including its development in a leech vector. **Int. J. Parasitol.** v. 50, n. 10-11, p. 921-929. 2020.
- 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**. v. 135, n. 11, p. 1329–1335, 2008.
- SOLANA, J. C.; CHICHARRO, C.; GARCÍA, E.; AGUADO, B.; MORENO, J.; REQUENA, J. M. Assembly of a Large Collection of Maxicircle Sequences and Their Usefulness for *Leishmania* Taxonomy and Strain Typing. **Genes**. v. 13, n. 6. 2022.
- SPISÁK, S.; SOLYOMOSI, N.; ITTZÉS, P.; BODOR, A.; KONDOR, D.; VATTAY, G.; BARTÁK, B. K.; SIPOS, F.; GALAMB, O.; TULASSAY, Z.; SZÁLLÁSI, Z.; RASMUSSEN, S.; SICHERITZ-PONTEN, T.; BRUNAK, S.; MOLNÁR, B.; CSABAI, I. Complete genes may pass from food to human blood. **PLoS One**. v. 8, n. 7. 2013.
- SOBHY, H. M.; BARGHASH, S. M.; BEHOUR, T. S.; RAZIN, E. A. Seasonal fluctuation of trypanosomiasis in camels in North-West Egypt and effect of age, sex, location, health status and vector abundance on the prevalence. **Beni-Suef Univ. J. Basic. Appl. Sci.** v. 6, p. 64–68. 2017.
- SPODAREVA, V. V.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; LOSEV, A.; VOTY'PKA, J.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V.; KOSTYGOV, A. Y. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. **Parasit. Vector**. v. 11, p. 447–447. 2018.
- SVOBODOVÁ, M.; ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; OBORNIK, M.; LUKES, J.; VOTRPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. Nov., sp. nov. (Trypanosomatida, Kinetoplastida), parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 57, p. 423–432. 2007.
- STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C. J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv. Parasitol** v. 48, p. 1-56. 2001.
- STEVENS, J. R.; GIBSON, W. The evolution of Salivarian Trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 2, p. 225-228. 1999.
- STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; DOVER, G. A.; GIBSON, W. C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**. v. 18, p. 107–116. 1999.
- STEVENS, J.; NOYES, H.; GIBSON, W. The evolution of Trypanosomes infecting humans and primates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 93, p. 669–676. 1998.
- STEVERDING, Dietmar. The History of Leishmaniasis. **Parasit. Vectors**. v. 10, n. 1, p. 82. 2017.
- TAKIISHI, T.; FENERO, C. I. M.; CÂMARA, N. O. S. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. **Tissue Barriers**. v. 5. 2017.
- TELFORD, S. R. JR. **Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text**. Boca Raton: CRC Press, 355 pp. 2009.
- TELFORD, S. R. JR. The **kinetoplastid hemoflagellates of reptiles**. In: KREIER J (org.). *Parasitic Protozoa*, v. 10, 2. ed., San Diego: Academic Press, 161-223 pp. 1995.

- THEKISOE, O. M.; HONDA, T.; FUJITA, H.; BATTSETSEG, B.; HATTA, T.; FUJISAKI, K.; SUGIMOTO, C.; INOUE, N. A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. **Parasitology**. v. 134, n. 7, p. 967-974. 2007.
- THIERRY, A. R.; MOULIERE, F.; GONGORA, C.; OLLIER, J.; ROBERT, B.; YCHOU, M.; DEL RIO, M.; MOLINA, F. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. **Nucleic Acids Res.** v. 38, n. 18, p. 6159-6175. 2010.
- THOISY, B.; MICHEL, J. C.; VOGEL, I.; VIE, J. C. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. **J. Parasitol.** v. 86, p. 1035-1040, 2000.
- THOMAS, F.; GUÉGAN, J. F.; MICHALAKIS, Y.; RENAUD, F. Parasites and host life-history traits: implications for community ecology and species co-existence. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 669-674, 2000.
- THOMAZ-SOCCOL, V.; GONÇALVES, A. L.; BAGGIO, R. A.; BISSETTO, A.; JR, CELESTINO, A.; HOSPINAL-SANTIANI, M.; DE SOUZA, A.; MYCHALIZEN, M.; BORGES, M. E.; PIECHNIK, C. A. One piece of the puzzle: Modeling vector presence and environment reveals seasonality, distribution, and prevalence of sandflies and *Leishmania* in an expansion area. **One health**. v. 17. 2023.
- TOLEZANO, J. E., ULIANA, S. R., TANIGUCHI, H. H., ARAÚJO, M. F., BARBOSA, J. A., BARBOSA, J. E., FLOETER-WINTER, L. M., & SHAW, J. J. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 149 n. 3-4, p. 280-284. 2007.
- TOMPKINS, D. M.; BEGON, M. Parasites can regulate wildlife populations. **Parasitol. Today**. v. 15, p. 311-313, 1999.
- TORRES, J. M. ET AL. Congresso Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical. 54. 2018, Olinda, Pernambuco. Infecção por *Trypanosoma terrestris* em capivaras (Rodentia: Caviidae, *Hydrochoerus hydrochaeris*) em fragmentos florestais no município de Campo Grande. **Anais 54º MedTrop**. 2018.
- TRUC, P.; BÜSCHER, P.; CUNY, G.; GONZATTI, M.I.; JANNIN, J.; JOSHI, P.; JUYAL, P.; LUN, Z. R.; MATTIOLI, R.; PAYS, E.; SIMARRO, P. P.; TEIXEIRA, M. M.; TOURATIER, L.; VINCENDEAU, P.; DESQUESNES, M. Atypical human infections by animal trypanosomes. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 7, n. 9. 2013.
- UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOŠEK, J. **The Reptile Database**. 2022. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>>. Acesso em agosto de 2023.
- UETZ, P.; FREED, P.; AGUILAR, R.; HOŠEK, J. **The Reptile Database**. 2021. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/diversity.html>>. Acesso em agosto de 2023.
- URDANETA-MORALES, S.; MCLURE I. Experimental infections in Venezuelan lizards by *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**. v. 38, p. 99-105. 1981.
- VALENTIM SILVA, J. R.; DE BARROS, N. B.; ARAGÃO MACEDO, S. R.; FERREIRA, A. D. S.; MOREIRA DILL, L. S.; ZANCHI, F. B.; DO NASCIMENTO, J. R.; FERNANDES DO NASCIMENTO, F. R.; LOURENZONI, M. R.; DE AZEVEDO CALDERON, L.; SOARES, A. M.; NICOLETE, R. A natural cell-penetrating nanopeptide combined with pentavalent antimonial as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.** v. 217. 2020.
- VANDERSEA, M. W.; BIRKENHEUER, A. J.; LITAKER, R. W.; VADEN, S. L.; RENSCHLER, J. S.; GOOKIN, J. L. Identification of *Parabodo caudatus* (class

- Kinetoplastea) in urine voided from a dog with hematuria. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 27, p. 117–20. 2015.
- VÁSQUEZ, A.; PAZ, H.; ALVAR, J.; PÉREZ, D.; HERNÁNDEZ, C. Informe Final: Estudios Sobre La Epidemiología de La Leishmaniasis En La Parte Occidental de La República de Panamá. **Panamá**. 1998.
- VIANA, L. A.; WINCK, G. R.; COELHO, C. D.; FLAUSINO, W.; DUARTE ROCHA, C. F. A new species of *Caryospora* Léger, 1904 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the snake *Philodryas olfersii* Lichtenstein (Colubridae) from a coastal habitat in Brazil. **Syst. Parasitol.** v. 85, n. 2, p. 195-199, 2013.
- VICKMAN, K. The **Diversity of the kinetoplastid flagellates**. In: *Biology of the Kinetoplastida*. LUMSDEN, W. H. R., EVANS, D. A. (org.). Academic Press: London, UK; New York, NY, USA; San Francisco, CA, USA, p. 1–34. 1976.
- VIOLA, L. B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C. S. A. et al. 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**, v. 135, p. 595-605, 2008.
- VIOLA, L. B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C. S. A. et al. 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*. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 56, n. 6, p. 594-602, 2009.
- VOTYPKA, J.; SZABOVÁ, J.; RÁDROVÁ, J.; ZÍDKOVÁ, L.; SVOBODOVÁ, M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 62, n. 3, p. 745-754. 2012.
- XING, R.; LIU, H.; QI, X.; PAN, L. Measuring the process and rate of exogenous DNA degradation during digestion in mice. **Sci. Rep.** v. 12, n. 1. 2022.
- ZHANG, D.; GAO, F.; JAKOVLÍČ, I.; ZOU, H.; ZHANG, J.; LI, W.X.; WANG, G. T. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. **Mol. Ecol. Resour.** v. 20, p. 348–355. 2020.
- ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; SZABOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, M. Biodiversity of avian trypanosomes. **Infect. Genet. Evol.** v. 12, p. 102–112. 2012.
- WEINMAN, D. *Trypanosoma cyclops* n. sp.: a pigmented trypanosome from the Malaysian primates *Macaca nemestrina* and *M. ira*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 66, n. 4, p. 628-636. 1972.
- WENYON, C. M. A trypanosome and a haemogregarine of a tropical American snake. **Parasitology**, v. 1, n. 4, p. 314-7, 1908.
- WENYON, C. M. **Report of traveling pathologist and protozoologist**. Third Report, Report of the Wellcome Research Laboratories. London: Baillière. p. 141, 1909.
- WHO. **Leishmaniasis**. 2022. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> >. Acesso em Outubro de 2023.
- WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **WHO. Tech. Rep. Ser.** v. 975, n. 5, p. 11–9. 2012.
- YAZAKI, E.; ISHIKAWA, S.A.; KUME, K.; KUMAGAI, A.; KAMAISHI, T.; TANIFUJI, G.; HASHIMOTO, T.; INAGAKI, Y. Global Kinetoplastea phylogeny inferred from a large-scale multigene alignment including parasitic species for better understanding transitions from a free-living to a parasitic lifestyle. **Genes Genet. Syst.** v. 92, p. 35–42. 2017.