

BRUNO DA SILVA MATHIAS

**Investigação molecular de parasitas hemosporídeos
(Apicomplexa: Haemosporida) em quirópteros silvestres brasileiros**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Prof^a Dr^a Karin Kirchgatter

**São Paulo
2022**

BRUNO DA SILVA MATHIAS

**Investigação molecular de parasitas hemosporídeos
(Apicomplexa: Haemosporida) em quirópteros silvestres brasileiros**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Prof^a Dr^a Karin Kirchgatter

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mathias, Bruno da Silva
Investigação molecular de parasitas hemosporídeos
(Apicomplexa: Haemosporida) em quirópteros
silvestres brasileiros / Bruno da Silva Mathias. --
São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Karin Kirchgatter.

Descritores: 1.Polychromophilus 2.Haemoproteus
3.Quirópteros 4.Filogenia 5.Brasil

USP/FM/DBD-081/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha mãe Elaine dedico este trabalho, que me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos e correr atrás para que eu pudesse realizá-los.
À minha esposa Carolina Anjos por estar ao meu lado em todas as situações lapidar cada passo em busca do que desejamos.

Ao Bruce e Wynna, luzes e memórias que me iluminam.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de pessoas essenciais tanto para apoio do projeto como para o apoio psicológico e emocional do autor kkkk.

De início agradeço primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Karin Kirchgatter pela paciência, conselhos, ensinamentos valiosos, por acreditar em minha capacidade, mesmo havendo momentos que eu mesmo duvidei, ou que fiquei decepcionado por algum resultado não obtido. Muito obrigado por me fazer enxergar as possibilidades do meu trabalho, por me apresentar esse mundo acadêmico voltado a Biologia Molecular, logo eu o “cara do manejo” que nunca imaginou trabalhar com organismos “invisíveis” e descobrir neles relações tão consolidadas com a fauna silvestre.

Agradeço à minha família e amigos:

- ❖ Agradeço à minha mãe Elaine Pereira por me conceber. Sabemos bem o quão difícil isso foi, devido a várias circunstâncias da vida, mas hoje estou aqui e cada degrau alcançado e vitória eu dedico a você, por todo o incentivo e acreditar que seria possível. Obrigado por existir, pelo amor incondicional e por todo apoio em todos os momentos. Te Amo!
- ❖ A minha esposa e colega de laboratório Ms. Carolina Anjos, por incentivar e trilhar comigo o caminho da Ciência, pela parceria, pela paciência, pelo amor e carinho. Quem diria que além de casados teríamos até artigos juntos? Obrigado por tudo, sempre!
- ❖ À minha sogra Nilda Clares pelo apoio e carinho sempre, e principalmente por acreditar.
- ❖ Agradeço também aos amigos Dayana, Stive, Ariane, Artur, Adriano, Thaís e Wellington pela amizade de tantos anos, pelas palavras de incentivo e por ouvir meus gritos de desespero, por acreditarem que esse caminho daria certo, mesmo quando eu duvidei. Pelas conversas jogadas fora, “dias de gordices”. Por estarem presentes mesmo quando não pessoalmente nos momentos mais difíceis que passei, com palavras de carinho e positividade. Vocês são maravilhosos e essenciais!

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório:

- ❖ À Dra Lilian de Oliveira Guimarães pelo carinho, pela paciência, pela amizade pelos puxões de orelha, pelo auxílio em toda minha trajetória laboratorial até agora, por me apresentar esse mundo incrível da Biologia Molecular e por me preparar para ele. Agradeço a confiança e por acreditar na minha capacidade. Hoje sei o que sei, e você foi essencial nisso. Obrigado!
- ❖ À Dra Eliana Ferreira Monteiro pelos valiosos ensinamentos de Biomol, pelo carinho e amizade, pelos ensinamentos “progressivos” e vários jeitos possíveis de solucionar um problema. Por me acolher no laboratório e me ensinar muito, mesmo eu me achando muitas vezes incapaz de aprender esse mundo complicado da Biologia Molecular. “Vou pegar um papel e desenhar, acho que fica mais fácil” Obrigado Eli!
- ❖ À Ms. Roseli de França Simões por compartilhar experiências e conhecimento, pela amizade e por ouvir minha lamúrias kkkkk;
- ❖ À Vet. Gabriella Ricomini e ao Biol. Vinicio Rodrigues pela ajuda com os experimentos, pelos géis bonitos rsrs, e pela valiosa amizade e agregarem o grupo dos “Estagiários”;
- ❖ Agradeço à Dra Roseli Tuan, ao Drº Adriano Pinter, à Dra. Regiane M. T. de Menezes e à Ms. Iole Arume Sei por nos receber nos laboratórios do DELABE Sucen e pelos ensinamentos compartilhados;
- ❖ À Dra. Carolina Chagas pela amizade e pelo incentivo, torcendo sempre pelo nosso grupo de estudo e sempre ajudando quando possível;

Agradeço aos Colaboradores pela coleta e envio das amostras:

- ❖ Dr. Alan Fecchio, da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT
- ❖ Dr. João Pinho da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT (amostras de Poconé – MT)
- ❖ Dr. Guilherme Minozzo da Universidade Federal do Paraná, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, seção de Zoonoses do LACEN/PR (Laboratório Central do Estado do Paraná);

- ❖ Dr. Alexander Biondo, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. (Amostras do Paraná);
- ❖ Dra. Marina Bueno, da Fundação Oswaldo Cruz, RJ;
- ❖ Dr. Ricardo Moratelli, da Fundação Oswaldo Cruz, RJ. (Amostras do Rio de Janeiro).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através do processo no. 88887.463661/2019-00.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

“Não tente.
Faça ou não faça.
Não existe tentativa”

Mestre Yoda

RESUMO

MATHIAS BS. *Investigação molecular de parasitas hemosporídeos (Apicomplexa: Haemosporida) em quirópteros silvestres brasileiros* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Os parasitas sanguíneos da ordem Haemosporida, como o *Plasmodium* spp., responsáveis pela malária, tornaram-se foco de muitos estudos em biologia evolutiva. No entanto, há carência de estudos moleculares de parasitas hemosporídeos de animais selvagens, como por exemplo, do gênero *Polychromophilus*. Espécies desse gênero negligenciado foram descritas exclusivamente em morcegos, principalmente na Europa, Ásia e África, mas pouco se sabe sobre sua presença e diversidade genética no continente americano. Neste estudo, 531 amostras de morcegos de fragmentos remanescentes dos biomas de Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal, além de áreas urbanizadas do sul e sudeste do Brasil, foram analisadas quanto à presença de *Polychromophilus* através de PCR do gene mitocondrial que codifica o citocromo b (*cytb*). Um total de 1,1% dos morcegos foi positivo para *Polychromophilus*, fornecendo as primeiras informações moleculares desses parasitas em *Myotis riparius* e *Eptesicus diminutus*, morcegos vespertilionídeos comuns amplamente distribuídos em diferentes biomas brasileiros, e *Myotis ruber*, uma espécie ameaçada de extinção. Uma análise Bayesiana foi realizada para reconstruir as relações filogenéticas entre *Polychromophilus* recuperados de morcegos brasileiros e aqueles identificados em outros países. Sequências de linhagens brasileiras de *Polychromophilus* foram colocadas com sequências de *P. murinus* e próximas à sequência obtida no Panamá. Esse clado é restrito principalmente a morcegos da família Vespertilionidae e distinto de *P. melanipherus*, espécie encontrada principalmente em morcegos da família Miniopteridae. Interessantemente, as sequências brasileiras foram divididas em dois clados menores, de acordo com o gênero dos hospedeiros, indicando que linhagens ou mesmo espécies distintas de *P. murinus* podem estar circulando no Brasil. A detecção de *Polychromophilus*, assim como a proximidade genética com *P. murinus*, foram ainda confirmadas com a amplificação do gene *clpc* (*caseinolytic protease C*), presente no genoma do apicoplasto do parasita. Outro importante e inédito resultado obtido neste estudo foi o encontro inesperado de uma sequência de *Haemoproteus* sp., de linhagem nunca antes descrita, em amostra de *Noctilio albiventris* coletado no pantanal matogrossense. Esse gênero de hemosporídeo é próprio de aves e, embora na árvore filogenética a sequência de *Haemoproteidae* sp. de *N. albiventris* tenha sido agrupada dentro de *Haemoproteidae*, não foi suportada em clado monofilético. Observações morfológicas combinadas com estudos moleculares adicionais são ainda necessárias para concluir e descrever essas espécies de *Polychromophilus* e *Haemoproteidae* encontradas em morcegos brasileiros, mas esses resultados confirmam a importância do estudo desses gêneros negligenciados no Brasil.

Descritores: *Polychromophilus*; *Haemoproteus*; Quirópteros; Filogenia; Brasil.

ABSTRACT

Mathias BS. *Molecular investigation of hemosporidian parasites (Apicomplexa: Haemosporida) in wild Brazilian bats [dissertation]*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Blood parasites of the order Haemosporida, such as *Plasmodium* spp., responsible for malaria, have become the focus of many studies in evolutionary biology. However, there is a lack of molecular studies of haemosporidian parasites from wild animals, such as the genus *Polychromophilus*. Species of this neglected genus have been described exclusively in bats, mainly in Europe, Asia and Africa, but little is known about their presence and genetic diversity in the American continent. In this study, 531 samples of bats from remaining fragments of the Atlantic Forest, Cerrado and Pantanal biomes, as well as urbanized areas in southern and southeastern Brazil, were analyzed for the presence of haemosporidian by PCR of the mitochondrial gene that encodes cytochrome b (*cytb*). A total of 1.1% of bats were positive for *Polychromophilus*, providing the first molecular information on these parasites in *Myotis riparius* and *Eptesicus diminutus*, common vespertilionid bats widely distributed in different Brazilian biomes, and *Myotis ruber*, an endangered species. A Bayesian analysis was performed to reconstruct the phylogenetic relationships between *Polychromophilus* recovered from Brazilian bats and those identified in other countries. Sequences from Brazilian lineages of *Polychromophilus* were placed with sequences from *P. murinus* and close to the sequence obtained in Panama. This clade is restricted mainly to bats of the Vespertilionidae family and distinct from *P. melanipherus*, a species found mainly in bats of the Miniopteridae family. Interestingly, the Brazilian sequences were divided into two smaller clades, according to the host genus, indicating that lineages or even distinct species of *P. murinus* may be circulating in Brazil. The detection of *Polychromophilus*, as well as the genetic proximity to *P. murinus*, were further confirmed with the amplification of the *clpc* gene (caseinolytic protease C), present in the genome of the parasite's apicoplast. Another important and unprecedented result obtained in this study was the unexpected finding of a sequence of Haemoproteus sp., of a lineage never described before, in a sample of *Noctilio albiventris* collected in the Pantanal of Mato Grosso. This genus of haemosporidian is typical of birds and, although in the phylogenetic tree the sequence of Haemoproteus sp. de *N. albiventris* was grouped within Haemoproteidae, it was not supported in a monophyletic clade. Morphological observations combined with additional molecular studies are still needed to conclude and describe these *Polychromophilus* and Haemoproteidae species found in Brazilian bats, but these results confirm the importance of studying these neglected genera in Brazil.

Descriptors: *Polychromophilus*; Haemoproteus; Chiroptera; Phylogeny; Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Taxonomia das famílias de hemosporídeos pertencentes à Ordem Haemosporida e respectivos hospedeiros.....	23
Figura 2. Ciclo de vida dos hemosporídeos que infectam quirópteros.....	28
Figura 3. Vetores de hemosporídeos em morcegos.....	30
Figura 4. Parasitas hemosporídeos e suas espécies hospedeiras.....	31
Figura 5. Mapa dos pontos de coleta de amostras deste estudo.	40
Figura 6. Representação esquemática dos fragmentos amplificados para o gene <i>cytb</i> utilizando diferentes pares de primers	46
Figura 7. Distribuição das amostras positivas de <i>Polychromophilus</i> sp. obtidas no estado do Paraná, Brasil.	49
Figura 8. Ponto de coleta de amostra positiva para Haemoproteidae sp. proveniente do estado do Mato Grosso, Brasil.....	50
Figura 9. Filogenia Bayesiana baseada no gene mitocondrial citocromo b (<i>cytb</i>) das sequências de <i>Polychromophilus</i> spp. e Haemoproteidae sp. detectadas no presente estudo.	52
Figura 10. Análise filogenética baseada no gene <i>clpC</i> do apicoplasto para o genero <i>Polychromophilus</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre descrição morfológica e molecular de hemosporídeos em morcegos.	33
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR de acordo com os genes alvo.	44
Tabela 3. Polimorfismo de nucleotídeos em sequências do gene mitocondrial do citocromo b (<i>cytb</i>) de <i>Polychromophilus</i> sp. (116, 198, 335, 607, 650 e 69642) obtidas em morcegos do Brasil e Panamá (MYOPA01).	51
Tabela 4. Porcentagem de similaridade entre as sequências do gene mitocondrial do citocromo b (<i>cytb</i>) de <i>Polychromophilus</i> sp. encontrado em diferentes morcegos do Brasil e Panamá (MYOPA01).	51
Tabela 5. Ocorrência de <i>Polychromophilus</i> detectada neste estudo e em estudos anteriores ao redor do mundo.	60

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Ordem Chiroptera.....	15
1.1.1	Diversidade de morcegos	15
1.1.2	Caracterização da subordem Yangochiroptera	16
1.1.3	Importância ecológica e alimentação	17
1.1.4	Uso do habitat.....	19
1.2	Filo Apicomplexa	21
1.2.1	Ordem Haemosporida.....	22
1.2.1.1	Ciclos de vida dos gêneros de hemosporídeos <i>Plasmodium</i> , <i>Haemoproteus</i> e <i>Leucocytozoon</i> em comparação aos gêneros exclusivos que parasitam quirópteros <i>Polychromophilus</i> , <i>Hepaticystis</i> e <i>Nycteria</i>	25
1.2.1.2	Transmissão e Sinais Clínicos.....	28
1.2.1.3	Diagnóstico morfológico para identificação de hemosporídeos em morcegos 30	
1.2.1.4	Envolvimento de morcegos com hemosporídeos e o uso de ferramentas moleculares para identificação	36
2.	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3.	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Amostras deste estudo.....	40
3.1.1	Amostras do Estado do Paraná	40
3.1.2	Amostras dos Estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro	41
3.2	Diagnóstico por microscopia ótica	42
3.3	Extração de DNA.....	42
3.4	PCR para amplificação de genes do parasita	43
3.5	Sequenciamento e análise das sequências.....	45

3.6	PCR para amplificação do gene <i>cytb</i> do hospedeiro.	47
3.7	Aspectos éticos	48
4.	RESULTADOS	48
4.1	Primeira detecção molecular de <i>Polychromophilus</i> e Haemoproteidae em espécies de morcegos brasileiros.....	48
4.2	Multigenes para detecção de hemosporídeos em morcegos	58
4.3	Análise microscópica para detecção de hemosporídeos em quirópteros..	58
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	Apêndice A. Sequências do gene mitocondrial Citocromo b (<i>cytb</i>) utilizadas como referências nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso no GenBank®	80
	Apêndice B. Sequências do gene do apicoplasto protease caseinolítica c (<i>clpc</i>) utilizadas como referências nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso no GenBank® b	82
	Apêndice C. Sequências dos genes Citocromo b (<i>cytb</i>) e protease caseinolítica c (<i>clpc</i>) encontradas neste estudo e respectivos números de acesso no GenBank®.....	83
	Apêndice D. Artigo publicado na revista <i>Microorganisms</i> sob o título “First molecular detection of <i>Polychromophilus</i> parasites in brazilian bat species”. MINOZZO et al., 2021.	84
	Anexo A. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA-SUCEN no.0009)	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ordem Chiroptera

1.1.1 Diversidade de morcegos

A ordem Chiroptera é composta por mamíferos comumente chamados de morcegos divididos taxonomicamente em 18 famílias, 202 gêneros e pelo menos 1200 espécies, correspondendo a aproximadamente $\frac{1}{4}$ das espécies de mamíferos no mundo (SIMMONS, 2005). O uso clássico para a classificação taxonômica desses indivíduos é através de características morfológicas e comportamentais, sendo assim divididos nas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera (PERACCHI *et al.*, 2006; REIS, 2007), no entanto trabalhos recentes classificam e reafirmam filogeneticamente que através de características morfológicas da dentição (dentes pré-maxilares) e análise molecular de 17 genes nucleares, os morcegos são divididos em duas subordens: Yangochiroptera e Yngpterochiroptera (KOOPMAN, 1984; SPRINGER *et al.*, 2001; TEELING *et al.*, 2005; SPRINGER, 2013; REIS *et al.*, 2017). A subordem **Yngpterochiroptera** cujos exemplares não ocorrem no Brasil, são representados pela família Pteropodidae (Megamorcegos ou raposas-voadoras) e pela superfamília Rhinolophoidae, distribuídos nos continentes europeu, africano, asiático e na Oceania na Austrália (FENTON, 1992; SPRINGER *et al.*, 2001; SIMMONS, 2005).

A subordem **Yangochiroptera** anteriormente associada a morcegos da subordem Microchiroptera, agrupava 17 famílias e 930 espécies e de acordo com a atualização filogenética, atualmente formam um grupo composto por 14 famílias distribuídas mundialmente (EICK; JACOBS; MATTHEE, 2005; SIMMONS, 2005; HUTCHEON; KIRSCH, 2006), com exceção apenas das regiões polares.

No Brasil ocorrem nove famílias, 68 gêneros e 181 espécies, ocupando o segundo lugar de ordem com a maior riqueza de espécies no país, sendo superada somente pela ordem Rodentia, com 235 espécies. As famílias brasileiras, com seus respectivos números de espécies: Emballonuridae (17); Phyllostomidae (93); Mormoopidae (4); Noctilionidae (2); Furipteridae (1); Thyropteridae (5); Natalidae (1); Molossidae (32) e Vespertilionidae (26) (PERACCHI *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2014). Eles habitam todo o território nacional e distribuem-se nos mais diversos biomas e áreas urbanas, ocorrendo na Amazônia, no Cerrado, na Caatinga, na Mata

Atlântica, no Pantanal, e nos Pampas (PERACCHI *et al.*, 2006; PAGLIA *et al.*, 2012; DIAS; ESBÉRARD; MORATELLI, 2013; REIS *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2017).

1.1.2 Caracterização da subordem Yangochiroptera

Os morcegos da subordem Yangochiroptera normalmente apresentam um tamanho médio, porém podem existir pequenas espécies como *Furipterus horrens* com peso médio de 3 gramas e 15 cm de envergadura (NOWAK; WALKER, 1994). Outras espécies podem ser relativamente maiores, como *Vampyrum spectrum*, que chega a pesar 190 g, 15 cm de corpo e 70 cm de envergadura (EMMONS; FEER, 1990).

Em geral, quirópteros apresentam alta longevidade quando comparados com mamíferos de mesmo porte, como por exemplo, enquanto um roedor vive aproximadamente 2 anos, um morcego hematófago de mesmo peso pode chegar até 20 anos (REIS, 2007). São animais noturnos, com poucos cones na retina (estruturas relacionadas com a percepção de cores). Apesar disso, não são cegos, e todas as famílias brasileiras usam a ecolocalização para se orientar, enquanto algumas espécies frugívoras maiores podem se localizar pela visão. Devido a utilização do sistema de ecolocalização, estes animais adquiriram características cada vez mais específicas como, olhos pequenos, orelhas grandes, o *tragus* bem desenvolvido e ornamentações nasais e faciais muitas vezes presentes (REIS, 2007). Através deste sistema, são transmitidos sons de alta frequência pela boca ou pelo nariz do morcego, que são refletidos por superfícies do ambiente, apontando a direção correta e a distância relativa dos objetos. Além disso, os morcegos utilizam o som para outras finalidades como comunicação e alertas, acasalamento e disputas com outros animais quando ameaçados (FENTON, 1992; REIS *et al.*, 2017).

Os morcegos são considerados o único grupo de mamíferos capaz de realizar voo verdadeiro devido a uma variedade de processos evolutivos. São esses: ossos longos e finos, tubulares e leves, além de membranas finas e elásticas que se desenvolveram entre seus dedos, e alongam-se até a parte distal das duas pernas, dando assim a capacidade de manobras, tornando-os excelentes voadores (REIS, 2007). Possuem uma dentição variada de acordo com sua alimentação, onde, espécies insetívoras e frugívoras possuem dentes com cúspides mais agudas nos

molares, sendo achatados para mastigação de frutos e pontiagudos para trituração da quitina presente no exoesqueleto dos insetos, além dos caninos grandes e incisivos simples, sendo esta característica muito bem desenvolvida em espécies hematófagas que possuem incisivos cortantes para alimentação de suas presas (REIS, 2007).

Quanto à reprodução, podem ter de um a três filhotes por ano e raramente quatro. A gestação dos morcegos dura em média de 44 dias a 11 meses, dependendo da espécie, e os filhotes nascem geralmente em períodos onde há maior oferta de alimento. Os quirópteros realizam cuidado parental por volta de três meses após o nascimento, e enquanto espécies insetívoras resguardam seus filhotes em locais de repouso, espécies frugívoras carregam consigo o filhote durante o voo enquanto o peso do mesmo for suportável (REIS, 2007, 1981).

Por serem animais de hábitos noturnos, e seu período de maior atividade geralmente é mais intenso nas duas primeiras horas ao escurecer e nas duas horas antes do amanhecer. Quando o clima está frio os morcegos podem hibernar ou migrar, havendo registros de deslocamento de 1.700 km (ALTRINGHAM, 2001; REIS, 2007). No Brasil, apesar de realizarem atividades intensas de deslocamento, não há casos de hibernação ou migração a longas distâncias, no entanto, quando descansam durante o dia, muitas espécies entram em estado de semi-torpor e reduzem a temperatura do próprio corpo (REIS *et al.*, 2013).

1.1.3 Importância ecológica e alimentação

A fauna brasileira é uma das mais ricas entre os países tropicais, seja de anfíbios, répteis, aves ou mamíferos, além dos peixes de água doce. A maior parte da riqueza de mamíferos em nosso país é formada por animais de pequeno porte, como roedores silvestres, marsupiais e também morcegos (REIS *et al.*, 2017).

Os quirópteros brasileiros são numerosos tanto em quantidade de indivíduos como em variedade de espécies, representam cerca de 25% dos mamíferos do país e ocupam os mais variados nichos ecológicos, apresentando a maior variação morfológica dentre os mamíferos, com modificações para praticamente todos os hábitos alimentares, sendo assim são sensíveis a mudanças do ambiente, conseqüentemente são considerados bioindicadores de um ecossistema, principalmente em regiões tropicais (FENTON, 1992; PERACCHI *et al.*, 2006; PERACCHI; NOGUEIRA; LIMA, 2011; PAGLIA *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2017).

Espécies de morcegos frugívoros geralmente retiram os frutos de uma planta e pousam em outro local para consumi-los, onde muitas vezes em meio a este processo a queda do fruto ou o descarte das sementes durante a alimentação ou defecação após sua ingestão. Sendo assim, contribuem na dispersão de muitas plantas, que por ventura os frutos não teriam a capacidade de serem dispersos pelo vento ou pela água (REIS, 2007; PERACCHI; NOGUEIRA; LIMA, 2011; REIS *et al.*, 2017). A família que se destaca nesse quesito é a Phyllostomidae, e já foi considerada responsável pela regeneração de florestas neotropicais, devido ao seu hábito de forrageio, sua mobilidade e distâncias percorridas em busca de alimento (GALINDO-GONZÁLEZ, 1998; BREDT; UIEDA; MAGALHÃES, 1999). Existem morcegos predominantemente frugívoros, mas que também podem incluir insetos em sua dieta (REIS, 2007).

Os morcegos insetívoros geralmente consomem insetos que normalmente não são predados por aves, devido a poucas aves se alimentarem durante a noite, como os da família Vespertilionidae, adquirem a maioria dos insetos para sua alimentação em voo. Os da família Emballonuridae e os Vespertilionidae capturam esses insetos voando no nível abaixo das copas das árvores, enquanto os da família Molossidae voam acima das copas. Algumas espécies pequenas, com peso de 4 a 7 gramas, podem consumir mosquitos, chegando a ingerir seu próprio peso em uma única noite, o que representa retirada de centenas de insetos do ambiente por noite. Sendo assim, são importantes ecologicamente no controle populacional de algumas espécies de insetos (REIS, 2007).

Os onívoros possuem adaptações para uma variedade de hábitos alimentares. Podem se alimentar de: insetos, pólen, néctar e frutas e, oportunamente, de pequenos invertebrados. Enquanto os piscívoros adquiriram adaptações evolutivas para pesca, como pés robustos e fortes em formato de garra e utilização ecolocalização para localizar seu alimento na água. Os polívoros e nectarívoros são representados por morcegos da família Phyllostomidae (que possuem dentes pequenos) e retiram carboidratos do néctar e proteínas do pólen flores, mas eventualmente podem considerar insetos como opção de alimento. Também possuem adaptações como focinho alongado e língua comprida, além de pelos faciais e corporais especializados no transporte do pólen. Estes morcegos realizam a polinização de muitas espécies vegetais, sendo essenciais para a manutenção de vários ecossistemas (REIS, 2007; REIS *et al.*, 2017).

Por fim, existem os morcegos carnívoros que predam pequenos vertebrados, como: pássaros, anfíbios, répteis e até pequenos mamíferos, podem se alimentar também de grandes insetos e alguns morcegos eventualmente se alimentam de outros morcegos, embora não seja um ato de canibalismo, pois predam espécies diferentes da sua. Estes morcegos são classificados como os maiores morcegos brasileiros em questão de tamanho, dentre os microquirópteros (FENTON, 1992; REIS, 2007). Em contrapartida, quirópteros hematófagos alimentam-se exclusivamente de sangue: de mamíferos e/ou aves e, para isso, realizam um pequeno corte nos animais e sua saliva tem um efeito anticoagulante, que facilita para que o morcego sorva o sangue que flui para fora do corte. Quando saciados, retiram a parte líquida do sangue com o auxílio de seus rins especializados e a excretam através da urina, eliminando assim o excesso de peso, retornando ao seu abrigo. Existem apenas três gêneros e três espécies de morcegos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* e todos ocorrem na região neotropical (REIS, 2007; REIS *et al.*, 2013).

1.1.4 Uso do habitat

Os quirópteros estão distribuídos em uma ampla diversidade de habitats, e utilizam estes locais para abrigo e/ou repouso. Quando abrigados, passam grande parte do tempo nesse ambiente, em algumas espécies, cerca de 20 horas do dia. São utilizados como abrigos: cavernas, tocas de pedras, ocos de árvores (geralmente árvores com troncos de coloração similar ao do indivíduo), ou no meio das folhas (principalmente de palmeiras), árvores caídas, raízes na beira de rios e cupinzeiros. A escolha do abrigo pode ser crucial na sobrevivência dos morcegos, podendo influenciar diretamente na distribuição das espécies e na densidade das populações. Indiretamente, podem impactar na formulação de estratégias para forrageamento, acasalamento, estrutura social, deslocamentos, além da morfologia e fisiologia das espécies (REIS, 1981, 2007; REIS; PERACCHI; SANTOS, 2008; FAO, 2011).

Ambientes cavernícolas são utilizados por variados grupos de animais, devido a capacidade de proporcionar abrigos seguros para reprodução, proteção contra variações climáticas, como também para o repouso. Dentre os vertebrados, os morcegos se especializaram de maneira eficiente a esses ambientes (REIS; PERACCHI; SANTOS, 2008). Sabe-se que esta adaptação é um fenômeno antigo e

de acordo com a bibliografia, os primeiros quirópteros a habitarem cavernas tinham como intuito a proteção contra possíveis predadores e para a conservação de umidade e energia durante períodos de atividades intensas (ALTRINGHAM, 2001; GUNNELL; SIMMONS, 2005; REIS, 2007). Devido ao ambiente cavernícola proporcionar um local de abrigo permanente e muitas vezes estável, muitas espécies de morcegos podem formar colônias e/ou coabitar com outras espécies. Em contrapartida existem cavernas que abrigam grupos muito pequenos ou somente de alguns indivíduos (ALTRINGHAM, 2001; REIS, 2007). O número de indivíduos pertencentes à uma colônia depende mais das características biológicas da espécie do que das características dos ambientes cavernícolas, como o tamanho da cavernas (BREDT; UIEDA; MAGALHÃES, 1999).

Cada caverna tem a capacidade de oferecer diversos microclimas e uma variedade de formações como: fendas, concavidades, escavações dentre outras, o que permite a colonização por diversas espécies de animais, com características e necessidades diferentes (ALTRINGHAM, 2001). Em decorrência da diversidade de morcegos o uso comum e simultâneo de um abrigo (coabitação) é esperado, levando em consideração o número limitado de abrigos e as múltiplas espécies de morcegos que possam coabitar a mesma caverna (TRAJANO, 1984). Este relacionamento interespecífico ocorre frequentemente entre os quirópteros, e a maioria das associações pode ser casual, ou resultante do número limitado de abrigos acessíveis ou compatibilidade do nicho (REIS, 2007).

Além de ambientes naturais, os morcegos podem ser encontrados em ambientes urbanos, em decorrência disso são classificados também como animais sinantrópicos, ou seja, são animais que se adaptaram ao ambiente e obtiveram recursos para sua sobrevivência como abrigo e alimento. No Brasil já foram encontradas 54 espécies de morcegos distribuídos entre as famílias Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae, Emballonuridae e Noctilionidae (PACHECO *et al.*, 2010). São conhecidos como abrigos desses animais em ambiente urbano: pontes, forros de prédios e de casas de alvenaria, tubulação fluvial, pedra abandonada, junta de dilatação de prédios, toldo de construções, interior de churrasqueiras em quintais e até em aparelhos de ar condicionado (REIS; PERACCHI; LIMA, 2002).

Esta diversidade no uso do habitat, aliada a ampla distribuição geográfica e a características como capacidade de voo e dispersão a longa distância, formação de colônias, hibernação, comportamentos sociais e adaptação a ambientes antrópicos,

torna possível o envolvimento de algumas espécies de morcegos como reservatórios naturais de parasitas, por facilitar a manutenção e dispersão desses organismos (FAO, 2011). Os morcegos são conhecidos por serem reservatórios de vírus (Coronavírus, *Ebolavirus*, *Hantavírus* e *Lyssavirus* - Raiva), fungos (*Histoplasma capsulatum* - Histoplasmose), bactérias (*Rickettsia rickettsii* - Febre maculosa, *Leptospira* - Leptospirose) e protozoários (Tripanossomatídeos, *Plasmodium* e hemosporídeos relacionados) (FAO, 2011; CORRÊA et al., 2013; SCHAER et al., 2013).

1.2 Filo Apicomplexa

O reino Protista agrupa organismos bem diversificados que são encontrados em quase todos os ecossistemas terrestres e aquáticos no mundo. Mais de 200.000 espécies diferentes já descritas podem ser classificadas como protozoários. A maioria destes organismos é de vida livre. No entanto, cerca de 10.000 espécies possuem hábitos de vida parasitária (COX, 2002). Tradicionalmente a maioria dos protozoários parasitas foi colocada taxonomicamente na classe Sporozoa. Recentemente, após estudos filogenéticos, é proposto que os parasitas esporozoários não são filogeneticamente relacionados. Sendo assim, o termo esporozoário é atribuído a organismos que apresentam as seguintes características: organismos eucariontes unicelulares heterotróficos, com capacidade esporulante e apresentam estilo de vida parasitário (ALTERS; ALTERS, 2006).

Atualmente os esporozoários estão agrupados no filo Apicomplexa, e inclui cerca de 6.000 espécies descritas. No entanto, isso pode representar apenas uma pequena parcela do número de espécies já relatados neste grupo (MERCIER *et al.*, 2005; ADL *et al.*, 2007). O filo Apicomplexa forma um dos mais diversos grupos de protistas unicelulares com uma ampla distribuição ambiental. São classificados como parasitas intracelulares obrigatórios, por possuírem estágios invasivos móveis dos quais são caracterizados pela presença de uma estrutura evolutivamente única chamada de complexo apical formado estruturalmente por conóides, anéis polares, microtúbulos e corpos secretores, como róptrias e micronemas, e tem a função de fixação e invasão das células hospedeiras. Os apicomplexos possuem também um número variável de vesículas eletrodensas (grânulos densos) incluídas no complexo apical, e são distribuídos no citoplasma do parasita e liberam seu conteúdo na célula

hospedeira ao final da invasão. Além deste conjunto de estruturas podem possuir uma organela, chamada de apicoplasto, conhecida também por ser um cloroplasto modificado, sendo adquirida evolutivamente via endossimbiose de uma alga fotossintética. Todavia o apicoplasto não é fotossinteticamente ativo nem presente em todos os membros existentes do filo, mas quando presente é considerado uma organela indispensável na sobrevivência do protozoário (MERCIER *et al.*, 2005; MORRISON, 2009; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

Muitas das espécies que fazem parte do filo Apicomplexa são consideradas patógenos, pois podem desencadear processos infecciosos em seus hospedeiros, parasitando tanto vertebrados como também invertebrados, no entanto, essa infecção muitas vezes pode ser assintomática, devido aos processos de coevolução entre o parasita e seus possíveis hospedeiros. Acredita-se que todas as espécies de animais hospedam pelo menos uma espécie de parasita apicomplexo (GOULD *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2008; MORRISON, 2009; VOTÝPKA *et al.*, 2017). Dentro do filo Apicomplexa, a ordem Haemosporida vem ganhando destaque pela variedade de estudos realizados no mundo tanto morfológicos quanto moleculares evidenciando uma possível capacidade coevolutiva entre os protozoários pertencentes ao grupo em parasitar diversos tipos de hospedeiros vertebrados e suas adaptações para uma diversidade distinta de vetores específicos (VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; LAINSON, 2012; SCHAER *et al.*, 2013).

1.2.1 Ordem Haemosporida

Os parasitas pertencentes a esta Ordem são também conhecidos como hemosporídeos e constituem um grupo filogeneticamente bem estabelecido, apresentam zigoto móvel com conóide; microgametas flagelados produzidos por merogonia; oocisto com esporozoítos; e são caracterizados por serem protistas obrigatoriamente heteróxenos, ou seja, necessitam de mais de um hospedeiro para finalizar seu ciclo evolutivo e utilizam insetos dípteros (Insecta: Diptera) como vetores. Os gêneros que pertencem a este grupo podem ser distinguidos com base na morfologia do estágio eritrocítico, localização do desenvolvimento endógeno do parasita no hospedeiro vertebrado e o tipo de vetor invertebrado. São organismos cosmopolitas e estão distribuídos amplamente em todos os continentes do mundo

com exceção das regiões polares (VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; PERKINS; SCHAER, 2016; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

O estágio de merogonia de um hemosporídeo ocorre em hospedeiros vertebrados (anfíbios, répteis, aves e mamíferos) e são considerados hospedeiros intermediários, enquanto que o estágio de esporogonia ocorre amplamente em espécies de dípteros hematófagos. Estes protozoários agrupam-se em 4 famílias seguidas de seus respectivos hospedeiros vertebrados: Haemoproteidae (parasitas de aves e répteis), Leucocytozoidae (parasitas de aves), Garniidae (parasitas de répteis) e Plasmodiidae (parasitas de aves, mamíferos e répteis), e destacam-se assim como responsáveis por quadros infecciosos de hemosporídeos nestes hospedeiros (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005; LAINSON, 2012; LANDAU *et al.*, 2012; LANDAU; CHAVATTE; BEVERIDGE, 2012 ; PERKINS; SCHAER, 2016; VOTÝPKA *et al.*, 2017) (**Figura 1**)

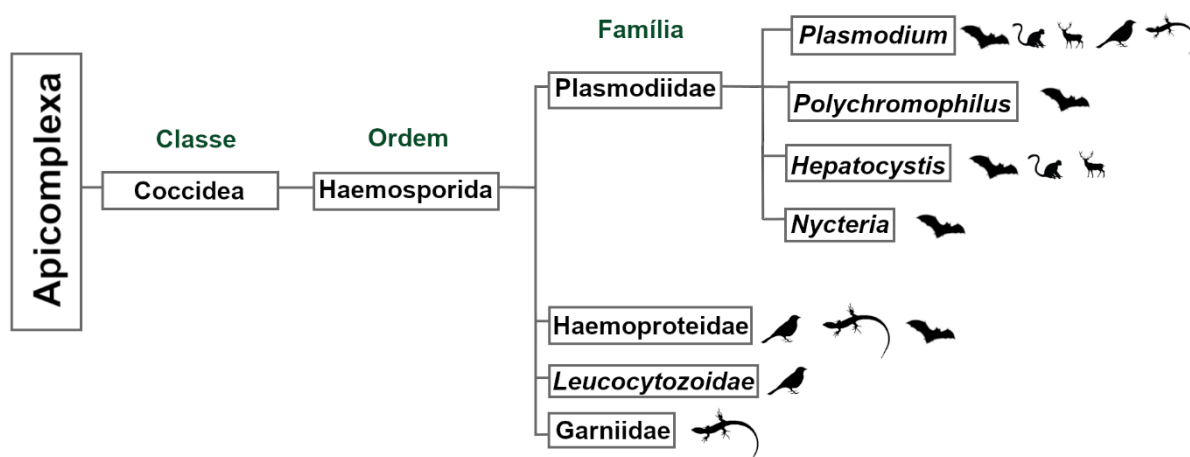


Figura 1. Taxonomia das famílias de hemosporídeos pertencentes à Ordem Haemosporida e respectivos hospedeiros.

A divisão em uma das quatro famílias (Garniidae, Haemoproteidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae) baseia-se principalmente na combinação da presença ou ausência de duas características principais: a reprodução assexuada em

eritrócitos (esquizogonia eritrocítica) e a formação de hemozoína, uma substância cristalina composta por moléculas de hemoglobina metabolizada. A hemozoína é formada por espécies que são atribuídas às famílias Haemoproteidae ou Plasmodiidae (GALEN *et al.*, 2018). A esquizogonia eritrocítica ocorre nos gêneros das famílias Plasmodiidae e Garniidae. Os representantes dos Leucocytozoidae não compartilham nenhuma das duas propriedades (VALKIŪNAS, 2005). Atualmente já foram descritas mais de 500 espécies de hemosporídeos parasitando diferentes grupos de animais vertebrados e novas espécies continuam sendo descritas (PERKINS; AUSTIN, 2009; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

Em mamíferos o quadro de infecção por hemosporídeos é conhecido em hospedeiros como: primatas, roedores, ungulados e morcegos. E dentre esses hospedeiros os morcegos se destacam pela diversidade de gêneros de hemosporídeos que possam parasitá-los, demonstrando uma relação parasita-hospedeiro-vetor bem consolidada (CARRENO *et al.*, 1997; VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; SCHAEER *et al.*, 2013).

A posição taxonômica dos parasitas hemosporídeos sofre variações entre as classificações morfológicas e moleculares (RUGGIERO *et al.*, 2015; CAVALIER-SMITH, 2018). Neste trabalho é utilizada a classificação taxonômica conforme Voltýpka (2017), com modificações de acordo com (VALKIŪNAS; ATKINSON, 2020).

Os hemosporídeos em morcegos podem ser classificados da seguinte forma (VALKIŪNAS; ATKINSON, 2020):

Filo Apicomplexa (Levine, 1970)

Subfilo Sporozoa (Leuckart, 1879)

Classe Coccidea (Leuckart, 1879)

Ordem Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família Haemoproteidae (Doflein, 1916)

Gênero *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Subgênero *Parahaemoproteus* (Bennett, Garnham e Fallis, 1965)

Subgênero *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Gênero *Johnsprentia* (Landau, Chavatte e Beveridge 2012) *

Gênero *Sprattiella* (Landau et al 2012) *

Família Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

Gênero ***Plasmodium*** (Marchiafava e Celli, 1885)

Gênero ***Polychromophilus*** (Dionisi 1898)

Gênero ***Hepatocystis*** (Miller 1908)

Gênero ***Nycteria*** (Garnham and Heisch 1953)

Gênero *Bioccala* (Landau et al. 1980)

Gênero *Biguetiella* (Landau et al. 1984)

Gênero *Dionísia* (Landau et al. 1980)

Família Garniidae (Lainson, Landau e Shaw, 1971)

Gênero *Fallisia* (Lainson, Landau e Shaw, 1974)

Subgênero *Plasmodioides* (Gabaldon, Ulloa e Zerpa, 1985)

Família Leucocytozoidae (Fallis e Bennett, 1961)

Gênero *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)

*A concepção dos dois gêneros *Johnspretia* e *Sprattiella* só foi introduzida muito recentemente (LANDAU *et al.*, 2012; LANDAU; CHAVATTE; BEVERIDGE, 2012). Tanto *Johnspretia* quanto *Sprattiella* aguardam confirmação independente (SCHAER *et al.*, 2018).

(Em negrito os gêneros buscados neste trabalho)

1.2.1.1 Ciclos de vida dos gêneros de hemosporídeos *Plasmodium*, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* em comparação aos gêneros exclusivos que parasitam quirópteros *Polychromophilus*, *Hepatocystis* e *Nycteria*

Os hemosporídeos apresentam uma série de diferenças dentro de seu ciclo de vida, como o desenvolvimento exoeritrocítico e semelhanças como no desenvolvimento eritrocítico, características estas que torna possível a distinção dos parasitas em nível de gênero e possivelmente de espécie (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005; HORROCKS, 2013; SCHAER *et al.*, 2013). Sendo assim os ciclos de vida a seguir serão uma comparativa entre os gêneros referência para hemosporídeos silvestres em aves e mamíferos (GARDNER; MOLYNEUX, 1988; MARTINSEN; VALKIŪNAS, 2005; PERKINS; SCHALL, 2008), para com os exclusivos de quirópteros, destacando possíveis relações entre ciclos e vetores que auxiliarão na elucidação de teorias resultantes desse estudo.

O ciclo de vida dos hemosporídeos inicia-se com a absorção dos gametócitos (célula germinativa) durante o repasto sanguíneo pelo vetor díptero, onde ocorre a fertilização de um zigoto e um oocineto é formado. Este oocineto entra ativamente na hemocele (cavidade do corpo dos artrópodes por onde flui a hemolinfa) do vetor conseqüentemente penetrando na parede de seu intestino médio, tomando uma forma arredondada passando a ser denominado como um oocisto (**Figura 2**) (GARNHAM, 1966; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

Nos gêneros *Plasmodium* e *Haemoproteus* (transmitidos por culicídeos e hippoboscídeos respectivamente), grandes oocistos são formados e subdividem seu conteúdo em vários esporoblastos, dos quais se rompem em centenas de esporozoítos. No gênero *Leucocytozoon* (transmitido por simulídeos) e no subgênero *Parahaemoproteus* (transmitido por ceratopogonídeos) são formados pequenos oocistos e produzem um esporoblasto que ao se romperem liberam menos de cem esporozoítos (GARNHAM, 1966; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

Os esporozoítos são liberados com um complexo apical rudimentar e migram para as glândulas salivares do díptero, nessa fase, desenvolvem organelas como as róprias e os micronemas. As formas esporozoítas são inoculadas nos hospedeiros vertebrados pelos vetores durante o repasto sanguíneo iniciando assim o ciclo no hospedeiro intermediário (VOTÝPKA *et al.*, 2017).

No vertebrado, os esporozoítos são inoculados na corrente sanguínea pelos vetores se transformam em merontes exoeritrocitários, conhecidos por se desenvolverem com mais frequência na região do fígado, e podem ser encontrados também no baço, pulmões, rins, coração, musculatura esquelética e no tecido endotelial de outros órgãos (VOTÝPKA *et al.*, 2017).

No gênero *Polychromophilus* (transmitido por nycteribiídeos e exclusivo de morcegos) a esquizogonia (reprodução assexuada) inicia-se, nas células mesodermiais de vários órgãos do hospedeiro intermediário, tendo como destino as células de Kupffer do fígado na forma de inúmeros e pequenos esquizontes. Estes esquizontes gerados são intermitentes e podem reaparecer durante reinfecções. Depois desse ciclo exoeritrocítico, merozoítos são liberados na corrente sanguínea, em seguida invadem os eritrócitos e se desenvolvem em gametócitos (GARNHAM, 1966; LANDAU *et al.*, 1977; VALKIŪNAS, 2005).

No gênero *Nycteria* (sem descrição de vetor, exclusivo de morcegos) a esquizogonia ocorre no fígado, onde podem ser encontrados esquizontes lobulados,

sem tendências de formação de merocistos. Essa esquizogonia ocorre somente no parênquima hepático de forma semelhante ao protozoário do gênero ***Plasmodium***. São observados somente gametócitos livres na corrente sanguínea. Dados sobre este gênero são escassos (GARNHAM, 1966; SCHAER *et al.*, 2015).

No gênero ***Hepatocystis*** (transmitido por ceratopogonídeos) a esquizogonia também ocorre no parênquima hepático do vertebrado. Na corrente sanguínea são encontradas apenas formas reprodutivas do protozoário livres (gametócitos). Possuem esquizontes exoeritrocíticos semelhantes ao gênero ***Plasmodium***, porém estas formas não maturam em poucas semanas. Estas formas se expandem em quesito tamanho, produzindo vacúolos, que por ventura, se unem num cisto preenchido por merozoítos e fluido coloidal, a partir disso, leva o nome de merocisto. É a partir do merocisto maduro que merozoítos são liberados do fígado, em seguida invadindo eritrócito e se desenvolvendo em gametócitos. Este gênero apresenta reinvasão de células parenquimáticas hepáticas o que permite ciclos secundários de esquizogonia exoeritrocítica. E como característica única, a penetração da parede do intestino médio, como também o encistamento na cabeça e no tórax do vetor díptero (GARNHAM, 1966; EJOTRE *et al.*, 2021; SCHAER *et al.*, 2017).

O estágio de megalomeronte é característico da segunda merogonia dos gêneros ***Leucocytozoon***, ***Hepatocystis*** e ***Haemoproteus***. O período pré-patente (período que decorre entre a penetração do agente etiológico e o aparecimento das primeiras formas detectáveis do agente) varia de 2 a 3 semanas. O processo de transformação de esporozoítos e merozoítos exoeritrocitários em trofozoítos dentro das células hospedeiras inclui uma rápida degeneração da camada interna da dupla membrana, microtúbulos subpeliculares, anéis polares, róptrias e micronemas (VOTÝPKA *et al.*, 2017).

Nos eritrócitos, trofozoítos de ***Plasmodium*** e ***Haemoproteus*** estão localizados no vacúolo parasitóforo (compartimento intracelular para diferenciação e multiplicação) e absorvem o conteúdo citoplasmático da célula hospedeira por meio de uma fissura denominada micrópila (VOTÝPKA *et al.*, 2017). Hemosporídeos com desenvolvimento intraeritrocitário (***Plasmodium*** e ***Haemoproteus***) transformam a hemoglobina do hospedeiro em um pigmento característico chamado de hemozoína, facilmente visto e caracterizado ao microscópio. Quando o rápido crescimento dos trofozoítos é finalizado, merontes são formados. Os protozoários do gênero ***Leucocytozoon*** se diferem dos demais, pois infectam uma quantidade

significativamente maior de células hospedeiras e, ao infectar os eritrócitos, digerem a hemoglobina sem a formação de grânulos de hemozoína. Após esses processos, ocorre uma expansão citoplasmática, seguida de divisão de núcleos e citoplasma, formando os merozoítos. Estes merozoítos rompem os eritrócitos, sendo liberados na corrente sanguínea, podendo infectar novos eritrócitos como também se diferenciar em gametócitos. O ciclo de vida é encerrado quando os gametócitos livres na corrente sanguínea são absorvidos pelo vetor designado durante o repasto sanguíneo infectando o mesmo e dando continuidade no ciclo parasitário em um próximo hospedeiro (VALKIŪNAS, 2005; VOTÝPKA *et al.*, 2017).

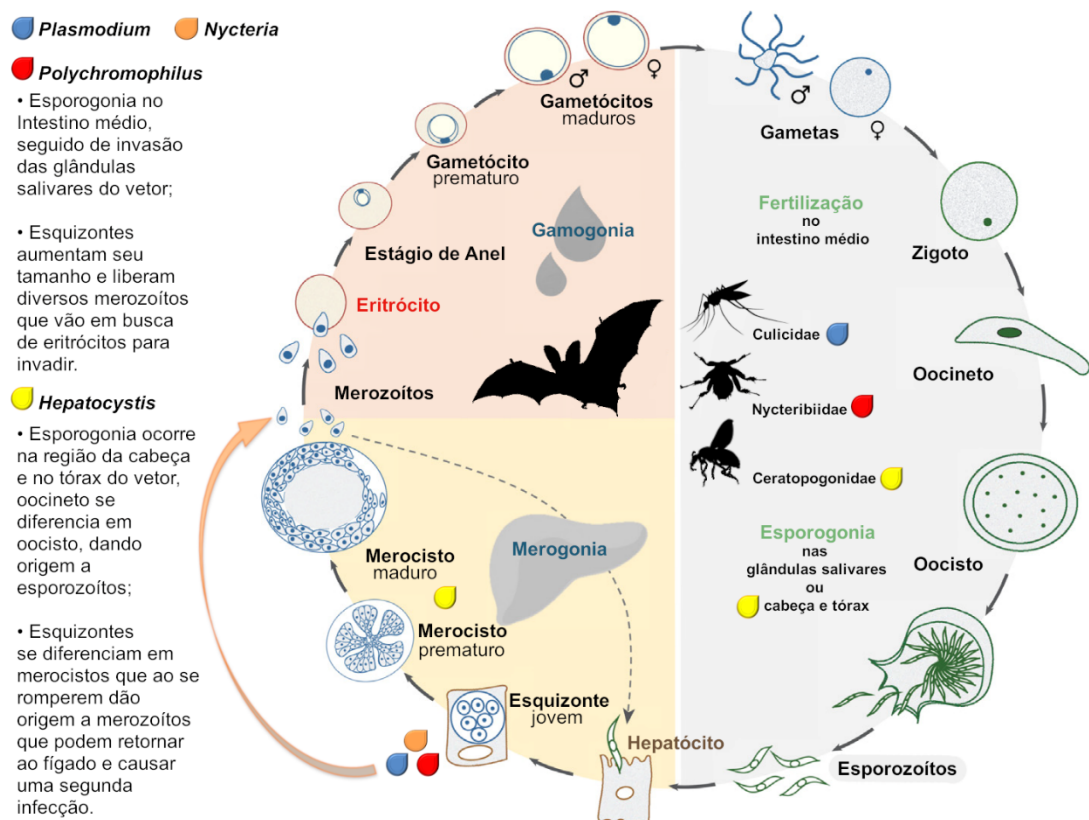


Figura 2. Ciclo de vida dos hemosporídeos que infectam quirópteros, gêneros: *Plasmodium*, *Polychromophilus*, *Hepaticystis* e *Nycteria*. Adaptado de (EJOTRE *et al.*, 2021).

1.2.1.2 Transmissão e Sinais Clínicos

Os quirópteros formam um grupo relativamente antigo em comparação aos demais mamíferos e sua função como hospedeiros intermediários de hemosporídeos foi questionada em estudos filogenéticos recentes, que destacaram o grupo como os

primeiros mamíferos hospedeiros desses parasitas (TEELING *et al.*, 2005; SCHAER *et al.*, 2013; PERKINS; SCHAER, 2016).

O parasitismo é uma relação de dependência entre duas espécies diferentes, onde o organismo determinado parasita depende metabolicamente do organismo definido como hospedeiro. Nessa relação parasita-hospedeiro pode ocorrer dano ao hospedeiro ou não, dificilmente o levando a uma morte imediata. Essas características variam individualmente de cada espécie analisada tanto parasita quanto hospedeiro e o ambiente em que vivem (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2006; MAIZELS, 2009; POULIN; RANDHAWA, 2015).

Os morcegos desenvolveram um sistema imunológico extremamente adaptado, pois mesmo em situações extremas de infecção de mais 60% por hemosporídeos, não desenvolveram sinais clínicos, apresentando serem assintomáticos a essa infecção. Este quadro se dá devido a uma rápida reprodução assexuada exclusivamente nos hepatócitos e não nos eritrócitos (GARNHAM, 1966; SCHAER *et al.*, 2013). Levantando-se a hipótese de que o sistema imunológico desse grupo obrigou evolutivamente os parasitas a se limitarem nas células do fígado.

O parasitismo em morcegos vai além da relação apenas entre o hospedeiro e o parasita hemosporídeo, existe também a interação com um inseto com a função de vetor. Nos morcegos esses vetores fazem parte da ordem Diptera, e possuem relação direta com as espécies de hemosporídeos que transportam.

O gênero *Plasmodium* é transmitido por culicídeos geralmente do gênero *Anopheles* (**Figura 3A**), caracterizado por apresentar um comportamento alimentar bem diversificado e a capacidade de escolher hospedeiros de acordo com a disponibilidade no ambiente. (WERNSDORFER; MCGREGOR, 1988; FORATTINI, 2002; SCHAER *et al.*, 2013), *Hepatocystis* transmitido por ceratopogonídeos do gênero *Culicoides* (**Figura 3B**) consideradas as menores moscas hematófagas já descritas medindo cerca de três milímetros e 96% das espécies alimentam-se obrigatoriamente de mamíferos e aves (EJOTRE *et al.*, 2021; TRINDADE, 2004), *Polychromophilus* transmitido por nycteribiídeos (**Figura 3C**) dos gêneros *Basilia*, *Penicillidia* e *Nycteribia* estas moscas são especializadas em morcegos e apresentam ausência de asas e atrofia do músculo de voo, resultando em um tórax reduzido, onde há inserções dorsais das patas e da cabeça, características adquiridas evolutivamente para seu hospedeiro (GRACIOLLI; AUTINO; CLAPS, 2007; RAMASINDRAZANA *et al.*, 2018).

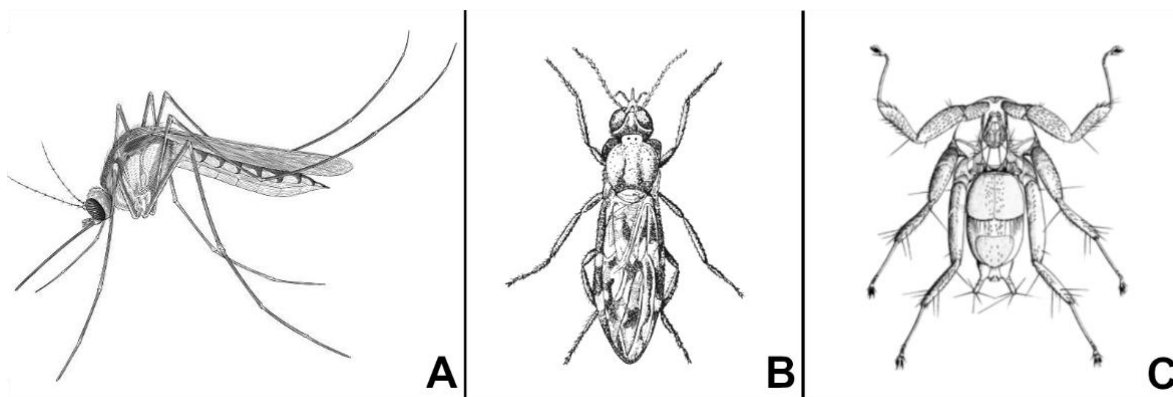


Figura 3. Vetores de hemosporídeos em morcegos: **A** – Mosquito do gênero *Anopheles* (Culicidae), vetor do gênero *Plasmodium*; **B** – Mosca do gênero *Culicoides* (Ceratopogonidae), vetor do gênero *Hepatocystis* e **C** – Exemplificação do grupo de moscas ápteras (ausência de asas) da família Nycteribiidae, vetor do gênero *Polychromophilus*. Adaptado de (VALKIŪNAS, 2005; DICK; PATTERSON, 2006; HAELEWATERS *et al.*, 2021).

1.2.1.3 Diagnóstico morfológico para identificação de hemosporídeos em morcegos

A análise feita através de microscopia ótica é considerada a metodologia mais tradicional para a identificação e diagnóstico de hemosporídeos. Sua detecção é embasada nas características morfométricas e morfológicas que o parasita pode apresentar em um esfregaço sanguíneo corado através de colorações do tipo Romanowsky (Leishman e Giemsa); e para uma identificação eficaz, necessita de condições de leitura adequada e pessoa devidamente treinada (VALKIŪNAS, 2005). Através deste método é possível quantificar os parasitas com a observação de um determinado número de campos microscópicos, de células parasitadas ou não e estimar o número de parasitas por campo do esfregaço (VALKIŪNAS, 2005).

Atualmente o conhecimento adquirido sobre a história evolutiva, distribuição geográfica, especificidade por hospedeiros e vetores, ecologia do parasita, foram obtidos através de técnicas de microscopia ótica (GARNHAM, 1966; LANDAU *et al.*, 1980; VALKIŪNAS, 2005). Entretanto, esta técnica possui limitações, como a impossibilidade de identificar uma espécie de parasita em esfregaços, mesmo por alguém capacitado, quando esse organismo apresenta baixa parasitemia ou infecção mista (VALKIŪNAS, 2005).

Os hemosporídeos estão intimamente relacionados, seja geneticamente ou através de relações específicas com vetores e hospedeiros e nem sempre podem ser diagnosticados apenas com técnicas de microscopia ótica (MARTINSEN; PAPERNA; SCHALL, 2006; PERKINS; SCHAER, 2016). Assim, atualmente os métodos moleculares vêm acrescentando novas informações, sobre diversidade genética, filogenia, e relações com o hospedeiro e inseto vetor, proporcionando um diagnóstico mais robusto com a união das técnicas (PERKINS; SCHALL, 2002; MARTINSEN; PAPERNA; SCHALL, 2006; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; SCHAER *et al.*, 2013). Mesmo a microscopia sendo considerada muitas vezes mais trabalhosa, e com necessidade de ter profissionais especializados para sua execução, é ainda considerada ferramenta essencial e padrão para o diagnóstico de hemosporídeos (VALKIŪNAS, 2005).

Parasitas hemosporídeos que infectam morcegos podem ser diferenciados morfologicamente através de esfregaços sanguíneos, onde podem ser encontradas formas parasitárias reprodutivas nos eritrócitos (gametócitos maduros) (**Figura 4**), que podem distingui-los no nível de gênero e muitas vezes espécie (SCHAER *et al.*, 2013). No entanto, para estudos filogenéticos comparativos e construção de uma possível história evolutiva é necessário aliar a microscopia ótica a análises moleculares.

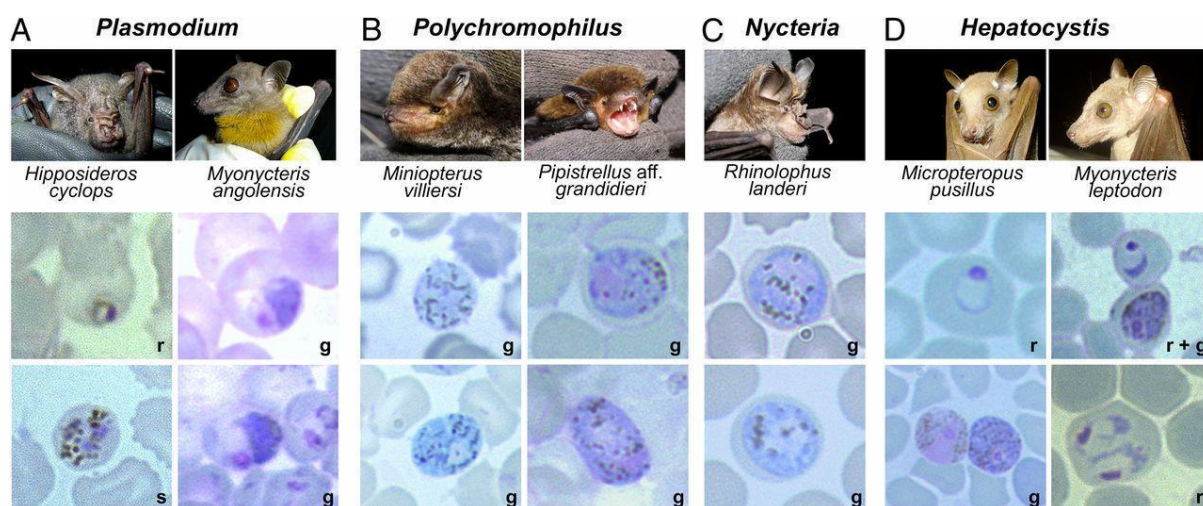


Figura 4. Parasitas hemosporídeos e suas espécies hospedeiras. São mostrados morcegos capturados e micrografias representativas de esfregaços de sangue corados por Giemsa de seus respectivos estágios sanguíneos do parasita hemosporídeo (r, estágio em anel; s, esquizonte; g, gametócito). (A) Estágios sanguíneos de *P. cyclopsi* e *P. voltaicum* isolados de *H. cyclops* e *M. angolensis*, respectivamente. (B) Gametócitos de *Polychromophilus* isolados de morcegos miniopterídeos e vespertilionídeos. (C) Gametócitos de *Nycteria* isolados de dois morcegos rinofídeos. (D) Estágios sanguíneos de *Hepatocystis* isolados de seis morcegos pteropodídeos. São mostrados duas (*Micropteropus pusillus* e *Myonycteris leptodon*) de seis espécies hospedeiras e diferentes estágios

sanguíneos de seus parasitas. As micrografias foram tiradas com aumento de 1.000x (retirado de SCHAER *et al.*, 2013).

Os registros morfológicos de formas parasitárias de hemosporídeos que parasitam morcegos são muitas vezes antigos ou difíceis de localizar em acervos de bibliotecas (GARNHAM, 1966; GARNHAM; LAINSON; SHAW, 1971; LANDAU *et al.*, 1984, 1980, 1977), tornando o acesso a essas informações limitado. Por outro lado, os registros morfológicos e moleculares atuais estão disponíveis em revistas científicas online, de livre acesso (WITSENBURG; SALAMIN; CHRISSTE, 2012; SCHAER *et al.*, 2013, 2015, 2018; ARNUPHAPPRASERT *et al.*, 2020). A tabela a seguir (**Tabela 1**) traz uma breve descrição das características microscópicas dos gêneros de hemosporídeos em quirópteros, juntamente com o status da atual situação de análise desses parasitas, ao lado de fotografias das formas parasitárias reprodutivas (gametócitos), ferramentas de identificação e caracterização desses hemoparasitas.

Tabela 1. Relação entre descrição morfológica e molecular de hemosporídeos em morcegos.

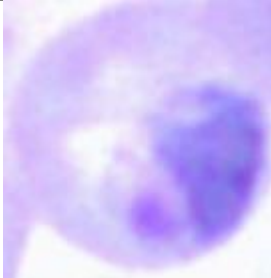

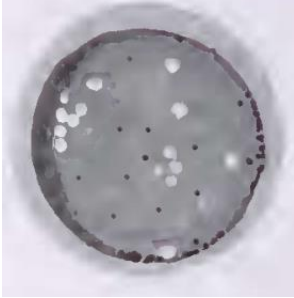
Hemosporídeo	Características	Gametócito	Tipo	Análise	Referência
<i>Plasmodium</i> (Marchiafava e Celli, 1885)	Hospedeiro: Mamíferos, répteis e aves; Desenvolvimento no fígado; Trofozoítos nos eritrócitos Formas de parasita hipnozoite.	 Gametócito Em: <i>Myonycteris angolensis</i>	Tipo <i>malariae</i>	Morfológico e Molecular	Schaer et al., 2013
<i>Hepaticystis</i> (Laveran 1899)	Hospedeiro: Morcegos, primatas, roedores e ungulados; Merocistos grandes (em primatas 2 mm); Desenvolvimento nos hepatócitos; Migração para tecidos vizinhos; Secreção de substância coloidal dentro ou ao redor do esquizonte.	 Microgametócito Em: <i>Pteropus alecto</i>	Tipo <i>vivax</i>	Morfológico <input type="checkbox"/> Molecular <input type="checkbox"/>	Landau et al., 2012 Schaer et., 2013
<i>Johnspretia</i> (Landau, Chavatte e Beveridge 2012)	Hospedeiro: Exclusivo de morcegos; Esquizontes muito pequenos exclusivos em pulmões compactos e alongados semelhantes ao <i>H. Parahaemoproteus</i> de aves. Não secretam colóide; Membrana citoplasmática fina, Núcleos grandes (coloração azul presente com Giemsa);	 Microgametócito Em: <i>Pteropus alecto</i>	----	Somente Morfológico	Landau; Chavatte; Beveridge, 2012

Tabela 1. Relação entre descrição morfológica e molecular de hemsporídeos em morcegos (continuação).



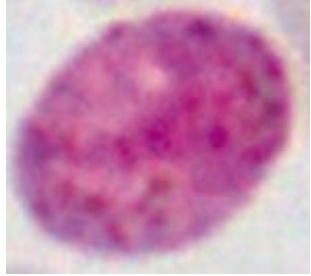
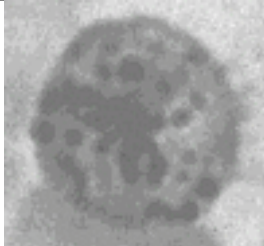
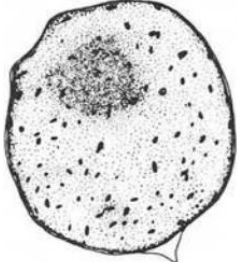
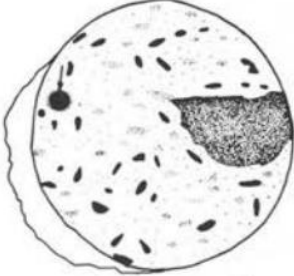
Hemosporídeo	Características	Gametócito	Tipo	Análise	Referência
<i>Sprattiella</i> (Landau et al 2012)	Hospedeiro: Exclusivo de morcegos; Núcleo grande Camada fibrosa na membrana; Esquizontes renais; Células ovais ou arredondadas;	 Microgametócito Em: <i>Pteropus alecto</i>	Tipo <i>vivax</i>	Somente Morfológico	Landau et al., 2012
<i>Nycteria</i> (Garnham e Heisch 1953)	Hospedeiro: Exclusivo de morcegos; Esquizontes nos hepatócitos Esquizontes arredondados ou lobados; Núcleos grandes.	 Microgametócito Em: <i>Nycteris</i> spp.	Tipo <i>malariae</i>	Morfológico e Molecular	Schaer et al., 2015
<i>Polychromophilus</i> Dionisi (1899)	Hospedeiro: Exclusivo de morcegos; Esquizontes elipsoidais circundados por uma cápsula espessa e rosa brilhante; Esquizontes frequentemente em vários órgãos: pulmão, rim, baço, fígado e até as suprarrenais; Núcleos pequenos mesmo em células jovens.	 Microgametócito Em: <i>Myotis siligorensis</i>	Tipo <i>malariae</i>	Morfológico e Molecular	Arnuphapprasert et al., 2020

Tabela 1. Relação entre descrição morfológica e molecular de hemosporídeos em morcegos (continuação).

Hemosporídeo	Características	Gametócito	Tipo	Análise	Referência
<i>Bioccala</i> (Landau et al., 1980)	Hospedeiro: Exclusivo de morcegos; Esquizontes pequenos; Disponíveis por todo corpo. Desenvolvimento no fígado; Alteração leve na forma da célula	 Microgametócito Em: <i>Epitesicus fuscus</i>	Tipo ave- réptil	Somente Morfológico	Marinkelle, 1995
<i>Biguetiella</i> (Landau et al., 1984)	Esquizontes muito pequenos; Desenvolvimento nos hepatócitos.	 Microgametócito Em: <i>Hipposideros larvatus</i>	Tipo <i>falci</i> <i>parum</i>	Somente Morfológico	Landau et al., 1984
<i>Dionisia</i> (Landau et al., 1980)	Esquizontes arredondados ou ovais e pequenos; Desenvolvem-se no lúmen da vasculatura hepática, em uma célula hospedeira hipertrofica circunvizinha por uma cápsula espessa; Gametócitos arredondados.	 Microgametócito Em: <i>Hipposideros cyclops</i>	Tipo malariae	Somente Morfológico	Landau et al., 1980

1.2.1.4 Envolvimento de morcegos com hemosporídeos e o uso de ferramentas moleculares para identificação

Quirópteros estão diretamente envolvidos com parasitas, já foram descritos diversos ectoparasitas, como: dípteros, carrapatos e ácaros, além de endoparasitas, como: fungos, vírus, bactérias e protozoários (REIS, 2007; SCHAER *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2017;).

Os morcegos possuem a maior diversidade de parasitas hemosporídeos dentre os mamíferos, com cerca de nove gêneros. Além dos gêneros bem conhecidos (*Plasmodium* e *Hepaticystis*), sete gêneros infectam exclusivamente quirópteros: *Polychromophilus*, *Nycteria*, *Bioccala*, *Biguetiella*, *Dionisia*, *Johnsprentia* e *Sprattiella* (LANDAU *et al.*, 2012; LANDAU; CHAVATTE; BEVERIDGE, 2012; PERKINS; SCHAER, 2016), destacando claramente este grupo de mamíferos como ferramenta vital no estudo taxonômico, sistemático e evolutivo de hemosporídeos em mamíferos. Embora *Bioccala* tenha sido elevado a gênero em 1984 (LANDAU *et al.*, 1984), estudos ainda o utilizam como subgênero de *Polychromophilus* (GARDNER; MOLYNEUX, 1988). Os vetores de *Plasmodium*, *Polychromophilus* e *Hepaticystis* são dípteros hematófagos das famílias Culicidae, Nycteribiidae e Ceratopogonidae respectivamente, enquanto que os demais gêneros permanecem ainda desconhecidos (WITSENBURG; SALAMIN; CHRISTE, 2012; SCHAER *et al.*, 2013, 2015; GALEN *et al.*, 2018; RAMASINDRAZANA *et al.*, 2018). Os gêneros *Plasmodium*, *Hepaticystis* e *Nycteria* incluem parasitas hemosporídeos que até agora foram identificados principalmente em morcegos da subordem Yinpterochiroptera em regiões tropicais da Ásia e África. Em contraste, parasitas do gênero *Polychromophilus* com exceção de um caso na família Rhinolophidae também subordem Yinpterochiroptera (BORNER *et al.*, 2016), estes parasitas infectam normalmente membros das famílias Miniopteridae e Vespertilionidae (subordem Yangochiroptera), e são, até agora, os únicos hemosporídeos que infectam morcegos com ampla distribuição em regiões tropicais e temperadas (SCHAER *et al.*, 2018).

Estudos recentes demonstram uma maior concentração de pesquisas moleculares, voltadas a quirópteros africanos, europeus, asiáticos e da Oceania (WITSENBURG; SALAMIN; CHRISTE, 2012; SCHAER *et al.*, 2013; WITSENBURG *et al.*, 2015; LUTZ *et al.*, 2016; SCHAER *et al.*, 2017; RAMASINDRAZANA *et al.*, 2018; HOLZ *et al.*, 2019; ARNUPHAPPASERT *et al.*, 2020; CHUMNANDEE *et al.*, 2021;

RASOANORO *et al.*, 2021; TSAGUE *et al.*, 2021). Em contrapartida, nosso conhecimento sobre parasitas hemospóridios em morcegos brasileiros é ainda muito limitado e restrito somente a investigações morfológicas, como em 1938, quando hemospóridios foram encontrados em esfregaços sanguíneos de *Glossophaga soricina soricina* (Phyllostomidae), coletado no Estado do Pará. Entretanto, não foi possível a identificação da espécie do parasita, devido à perda dos desenhos científicos do hemospóridio em lâmina. Sendo assim, esses dados foram publicados somente muito anos depois (DEANE; DEANE, 1961). Posteriormente no mesmo Estado, foi descrito o parasita da espécie *Polychromophilus deanei* encontrado em *Myotis nigricans* (Vespertilionidae) no Brasil, que serviu como a primeira evidência da presença desse grupo de parasitas em quirópteros no Novo Mundo (GARNHAM; LAINSON; SHAW, 1971). Ainda assim, permanecemos sem dados moleculares disponíveis para este e os demais parasitas nesse grupo de mamíferos no país.

Abordagens moleculares são ferramentas eficazes para o entendimento dos hemospóridios, atreladas a análises filogenéticas baseadas no gene mitocondrial citocromo b (*cytb*), e vem sendo usadas em diversas publicações voltadas à presença de hemospóridios em animais silvestres (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; SCHAER *et al.*, 2013; LUTZ *et al.*, 2016; SCHAER *et al.*, 2018). O gene *cytb* apresenta regiões polimórficas flanqueadas por regiões conservadas, que auxiliam na padronização de protocolos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com o uso de *primers* universais ou específicos para as espécies de hemospóridios (ESCALANTE; AYALA, 1995; BOUNDENGA *et al.*, 2018). Em 2002, Perkins e Schall realizaram uma extensa análise utilizando este gene alvo como ferramenta na identificação dos parasitas (PERKINS; SCHALL, 2002). Em 2008, Martinsen *et al.* propuseram uma abordagem multigênica, utilizando além do gene *cytb* como alvo: (i) outro gene mitocondrial, citocromo c oxidase I (*coI*); (ii) um gene de apicoplasto, protease caseinólítica C (*clpC*); (iii) e um gene nuclear, adenilossuccinato liase (*asl*) (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008). Os autores recuperaram a primeira grande filogenia bem resolvida de *Plasmodium* e parasitas hemospóridios relacionados, usando dados de sequência para quatro genes dos três genomas dos parasitas e combinando todos os dados (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008).

Em 2013, Schaer e colaboradores propuseram a utilização de mais um gene alvo como ferramenta na detecção de parasitas e uso em filogenia, o fator de alongamento 2 (*ef2*), demonstrando sua eficácia na amplificação de fragmentos dos

gêneros *Plasmodium*, *Hepatocystis*, *Polychromophilus* e *Nycteria* (SCHAER *et al.*, 2013).

Assim, o uso de multigenes é recomendado para caracterização e triagem dos gêneros desses parasitas em animais silvestres e na recuperação de uma possível história evolutiva de todo o grupo, determinando assim, padrões de especificidade do hospedeiro, e conseqüentemente identificando as possíveis transições entre os diferentes grupos de vetores dípteros e hospedeiros vertebrados (PERKINS; SCHALL, 2002; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008; HORROCKS, 2013; WITSENBURG *et al.*, 2015; LUTZ *et al.*, 2016; BOUNDENGA *et al.*, 2018).

Embora a situação epidemiológica dos hemosporídeos em morcegos seja bem abordada fora do país, estudos envolvendo estes animais e respectivos parasitas ainda são escassos no Brasil. Portanto, este estudo pretende investigar através de técnicas moleculares a ocorrência desses parasitas em nossa fauna Chiroptera. O estudo de quirópteros brasileiros possibilitará uma compreensão do seu papel na manutenção do ciclo evolutivo dos parasitas hemosporídeos, utilizando técnicas mais sensíveis e específicas de diagnóstico como PCR, nunca antes utilizadas para esse fim nesses hospedeiros. Uma análise ampla de amostras de diferentes espécies de morcegos possibilitará a caracterização da incidência dos hemosporídeos nestes mamíferos, visto que a saúde ambiental e o impacto ecológico da presença desses parasitas em animais silvestres ainda são pouco explorados. Por fim, um monitoramento que forneça informações da distribuição geográfica da infecção nesses animais se faz de extrema importância no desenvolvimento de estratégias para a identificação dos possíveis impactos na vida silvestre.

OBJETIVOS

1.3 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência de hemosporídeos (Apicomplexa: Haemosporida) em amostras de morcegos silvestres brasileiros de vida livre, por meio de técnicas moleculares e análise de multigenes.

1.4 Objetivos Específicos

- ❖ Detectar molecularmente a presença de hemosporídeos em amostras de morcegos silvestres de vida livre nos Estados do Paraná, Rio de Janeiro e Mato Grosso;
- ❖ Verificar aplicabilidade de genes alvo diferentes para diagnóstico de hemosporídeos em morcegos;
- ❖ Realizar análises filogenéticas entre as sequências obtidas e as sequências encontradas em outros países;
- ❖ Relacionar a presença dos parasitas mediante os aspectos taxonômicos dos morcegos;
- ❖ Contribuir na atualização e inclusão de novos dados do GenBank com as respectivas espécies de hemosporídeos encontradas.

MATERIAL E MÉTODOS

1.5 Amostras deste estudo

Neste estudo foram utilizadas amostras coletadas de diferentes espécies de morcegos pertencentes aos biomas Mata Atlântica, Pantanal e Cerrado (**Figura 5**).

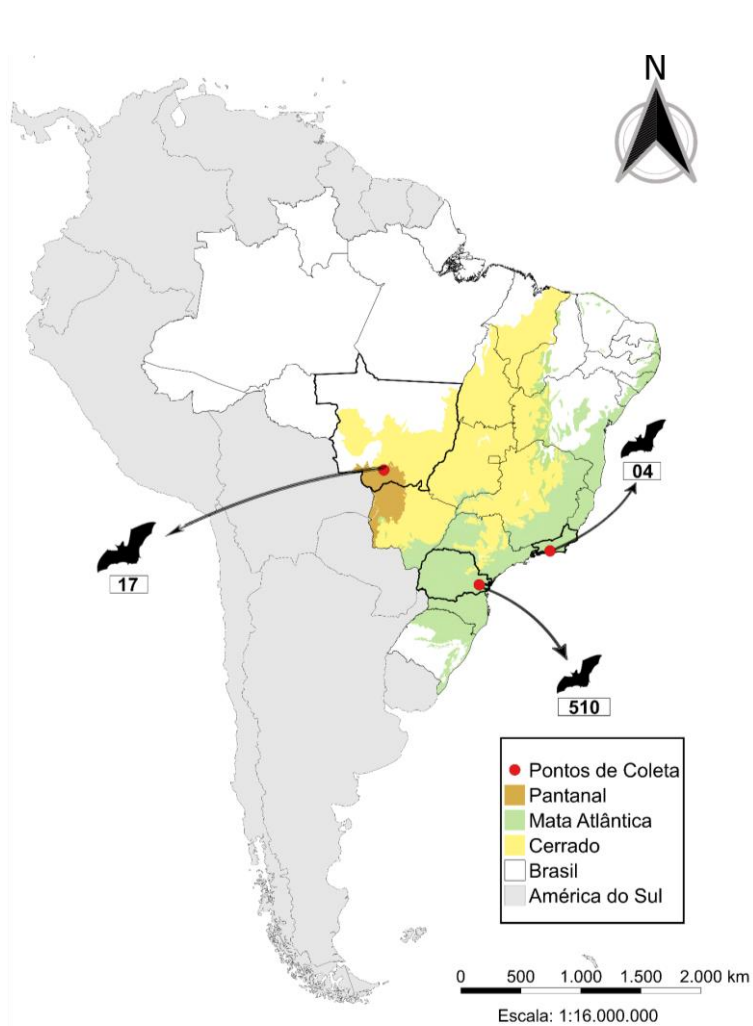


Figura 5. Mapa dos pontos de coleta de amostras deste estudo.

1.5.1 Amostras do Estado do Paraná

As amostras de tecido cerebral de morcegos sem espécies identificadas ($n= 500$) foram adquiridas através do Laboratório de Referência do Estado do Paraná (LACEN) e faziam parte do programa de monitoramento da circulação do vírus da raiva. Elas foram coletadas entre setembro de 2019 e agosto de 2020 em 77

municípios diferentes do Estado do Paraná, a maioria deles inseridos em fragmentos remanescentes dos biomas de Mata Atlântica e Cerrado, bem como em áreas urbanizadas. Essas amostras foram obtidas em parceria com o Doutorando Guilherme Minozzo da Universidade Federal do Paraná, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, seção de Zoonoses do LACEN/PR (Laboratório Central do Estado do Paraná).

Oito amostras de sangue de morcegos (seis *Desmodus rotundus*, Família Phyllostomidae e dois *Diphylla ecaudata*, Família Phyllostomidae) foram coletadas em duas cavernas no município de Rio Branco do Sul – PR, que está inserido em um fragmento de Mata Atlântica. A captura destes morcegos fez parte do programa de monitoramento da raiva em herbívoros (ruminantes e equinos) realizado por órgãos públicos municipais e estaduais, visto que são espécies hematófagas. Além disso, dois morcegos não hematófagos da espécie *Molossus* sp., Família Molossidae, foram coletados para vigilância da raiva na cidade de Curitiba, por se encontrarem em áreas públicas ao redor do Zoológico Municipal de Curitiba – PR (CORREIA DOS SANTOS *et al.*, 2020). Essas amostras foram obtidas da parceria com o Prof. Dr. Alexander Biondo, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

1.5.2 Amostras dos Estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro

Amostras de sangue de morcegos armazenadas em cartões FTA® Whatman® (Whatman, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foram coletadas no Mato Grosso (17 amostras) e Rio de Janeiro (quatro amostras) através das colaborações com o Dr. Alan Fecchio, da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT e Dra. Marina Bueno, da Fundação Oswaldo Cruz, RJ, respectivamente.

No Mato Grosso, foram coletadas em outubro de 2019 no município de Poconé, em áreas rurais inseridas no bioma Pantanal (16°22'02.0"S 56°17'55.0"O, 127 m a.s.l.). Espécies e famílias amostradas:

- *Glossophaga soricina*, Família Phyllostomidae (cinco amostras);
- *Molossus molossus*, Família Molossidae (cinco amostras);
- *Myotis* cf. *nigricans*, Família Vespertilionidae (quatro amostras);
- *Rhynchonycteris naso*, Família Emballonuridae (duas amostras);
- *Noctilio albiventris*, Família Noctilionidae (uma amostra).

As amostras do Rio de Janeiro foram coletadas em outubro de 2020 no município do Rio de Janeiro, na área ao redor da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), inserida num fragmento urbano de Mata Atlântica. Foram amostrados unicamente morcegos da espécie *Artibeus lituratus*, Família Phyllostomidae. Além da coleta de sangue foram confeccionados esfregaços sanguíneos para leitura por microscopia ótica.

1.6 Diagnóstico por microscopia ótica

Os quatro esfregaços sanguíneos disponíveis para análise adquiridos de morcegos do Rio de Janeiro foram fixados com metanol 100% no mesmo dia da coleta e corados com solução de Giemsa a 10% por uma hora, em um prazo de até 30 dias após as coletas (VALKIŪNAS, 2005). Os esfregaços foram examinados por aproximadamente 15-20 min, visualizando 100 campos em baixa ampliação (400X) e 100 campos em alta ampliação (1000X) (VALKIŪNAS, 2005), usando um microscópio de luz Leica ® DM3000LED. A busca de formas parasitárias foi realizada de acordo com estudos morfológicos anteriores sobre hemosporídeos em animais silvestres (VALKIŪNAS, 2005; SCHAER *et al.*, 2013).

1.7 Extração de DNA

As amostras provenientes do Estado do Paraná foram recebidas já extraídas: para tecido cerebral, resultante da extração com Kit BioGene DNA/RNA Viral (K204-4, Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) e quando sangue 200 µL preparado conforme Illustra Kit Mini Spin de preparação genômica de sangue (GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, Reino Unido), ambos de acordo com instruções do fabricante.

As amostras provenientes do Rio de Janeiro e Mato Grosso, armazenadas em cartões FTA® Whatman® (Whatman, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), foram extraídas utilizando o kit comercial Wizard SV 96 Genomic DNA Purification System (PROMEGA®, Madison, Wisconsin, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

1.8 PCR para amplificação de genes do parasita

Para detecção de hemosporídeos foram realizadas reações de PCR simples ou *nested* de cinco genes localizados nos três genomas do parasita:

Mitocondrial: Citocromo b (*cytb*), Citocromo oxidase I (*coI*);

Apicoplasto: Protease caseinolítica C (*clpC*);

Nuclear: Fator de Alongamento 2 (*ef2*) e Adenilosuccinato liase (*asl*)

Os *primers* utilizados e as condições de amplificação são mostrados na **Tabela**

2.

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de PCR de acordo com os genes alvo.

Gene alvo	Reação	Primer	Sequência	Tamanho do Fragmento	Condições do ciclo: temperatura (°C)/tempo(s)		
					Desnaturação	Anelamento	Extensão
Mitocondrial citocromo b*	1ª Reação	DW2	5'-TAA TGC CTA GAC GTA TTC CTG ATR ATC CAG-3'	~1260pb	94/20	60/20	72/90
		DW4	5'-TGT TTG CTT GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG-3'				
	Nested	DW1	5'-TCA ACA ATG ACT TTA TTT GG-3'	~680pb			
		DW3	5'-TGC TGT ATC ATA CCC TAA AG-3'				
		DW8	5'-GCA CAA ATC CTT TAG GGT ATG ATAC-3'	531pb			
		DW6	5'-GGG AGC TGT AAT CAT AAT GTG-3'				
Mitocondrial Citocromo oxidase I**	1ª Reação	col/outerF	5'-CTA TTT ATG GTT TTC ATT TTT ATT TGG TA-3'	1285pb	94/20	60/30	72/50
		col/outerR	5'-AGG AAT ACG TCT AGG CAT TAC ATT AAA TCC-3'				
	Nested	col/nestedF	5'-ATG ATA TTT ACA RTT CAY GGW ATT ATT ATG-3'	1064pb			
		col/nestedR	5'-GTA TTT TCT CGT AAT GTT TTA CCA AAG AA-3'				
	Sequencia- mento	Cox-mid-F	5'-TTA TTC TGG TTT TTT GGT CAT CCA G-3'	562pb			
		Cox-mid-R	5'-CTG GAT GAC CAA AAA ACC AGA ATA A-3'	527pb			
Apicoplasto protease caisenolítica**	1ª Reação	ClpcF Out	5'-AAA CTG AAT TAG CAA AAA TAT TA-3'	640pb	94/30	45/30	72/50
		ClpcR Out	5'-CGW GCW CCA TAT AAA GGA T-3'				
	Nested	ClpcF2 In	5'-GAT TTG ATA TGA GTG AAT ATA TGG-3'	574pb			
		ClpcR2 In	5'-CCA TAT AAA GGA TTA TAW G-3'				
Nuclear Adenilosuccinato liase **	1ª Reação	asl/outerF	5'-GSK AAR TTT AAT GGK GCT GTW GG-3'	~300pb	94/30	45/30	72/50
		asl/outerR	5'-GGA TTA AYT TTA TGA GGC ATT G-3'				
	Nested	ASLnestF	5'-GCT GAT MAA AAT RTT GAT TGG-3'	244pb			
		ASLnestR	5'-GAG GCA TTG TAC TAC TWC C-3'				
Nuclear Fator de Alongamento 2***	Simples	EF2-F	5'-GTT CGT GAG ATC ATG AAC AAA AC-3'	608pb	94/30	50/30	72/50
		EF2-R	5'-CCT TGT AAA CCA GAA CCA AA-3'				

Reações de PCR adaptadas de *(PERKINS; SCHALL, 2002); *(MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008); *(SCHAER *et al.*, 2013).

Todas as reações incluíram um período de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C e, uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Modificando-se apenas o número de ciclos: 35 ciclos nas primeiras reações para 40 ciclos nas *nested*.

As reações de PCR utilizaram as seguintes concentrações de reagentes: 50 mM de MgCl₂, 10 µM de cada primer e 0.5 U de *Taq* polimerase com 5 µL de gDNA nas primeiras reações. Do produto da primeira reação de PCR foi usado 1 µL para a segunda reação (*nested* PCR). As respectivas PCRs foram realizadas separadamente em volumes finais de 25 µl com as mesmas proporções de reagentes das reações iniciais de PCR.

Todas as reações foram realizadas utilizando controles positivos (obtidos de amostras positivas de outros estudos do grupo) e negativos (amostra livre de DNA: H₂O ultrapura).

Os produtos obtidos na reação de *nested* PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. A corrida eletroforética foi efetuada juntamente com um marcador molecular (1 Kb Plus DNA Ladder™ Invitrogen) por 40 minutos a 90V. As bandas foram marcadas com GelRed™ (Biotium) e observadas em transiluminador UV. Amostras com bandas de aproximadamente 1 kb foram consideradas positivas para presença de hemosporídeos.

As amostras positivas que amplificaram o gene *cytb* foram submetidas a reações de PCR para a amplificação de outros genes (*col*, *clpC*, *ef2* e *asl*). Em seguida foram submetidas à corrida eletroforética, as amostras que apresentaram banda de aproximadamente 240 a 600 pb foram consideradas positivas de acordo com o tamanho do fragmento do gene alvo correspondente.

1.9 Sequenciamento e análise das sequências

Os produtos de *nested* PCR foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Para a obtenção da sequência de aproximadamente 1100 pb (*cytb*), além dos *primers* utilizados na *nested* PCR (DW1 e DW6), foram utilizados dois *primers* internos: **DW3** e **DW8** (PERKINS; SCHALL, 2002) conforme **Figura 6**.

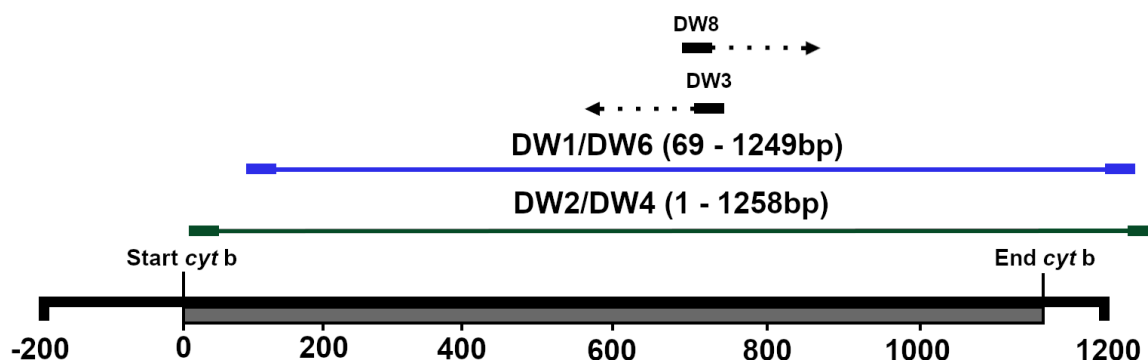


Figura 6. Representação esquemática dos fragmentos amplificados para o gene *cyt b* utilizando diferentes pares de primers. Os oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento (**DW8** e **DW3**) também são mostrados.

Para os demais genes, os mesmos *primers* da *nested* PCR (**Tabela 2**) foram utilizados nas reações de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando do seguinte protocolo: 0,5 μ L de primer (mesmo utilizado na *nested* PCR), 2 μ L de “BigDye”, 1,0 μ L de Sequencing Buffer 5X, 5,5 μ L de água ultrapura e 1 μ L do produto de PCR. A reação foi submetida a um ciclo inicial de 1 minuto a 96°C, 30 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C. A reação de sequenciamento foi analisada em equipamento multiusuário ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser (ABI, USA) disponível no IMT/USP.

Ambas as fitas foram sequenciadas e as sequências foram corrigidas e alinhadas no programa SeqMan (DNASTAR Lasergene versão 7.0.0) para obtenção da sequência consenso. Para identificar as espécies encontradas e suas relações filogenéticas, as sequências foram alinhadas com sequências do GenBank® usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

A análise filogenética das sequências encontradas foi realizada através do uso de sequências do banco de dados GenBank® após alinhamento usando Clustal implantado no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018). A inferência bayesiana foi implementada com o software MrBayes versão 3.2.0 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Duas cadeias de Markov foram corridas com cinco milhões de gerações (*cyt b*) ou três milhões (*clpC*), com cada amostragem de 1 de 300 árvores.

As 25% primeiras árvores foram descartadas como “*burn-in*” e as árvores restantes foram usadas para calcular as probabilidades posteriores. As árvores que apresentaram similaridade maior que 50% foram utilizadas pelo programa para calcular e gerar a árvore consenso. As árvores obtidas em todas as análises foram visualizadas e editadas pelo programa FigTree v. 1.4.0 (RAMBAUT, 2010). Os números de acesso das sequências utilizadas são mostrados nas árvores filogenéticas. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank®.

1.10 PCR para amplificação do gene *cytb* do hospedeiro.

As amostras positivas foram processadas usando um protocolo de PCR que amplifica o DNA do hospedeiro com os *primers* **L14841** (5'-AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') e **H15149** (5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATA ATT TTT GTC CTC A-3') que foram projetados para amplificar fragmentos com ~390 pb do gene mitocondrial *cytb* de uma ampla gama de animais, incluindo mamíferos, aves, anfíbios, répteis e peixes (KOCHER *et al.*, 1989). Os fragmentos amplificados foram sequenciados diretamente usando os primers correspondentes. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank® (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). O algoritmo de melhor similaridade aproximada (BCM, *Best Close Match*) foi usado para identificar as melhores correspondências de *barcode* (código de barras) de uma consulta, e o nome da espécie desse *barcode* foi atribuído à consulta se o *barcode* foi suficientemente semelhante (MEIER *et al.*, 2006). A identificação positiva e a atribuição da espécie hospedeira foram feitas quando as sequências apresentaram uma similaridade >97%.

Alternativamente, para alguns espécimes, um fragmento com ~650 pb do gene mitocondrial citocromo c oxidase (*coi*) foi amplificado por dois métodos: (I) usando os primers **VF1_t1** (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG G-3') (IVANOVA; DEWAARD; HEBERT, 2006) e **VR1_t1** (5'-AGG AAA CAG CTA TGA CTA GAC TTC TGG GTG GCC AAA GAA TCA-3') (WARD *et al.*, 2005) com condições de PCR e ciclagem de Kumar *et al.* (KUMAR; SHARMA; SHARMA, 2017), e (II) utilizando os primers universais **LCO 1490** e **HCO 2198** (FOLMER *et al.*, 1994) e protocolo de PCR baseado em Ruiz *et al.* (RUIZ *et al.*, 2010).

1.11 Aspectos éticos

Todas as amostras foram coletadas e manuseadas sob licenças apropriadas no Brasil. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA SUCEN sob o número de aprovação 0009 e data de aprovação 30/09/2021. O projeto possui autorizações do SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) do ICMBio/ MMA (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ Ministério do Meio Ambiente) sob n^{os} 72790, 51714-1 e 19037-1.

RESULTADOS

1.12 Primeira detecção molecular de *Polychromophilus* e Haemoproteidae em espécies de morcegos brasileiros

Este estudo detectou seis amostras positivas para *Polychromophilus* sp. (IDs das amostras: 116, 198, 335, 607, 650 e 69642), confirmando a presença de parasitas desse gênero em morcegos brasileiros. A porcentagem de positivos foi de 1,1% (6/531) do número total de amostras analisadas.

Através da amplificação e sequenciamento dos genes *cytb* e *coi* tendo como alvo o DNA do hospedeiro foi possível identificar as espécies hospedeiras das amostras positivas: *Myotis ruber* (116), *Myotis riparius* (198, 335, 607 e 69642) e *Eptesicus diminutus* (650), todos morcegos pertencentes à família Vespertilionidae, coletados em cinco municípios do Estado do Paraná (Araucária, Cruz Machado, Curitiba, São José dos Pinhais e Pato Branco) (**Figura 7**).

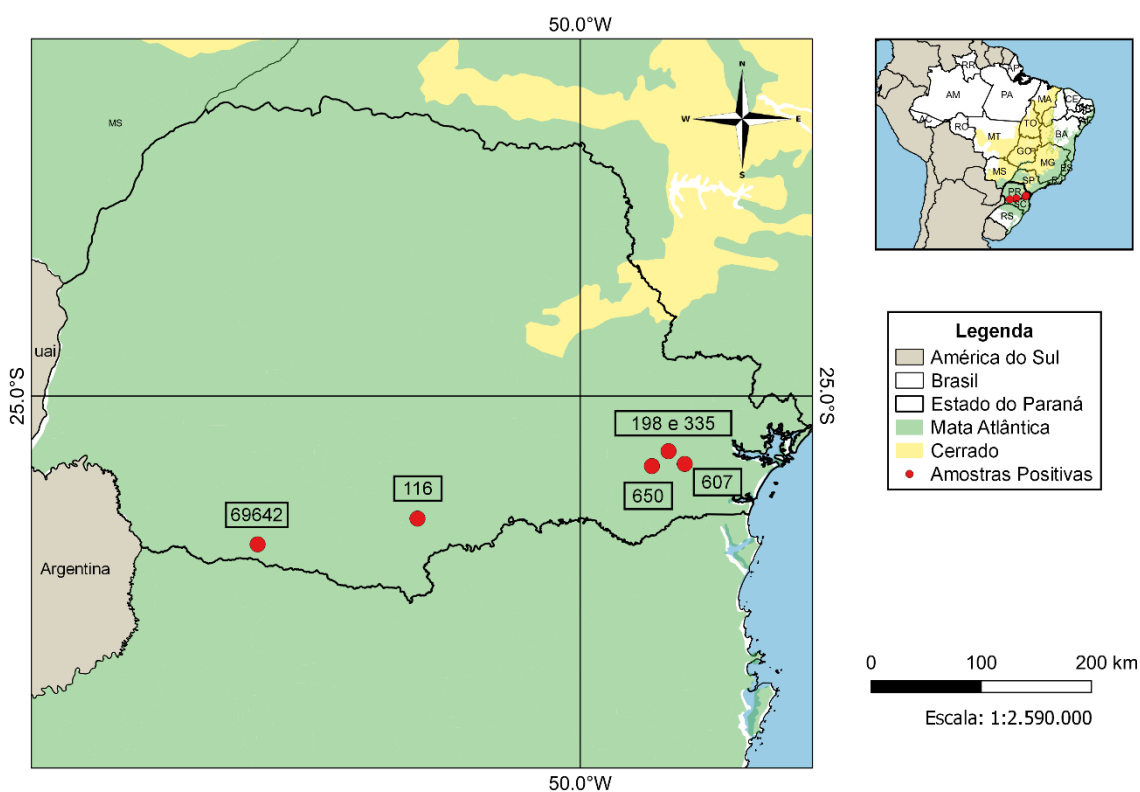


Figura 7. Distribuição das amostras positivas de *Polychromophilus* sp. obtidas no estado do Paraná, Brasil.

Outro importante e inédito resultado obtido foi o registro inesperado de uma sequência de Haemoproteidae sp. (ID da amostra: Bat17) de nova linhagem, confirmando também a presença deste gênero em morcegos brasileiros.

Através da amplificação e sequenciamento dos genes *cytb* e *coi* tendo como alvo o DNA do hospedeiro foi possível confirmar a espécie hospedeira da amostra positiva (Bat17) como sendo *Noctilio albiventris*. Essa espécie de morcego pertence à família Noctilionidae e o espécime foi coletado no pantanal mato-grossense em área rural do município de Poconé - MT (**Figura 8**).

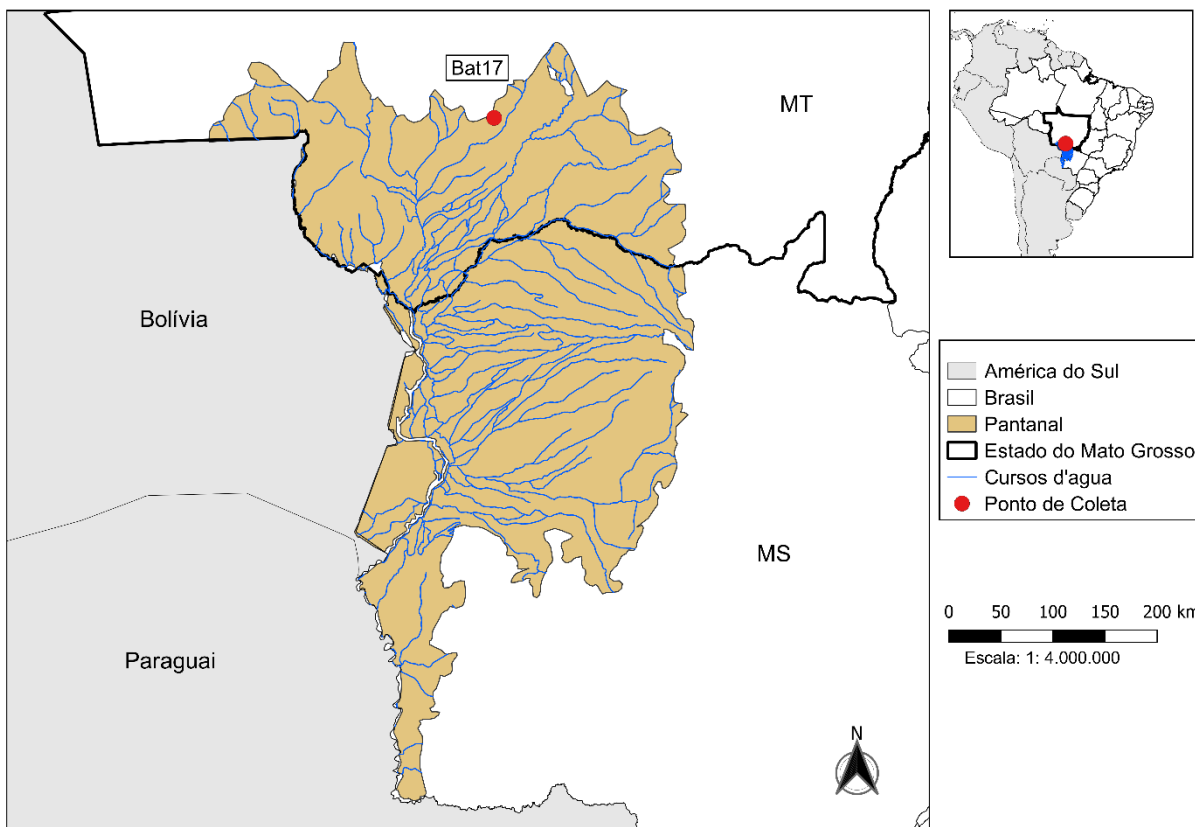


Figura 8. Ponto de coleta de amostra positiva para Haemoproteidae sp. proveniente do estado do Mato Grosso, Brasil.

O polimorfismo das sequências mitocondriais de *cytb* (1116 pb) de *Polychromophilus* sp. obtidas de morcegos brasileiros em comparação com a sequência de maior similaridade do GenBank® (LN483038 de *Myotis nigricans* do Panamá com 595 pb) é mostrado na Tabela 2. Catorze sítios foram polimórficos entre as sequências brasileiras (**Tabela 3**). A sequência proveniente do Panamá, a única disponível obtida de morcegos do continente americano, apresentou duas substituições de nucleotídeos que foram encontradas apenas nesta sequência (colunas cinza) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Polimorfismo de nucleotídeos em sequências do gene mitocondrial do citocromo b (*cytb*) de *Polychromophilus* sp. (116, 198, 335, 607, 650 e 69642) obtidas em morcegos do Brasil e Panamá (MYOPA01).

Amostra	219	247	261	273	334	339	405	512	789	792	810	811	853	885	945	1086
116	C	T	A	T	T	T	T	T	T	C	C	T	C	A	T	A
198	C	T	A	T	T	G	T	T	T	T	C	T	C	A	T	G
335	C	T	A	T	T	G	T	T	T	T	C	T	C	A	T	G
607	C	T	A	T	C	T	T	T	T	C	C	T	C	A	T	A
650	T	T	C	A	T	A	C	T	C	T	T	C	T	T	T	A
69642	C	T	A	T	T	T	T	T	T	C	C	T	C	A	C	A
MYOPA01	C	C	A	T	T	T	T	G								

MYOPA01 possui 595 pb e, portanto, não houve sobreposição dos nucleotídeos de 789-1086 com as sequências brasileiras (1116 pb). As colunas cinza mostram duas substituições de nucleotídeos encontradas apenas nesta sequência.

A sequência obtida do morcego 650 foi a mais divergente, com 98-99% de identidade com as demais (com 11 ou 12 substituições de nucleotídeos) (**Tabela 4**). A sequência panamenha apresentou de três a oito substituições de nucleotídeos em relação às sequências brasileiras (98–99% de identidade) (**Tabela 4**).

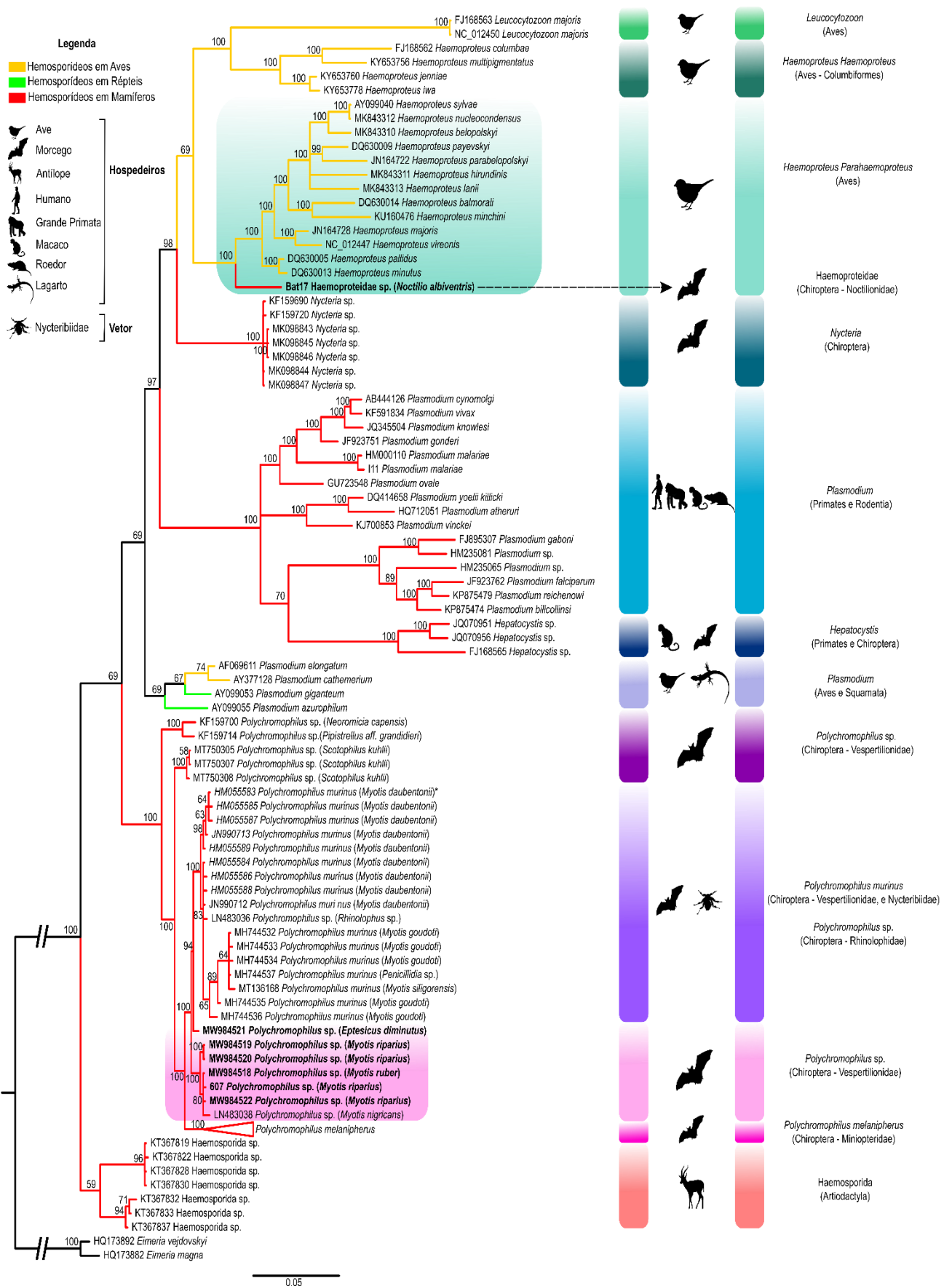
Tabela 4. Porcentagem de similaridade entre as sequências do gene mitocondrial do citocromo b (*cytb*) de *Polychromophilus* sp. encontrado em diferentes morcegos do Brasil e Panamá (MYOPA01).

	Espécies de morcegos	116	198	335	607	650	69642	MYOPA01
116	<i>Myotis ruber</i>	1116	99%	99%	99%	99%	99%	99%
198	<i>Myotis riparius</i>	1113	1116	100%	99%	99%	99%	99%
335	<i>Myotis riparius</i>	1113	1116	1116	99%	99%	99%	99%
607	<i>Myotis riparius</i>	1115	1112	1112	1116	99%	99%	99%
650	<i>Eptesicus diminutus</i>	1105	1105	1105	1104	1116	98%	98%
69642	<i>Myotis riparius</i>	1115	1112	1112	1114	1104	1116	99%
MYOPA01	<i>Myotis nigricans</i>	592	591	591	591	587	592	595

A sequência obtida do gene *cytb* com alvo no parasita da amostra Bat17 mostrou 94% identidade com a sequência KY653763, a mais próxima disponível no Genbank®, obtida de *Haemoproteus minutus*, infectando *Turdus merula*, um passeriforme coletado na Lituânia.

A árvore filogenética (**Figura 9**) do gene *cytb* foi gerada com sequências de referência encontradas no banco de dados Genbank®, abrangendo diferentes gêneros de hemosporídeos obtidos de diferentes hospedeiros (**Apêndice A**). As sequências de *Polychromophilus* encontradas neste estudo (**Apêndice C**) e todas as sequências do gênero disponíveis no banco de dados Genbank® foram incluídas. A sequência de Haemoproteidae encontrada neste estudo também foi adicionada juntamente com sequências referências para o gênero. O clado do gênero *Polychromophilus* é mostrado em evidência assim como o de *Haemoproteus*.

Figura 9 - (próxima página). Filogenia Bayesiana baseada no gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) das sequências de *Polychromophilus* spp. e Haemoproteidae sp. detectadas no presente estudo (**Apêndice C**) e sequências de referência listadas no **Apêndice A**, totalizando 162 sequências em alinhamento de 1122 bp. *A sequência HM055583 também foi relatada em *P. murinus* de *Eptesicus serotinus*, *Nyctalus noctula* e *Myotis Myotis* (**Apêndice A**). *Eimeria* spp. foram usados como um grupo externo. Os valores de suporte dos nós (em porcentagem) indicam probabilidades posteriores. Os ramos vermelhos destacam as sequências de hemosporídeos encontradas em mamíferos. Os ramos amarelos destacam as sequências de hemosporídeos encontradas nas aves. Os ramos verdes destacam as sequências de hemosporídeos encontradas em répteis. As sequências encontradas no presente estudo estão destacadas em negrito. As sequências de referência das espécies de *Polychromophilus melanipherus* foram colapsadas para destacar apenas sua posição no ramo do gênero e separação consolidada entre elas e as sequências de *Polychromophilus* do tipo *P. murinus*. A amostra positiva para Haemoproteidae está destacada no clado de *Haemoproteus* que parasita aves, sinalizado como morcego sendo seu hospedeiro.



A análise filogenética baseada em *cytb* não produziu conflito em nenhum dos nós principais. Todos os principais gêneros e subgêneros foram recuperados e representados na árvore filogenética por clados monofiléticos separados. Os resultados mostram a existência de seis clados dentro da ordem Haemosporida aqui analisada.

Todas as sequências de *Polychromophilus* de morcegos de diferentes partes do mundo foram agrupadas em um clado monofilético (probabilidade posterior de 100) composto por cinco subclados, com todos os *Polychromophilus* encontrados em morcegos brasileiros segregados em apenas um deles. O primeiro subclado distinto compreendeu duas amostras de parasitas de *Pipistrellus aff. grandidieri* e *Neoromicia capensis* da Guiné (KF159700 e KF159714). O outro subclado que foi separado continha as sequências de *Polychromophilus* de *Scotophilus kuhlii* da Tailândia (MT750305, MT750307 e MT750308). O subclado seguinte foi dividido em dois ramos: um com sequências de *P. murinus* de morcegos na Europa (Suíça, Bulgária), Madagascar e Tailândia, e uma sequência de *Eptesicus diminutus* (650) do Brasil, sendo que em meio a isso uma sequência de *Rhinolophus* sp. (Rinolophidae) se destaca por não fazer parte dos vespertilionídeos mesmo assim a sequência do parasita é agrupada a este clado. O clado seguinte compõe a espécie *M. nigricans* do Panamá e todas as demais sequências brasileiras isoladas do gênero *Myotis*. Este subclado incluiu exclusivamente as sequências de *Polychromophilus* de vespertilionídeos (incluindo os brasileiros), enquanto que todas as sequências de *P. melanipherus* de hospedeiros de morcegos do gênero *Miniopterus* foram separadas distintamente em um subclado, confirmando uma clara separação de parasitas de hospedeiros miniopterídeos e vespertilionídeos.

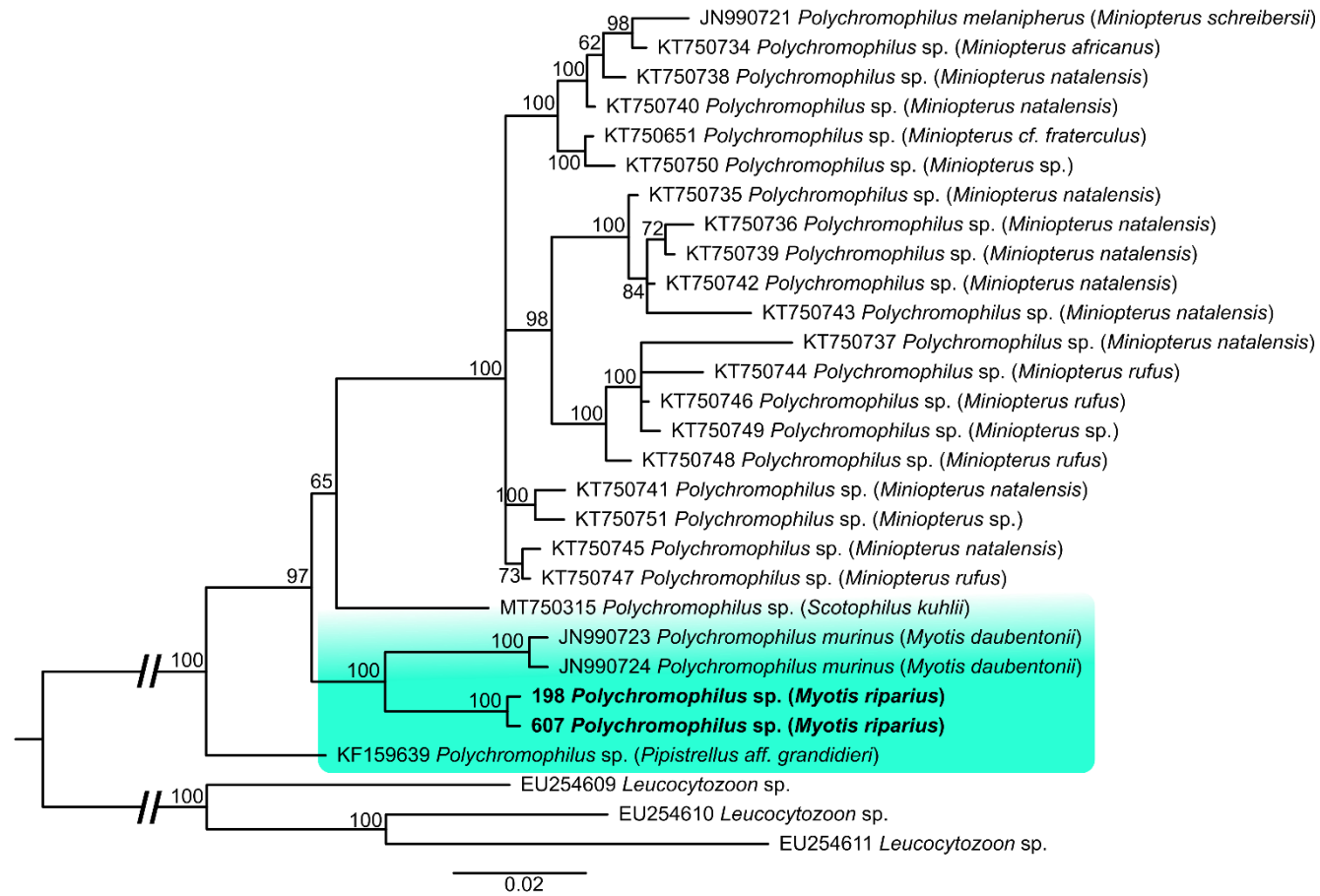
A sequência de *Haemoproteidae* sp. (Bat17) foi agrupada próxima ao subclado de *Leucocytozoon* spp. e *Haemoproteus* *Haemoproteus* spp. (Columbiformes) e ao subclado de *Haemoproteus Parahaemoproteus* spp., gêneros exclusivos de parasitas de aves. Embora na árvore filogenética a sequência obtida em morcego tenha sido agrupada junto a outras de *Haemoproteidae*, a mesma não foi suportada em clado monofilético.

O encontro de *Polychromophilus* foi confirmado com a amplificação do gene *clpc* (*caseinolytic protease C*), do apicoplasto do parasita, em duas amostras (198 e 607), apresentando fragmentos de aproximadamente 500 pb. Em comparação com

sequências de mesmo gene alvo no Genbank® para o gênero *Polychromophilus*, as sequências mostraram semelhanças de 94% com as sequências mais próximas disponíveis (JN990723 e JN990724). Essas sequências são de *P. murinus* descrito em *Myotis daubentonii*, morcego coletado na Suíça (WITSENBURG; SALAMIN; CHRISTE, 2012).

Uma árvore filogenética foi gerada com sequências do gene *clpC* do apicoplasto (**Figura 10**) incluindo sequências de *Polychromophilus* encontradas neste estudo e todas as sequências do gênero disponíveis no banco de dados Genbank® para esse gene (**Apêndice C** e **Apêndice B**). As sequências do gênero *Polychromophilus* encontradas neste estudo são mostradas em negrito. A topologia da árvore de *clpC* foi muito parecida com a de *cytb* para o gênero *Polychromophilus* com todas as sequências de *Polychromophilus* de morcegos de diferentes partes do mundo agrupadas em um clado monofilético (probabilidade posterior de 100). Esse clado também foi composto por quatro subclados, com os dois *Polychromophilus* encontrados em morcegos brasileiros segregados em apenas um deles. O primeiro subclado distinto compreendeu uma amostra de parasita de *Pipistrellus aff. grandidieri*. Outro subclado apresentou a sequência de *Polychromophilus* de *Scotophilus kuhlii* da Tailândia. O subclado de *Polychromophilus* de vespertilionídeos foi dividido em dois ramos: um com sequências de *P. murinus* de morcegos da Suíça e outro com as duas sequências brasileiras. O clado seguinte compõe todas as sequências de *P. melanipherus* de hospedeiros de morcegos do gênero *Miniopterus*, confirmando novamente uma clara separação de parasitas de hospedeiros miniopterídeos e vespertilionídeos.

Figura 10 - (próxima página). A análise filogenética baseada em *clpC* não produziu conflito em nenhum dos nós principais. Todos os gêneros foram recuperados e representados na árvore filogenética por clados monofiléticos separados. Os resultados destacaram dois clados do gênero *Polychromophilus* bem definidos. A filogenia destacou o primeiro clado de *Polychromophilus melanipherus* parasitando morcegos miniopterídeos na África, Ásia e Europa. O segundo clado sustentou *Polychromophilus* spp. de morcego vespertilionídeos (MT50315) segregado dos demais, seguido de *P. murinus* de *Myotis daubentonii* e as duas sequências de morcegos brasileiros separadas em um subclado, agrupando novamente o gênero *Myotis* separado dos demais gêneros de morcegos. Por fim, um isolado de *Polychromophilus* sp. de morcego da espécie *Pipistrellus aff. grandidieri* separado em um clado segregado dos demais. Foi observada novamente a distinção em subclados separados entre os parasitas de hospedeiros miniopterídeos e vespertilionídeos, assim como no gene mitocondrial *cytb*.



Polychromophilus melanipherus
Polychromophilus sp.
 (Chiroptera - Miniopteridae)



Polychromophilus murinus
Polychromophilus sp.
 (Chiroptera - Vespertilionidae)



1.13 Multigenes para detecção de hemosporídeos em morcegos

Foram padronizados cinco protocolos diferentes de PCR na tentativa de amplificar cinco genes localizados nos três genomas do parasita: dois genes mitocondriais (citocromo b, *cytb*, e citocromo c oxidase I, *coI*); um de apicoplasto (protease caseinolítica C, *clpC*); e dois genes nucleares (fator de alongamento 2, *ef2*, e adenilosuccinato liase, *asl*). Foram obtidas nove novas sequências de hemosporídeos em morcegos: sete para o gene *cytb* e duas para *clpC*. Os demais protocolos não amplificaram nenhum fragmento compatível com hemosporídeos em morcegos, embora tenham sido obtidos fragmentos específicos e devidamente sequenciados dos controles utilizados, o que demonstra efetividade da reação.

1.14 Análise microscópica para detecção de hemosporídeos em quirópteros

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados para análise microscópica em apenas quatro amostras. Todas são provenientes de *Artibeus lituratus* do Rio de Janeiro e nenhuma apresentou formas parasitárias compatíveis com hemosporídeos.

DISCUSSÃO

Com base nos resultados aqui apresentados, embora o número total de famílias de morcegos testadas seja desconhecido, a infecção por *Polychromophilus* em morcegos brasileiros parece estar limitada a apenas uma família (Vespertilionidae). Este achado está de acordo com o único relato anterior de *Polychromophilus* do Brasil, descrito como *P. deanei*, encontrado em *Myotis nigricans*, também um morcego Vespertilionidae (GARNHAM; LAINSON; SHAW, 1970; GARNHAM; LAINSON; SHAW, 1971).

De acordo com um estudo anterior, o estado do Paraná possui fauna pobre em relação ao número de espécies de morcegos, com apenas 53 espécies de cinco famílias registradas (MIRETZKI, 2003). A família Phyllostomidae possui a maior riqueza de espécies (25; 47% do total), seguida por Molossidae (13; 24%), Vespertilionidae (12; 22%), Noctilionidae (2; 4%) e Emballonuridae (1; 2,5%) (MIRETZKI, 2003). Miretzki também mostrou a ocorrência de apenas 55% das espécies do bioma Mata Atlântica e a relativa predominância de vespertilionídeos e molossídeos sobre filostomídeos. Aqui, analisamos amostras obtidas em grande parte da área do estado, com grandes oportunidades de amostragem para outras famílias. No entanto, não conseguimos encontrar *Polychromophilus* em espécies de morcegos que não fossem vespertilionídeos, sugerindo que este parasito pode estar restrito a este grupo de morcegos no Brasil.

Em relação à frequência de *Polychromophilus*, encontramos a menor taxa de positividade relatada até o momento, embora o número total de amostras aqui analisadas seja um dos maiores entre os estudos publicados (**Tabela 5**). Isso pode estar relacionado ao tipo de amostra analisada neste estudo. Esta foi a primeira vez que o DNA de *Polychromophilus* foi obtido de tecido cerebral, provavelmente de parasitas nos vasos sanguíneos que irrigam o órgão. Assim, a comparação direta dos dados de prevalência com estudos publicados que utilizaram amostras de sangue fica prejudicada.

Tabela 5. Ocorrência de *Polychromophilus* detectada neste estudo e em estudos anteriores ao redor do mundo.

País ou continente	Amostras analisadas	Amostras Positivas (Positividade)	Espécies de hospedeiros positivos	Referência
África ¹	505	56 (11%)	<i>Miniopterus africanus</i> , <i>M. fraterculus</i> , <i>M. minor</i> , <i>M. natalensis</i> , <i>M. rufus</i> , <i>Myotis tricolor</i>	Lutz <i>et al.</i> , 2016
Austrália ²	85	47 (55%)	<i>Miniopterus orianae</i>	Holz <i>et al.</i> , 2019
Brasil ³	531	6 (1.1%)	<i>Eptesicus diminutus</i> , <i>Myotis ruber</i> , <i>Myotis riparius</i>	Este estudo
Europa ⁴	310	231 (74.5%)	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Witsenburg <i>et al.</i> , 2015
Gabão	164	5 (3%)	<i>Miniopterus inflatus</i>	Duval <i>et al.</i> , 2012
Gabão	92	2 (2%)	<i>Miniopterus minor</i>	Roskopf <i>et al.</i> , 2019
Guiné	274	5 (2%)	<i>Miniopterus villiersi</i> , <i>Neoromicia capensis</i> , <i>Pipistrellus aff. Grandidieri</i>	Schaer <i>et al.</i> , 2013
Madagascar	947	130 (13.5%)	<i>Paratriaenops furculus</i> , <i>Miniopterus aelleni</i> , <i>M. manavi</i> , <i>M. gleni</i> , <i>M. grifthsii</i> , <i>M. griveaudi</i> , <i>M. mahafaliensis</i> , <i>M. majori</i> , <i>M. sororculus</i> , <i>Myotis goudoti</i>	Ramasindrazana <i>et al.</i> , 2018
Madagascar	222	27 (12.2%)	<i>Miniopterus egeri</i> , <i>M. griveaudi</i> , <i>M. ambohitrensis</i> , <i>M. gleni</i> , <i>Scotophilus robustus</i> , <i>Myotis goudoti</i>	Rasoanoro <i>et al.</i> , 2021
Suíça	207	70 (34%)	<i>Myotis daubentonii</i> , <i>M. myotis</i> , <i>Nyctalus noctula</i> , <i>Eptesicus serotinus</i>	Megali <i>et al.</i> , 2011
Tailândia	44	5 (11%)	<i>Scotophilus kuhlii</i>	Chumnandee <i>et al.</i> , 2021
Tailândia	271	13 (4.8%)	<i>Myotis siligorensis</i> , <i>Taphozous melanopogon</i>	Arnuphappasert <i>et al.</i> , 2020

¹Quênia, Malawi, Moçambique, Tanzânia e Uganda. ²A detecção de hemossporídeos foi realizada por microscopia no total de amostras (274), mas a análise molecular foi realizada em apenas parte delas (85 amostras). ³A detecção de *Polychromophilus* foi realizada em amostras de tecido cerebral. ⁴Croácia, Portugal, Espanha, Suíça, Itália, Eslováquia e França.

Cabe ressaltar que os morcegos que foram negativos para a presença de formas parasitárias em lâminas de esfregaços sanguíneos e exames moleculares podem ter apresentado fase crônica de infecção. Nessa fase, a baixa parasitemia diminui a possibilidade de encontro de parasitas no sangue (VALKIŪNAS, 2005). Ainda, é possível que morcegos que por ventura desenvolvam forma aguda da infecção não sobrevivam a ponto de serem coletados.

Três diferentes espécies de morcegos brasileiros foram positivas para *Polychromophilus* sp.: duas espécies do gênero *Myotis* (*M. ruber* e *M. riparius*) e uma espécie do gênero *Eptesicus* (*E. diminutus*). Existem relatos de infecções por espécies de *Myotis* na África (*M. tricolor* no Quênia e *M. goudoti* em Madagascar) (LUTZ *et al.*, 2016; RAMASINDRAZANA *et al.*, 2018; RASOANORO *et al.*, 2021), Europa (*M. daubentonii* e *M. myotis* na Suíça) (MEGALI; YANNIC; CHRISTE, 2011) e Ásia (*M. siligorensis* na Tailândia) (ARNUPHAPPRASERT *et al.*, 2020). No entanto, o único registro de infecção por *Polychromophilus* em *Eptesicus* vem da Europa (*E. serotinus* na Suíça) (MEGALI; YANNIC; CHRISTE, 2011).

Nossos resultados são suportados pela relação parasita-vetor-hospedeiro descrita em outros estudos. Reis e colaboradores relatam a presença de ectoparasitas dípteros nictერიბიდეოს do gênero *Basilía* em morcegos dos gêneros *Myotis* e *Eptesicus* (REIS *et al.*, 2017). Sabe-se que moscas do gênero *Basilía* são possíveis vetores de *Polychromophilus* (RAMASINDRAZANA *et al.*, 2018). Forattini ressalta que vetores dípteros se proliferam em ambientes úmidos, e o bioma de Mata Atlântica proporciona todas as opções de nicho para o desenvolvimento desses insetos (FORATTINI, 2002). Uma análise de ectoparasitas de morcegos brasileiros para a presença de *Polychromophilus* faz-se necessária para confirmar essa interação.

A espécie *Myotis riparius* está presente em diversos países como Honduras, Uruguai, Bolívia, Argentina, Paraguai, Trinidad e Brasil (REIS, 2007), incluindo o estado do Paraná (SEKIAMA *et al.*, 2001; MIRETZKI, 2003; BIANCONI; MIKICH; PEDRO, 2004). *Myotis ruber* é uma espécie ameaçada de extinção na categoria de “vulnerável” de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (MACHADO;

MARTINS; DRUMMOND, 2005), e na categoria de “quase ameaçada” em nível global de acordo com a IUCN (IUCN, 2021). Está distribuído na Argentina, Paraguai (BARQUEZ; MARES; BRAUN, 1999; LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2001; ACHAVAL; CLARA; OLMOS, 2004; REIS *et al.*, 2017) nos estados da Bahia e Pernambuco, além das regiões Sudeste e Sul do Brasil (DE MORAES WEBER; TERRIBILE; CACERES, 2010; REIS *et al.*, 2017).

É importante salientar que em nossa identificação molecular da espécie hospedeira usando *cytb* e comparações de sequências, *Eptesicus furinalis* foi a espécie com melhor correspondência com a sequência obtida do morcego 650. No entanto, a porcentagem de identidade foi baixa (89%) em comparação com as sequências disponíveis no banco de dados do GenBank®, impossibilitando a identificação da espécie. Assim, alternativamente, usamos o gene *coi* e o banco de dados BOLD (<https://www.boldsystems.org/>), encontrando 98% de identidade com uma sequência de *Eptesicus diminutus*, um valor confiável para a identificação da espécie pelo método BCM. *Eptesicus diminutus* tem distribuição nas regiões norte e leste do estado do Paraná (MIRETZKI, 2003), é da família Vespertilionidae e está ausente do banco de dados GenBank®, o que explica o primeiro achado. Sendo assim, consideramos o espécime 650 como sendo *Eptesicus diminutus*.

Nossa análise filogenética também mostrou um clado fortemente definido representado por *Plasmodium* infectando roedores e primatas, que também incluiu o gênero *Hepaticystis* isolado de morcegos. Dados semelhantes foram obtidos por outros autores (MEGALI; YANNIC; CHRISTE, 2011; THURBER *et al.*, 2013). As espécies de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (hemosporídeos de aves) foram agrupadas separadamente em clados individuais, como mostrado anteriormente (MARTINSEN; PAPERNA; SCHALL, 2006; JAVANBAKHT *et al.*, 2015).

Em relação às sequências de *Polychromophilus*, uma topologia semelhante na árvore filogenética foi obtida por Chumnandee *et al.* (CHUMNANDEE *et al.*, 2021), onde se agruparam em um clado monofilético com uma clara separação de parasitas de hospedeiros miniopterídeos e vespertilionídeos. Cinco sequências brasileiras de *Polychromophilus* sp. (MW984519, MW984520, MW984522 e 607 obtidas em *Myotis riparius* e

MW984518 obtida em *Myotis ruber*) foram posicionadas próximas à sequência de *Polychromophilus* sp. de morcegos da espécie *Myotis nigricans*, família Vespertilionidae, da América Latina (Panamá) (LN483038) (BORNER *et al.*, 2016). Uma sequência brasileira de *Polychromophilus* (MW984521 obtida em *Eptesicus diminutus*) foi agrupada com todas as sequências de *P. murinus* em um clado irmão. Esta última, provavelmente *P. murinus*, apresentou 1% de divergência na sequência *cytb* em relação às demais sequências brasileiras ou panamenha, e foi obtida de um gênero diferente de morcegos. Sendo assim, existe a possibilidade das sequências brasileiras representarem mais de uma espécie de *Polychromophilus*, o que requer uma investigação futura. Da mesma forma, é necessária a análise de outras sequências brasileiras de *Polychromophilus* para verificar se o nucleotídeo T nas posições 247 e 512 do gene *cytb* pode ser considerado um marcador molecular para sequências brasileiras, visto que a sequência proveniente do Panamá, a única disponível obtida de morcegos do continente americano, apresentou substituições de nucleotídeos nessas posições.

A detecção inesperada de um Haemoproteidae em *Noctilio albiventris* família Noctilionidae, serviu como evidencia única para a presença desses parasitas nessa família, e demais famílias de morcegos brasileiros, assim como outros países. Sabe-se que parasitas da família Haemoproteidae parasitam aves e répteis, sendo *Haemoproteus Haemoproteus* spp e *H. Parahaemoproteus* spp parasitas de Columbiformes e outras ordens de aves, respectivamente (VALKIŪNAS, 2005; LAINSON, 2012). Entretanto, em Haemoproteidae também se agrupam hemosporídeos exclusivos de morcegos dos gêneros *Johnspretia* e *Sprattiella*, descritos na Austrália em megamorcegos yinpteroquirópteros da espécie *Pteropus alecto* (LANDAU *et al.*, 2012; LANDAU; CHAVATTE; BEVERIDGE, 2012). Esses estudos da Austrália mostram situações bem pontuais de adaptação de hospedeiro pelo parasita, como pode estar ocorrendo em *Noctilio albiventris*. Ainda, por não existirem sequências desses dois gêneros de hemosporídeos para comparação, abre-se a possibilidade da sequência obtida pertencer a um deles.

Por outro lado, a relação entre os vetores e parasitas hemosporídeos também deve ser levada em consideração, devido à capacidade do vetor de

escolher hospedeiros de acordo com a disponibilidade no ambiente (FORATTINI, 2002), levantando a possibilidade de uma infecção acidental e possivelmente abortiva. Visto que esfregaços sanguíneos não foram confeccionados para a amostra de *Noctilio albiventris*, parasitas não puderam ser confirmados por microscopia no sangue do morcego, podendo indicar que esses parasitas não apresentariam capacidade de evolução necessária para completar seu ciclo de vida nesta espécie hospedeira devido ao desenvolvimento abortivo em hospedeiros não adaptados (VALKIŪNAS *et al.*, 2014). No desenvolvimento abortivo, apenas os estágios teciduais se desenvolvem e os merozoítos ou remanescentes dos estágios teciduais aparecem na circulação sendo possível a amplificação por PCR (SZYMANSKI; LOVETTE, 2005; VALKIŪNAS *et al.*, 2014). Seria necessária a observação de esfregaços sanguíneos para verificar essa hipótese.

O morcego *Noctilio albiventris* possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo praticamente por toda a América Latina e quase todo o território brasileiro. Apresenta também dieta insetívora e está sempre relacionado a habitat de florestas úmidas e ambientes próximos a rios, lagoas ou habitat marinho costeiro (REIS *et al.*, 2017). Essa relação de proximidade pode tornar os morcegos dessa espécie mais suscetíveis a doenças parasitárias transmitidas por vetores disponíveis no ambiente. O fato de não ter sido mostrado seu envolvimento com ectoparasitas dípteros (REIS *et al.*, 2017) reforça a possibilidade de transmissão do Haemoproteidae por dípteros ceratopogonídeos do gênero *Culicoides*, conhecidos vetores de *Haemoproteus* (*Parahaemoproteus*) spp em aves, assim como *Hepatocystis* em morcegos (VALKIŪNAS, 2005; MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008).

O presente estudo fornece a primeira descrição molecular de parasitas hemospórideos do gênero *Polychromophilus* em *Myotis ruber*, *Myotis riparius* e *Eptesicus diminutus* do Brasil e confirma sua presença cinquenta anos após seu primeiro e único relato em território brasileiro. Além disso, nossos resultados sugerem a ocorrência de duas linhagens ou mesmo espécies distintas de *Polychromophilus* infectando dois gêneros diferentes de hospedeiros. Nosso estudo também fornece a primeira descrição molecular da presença de

Haemoproteidae em *Noctilio albiventris* no país e o primeiro relato desse parasita infectando a ordem Chiroptera.

Nossos resultados melhoram o conhecimento atual sobre hemoparasitas que infectam morcegos brasileiros. No entanto, é crucial adicionar outros marcadores moleculares à análise filogenética para uma investigação aprofundada (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008). Muitos estudos filogenéticos ainda estão limitados à análise de sequências curtas de citocromo b, sendo a oferta de sequências de outros alvos prejudicada (CHUMNANDEE *et al.*, 2021). Uma análise filogenética de três genomas para filogenias robustas de hemosporídeos foi recomendada (MARTINSEN; PERKINS; SCHALL, 2008) e tentamos incluir nesse estudo. O encontro de *Polychromophilus* e a proximidade genética com *P. murinus* foram confirmados com a amplificação do gene *clpc*, mas novas ferramentas de análise podem auxiliar na identificação desses parasitas em morcegos brasileiros.

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) é uma ferramenta importante para a identificação, caracterização e possível descrição de genomas completos. Além disso, possui vantagens sobre técnicas tradicionalmente usadas como rapidez no processamento, detecção de organismos que não podem ser cultivados em laboratório, além de não requerer conhecimento prévio do organismo analisado. No entanto, o protocolo desta técnica deve ser avaliado de acordo com os objetivos almejados, em virtude dos possíveis custos e análises computacionais intensivas. Ainda, em alguns casos faltam genomas de referência e a eficiência na recuperação de genomas é baixa (TOWNER *et al.*, 2008; RADFORD *et al.*, 2012).

Portanto, estudos adicionais incluindo observações morfológicas desses parasitas combinadas com novos dados moleculares são ainda necessários para resolver sua taxonomia. Adicionalmente, devido às grandes extensões brasileiras e à imensa diversidade de espécies e biomas, novas populações de morcegos devem ser investigadas para fornecer um retrato completo da biologia das interações parasita-hospedeiro.

CONCLUSÕES

- ❖ Utilizando o gene *cytb* como alvo, encontramos 1,1% de positividade para *Polychromophilus*, fornecendo as primeiras informações moleculares desses parasitas em *Myotis riparius*, *Eptesicus diminutus* e *Myotis ruber*, este último uma espécie ameaçada de extinção;
- ❖ Uma sequência de *cytb* de Haemoproteidae sp. foi obtida numa amostra de *Noctilio albiventris* do Pantanal matogrossense;
- ❖ Utilizando o gene *clpC* como alvo, duas sequências de *Polychromophilus* sp. da espécie *Myotis riparius* (ID: 198 e 607) foram obtidos;
- ❖ Os genes *cytb* e *clpC* demonstraram maior eficácia como alvo no diagnóstico de hemosporídeos em morcegos brasileiros em comparação aos demais genes utilizados como alvo neste estudo;
- ❖ O gene *cytb* apresentou o melhor resultado na detecção e identificação de hemosporídeos em morcegos;
- ❖ Os resultados da análise Bayesiana indicam que linhagens ou mesmo espécies distintas de *Polychromophilus* podem estar circulando no país;
- ❖ O encontro de *Polychromophilus* e sua proximidade genética com *P. murinus* foram confirmados com amplificação do gene *clpc* do apicoplasto do parasita;
- ❖ A sequência obtida de Haemoproteidae sp. se mostrou monofilética em comparação às sequências dos parasitas dos demais gêneros da mesma família;

- ❖ Foi descrita a primeira detecção molecular de Haemoproteidae sp. em *Noctilio albiventris* e o primeiro relato desse parasita infectando a ordem Chiroptera;

- ❖ Foram geradas nove novas sequências que foram submetidas ao GenBank, representando as primeiras sequências de *Polychromophilus* brasileiras e a primeira sequência de Haemoproteidae descrita em quirópteros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAVAL, F.; CLARA, M.; OLMOS, A. **Mamíferos de la República Oriental del Uruguay**. 1. ed. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias: Biophoto, 2004(Serie Fauna, no. 2).

ADL, S. M.; LEANDER, B. S.; SIMPSON, A. G. B.; ARCHIBALD, J. M.; ANDERSON, O. Roger.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FARMER, M. A.; KARPOV, S.; KOLISKO, M.; LANE, C. E.; LODGE, D. J.; MANN, D. G.; MEISTERFELD, R.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, Ø.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. **Systematic Biology**, v. 56, n. 4, p. 684–689, 1 ago. 2007. <https://doi.org/10.1080/10635150701494127>.

ALTERS, S.; ALTERS, B. J. **Biology: understanding life**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2006.

ALTRINGHAM, J. D. **Bats: biology and behaviour**. Reprinted. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001.

ARNUPHAPPRASERT, A.; RIANA, E.; NGAMPRASERTWONG, T.; WANGTHONGCHAICHAROEN, M.; SOISOOK, P.; THANEE, S.; BHODHIBUNDIT, P.; KAEWTHAMASORN, M. First molecular investigation of haemosporidian parasites in Thai bat species. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 13, p. 51–61, dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.07.010>.

BARQUEZ, R. M.; MARES, M. A.; BRAUN, J. K. Bats of Argentina. Museum of Texas Tech University. [S. l.: s. n.], 1999. v. 42, p. 1–275.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecology: from individuals to ecosystems**. 4th ed. Malden, MA: Blackwell Pub, 2006.

BIANCONI, G. V.; MIKICH, S. B.; PEDRO, W. A. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 943–954, dez. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000400032>.

BORNER, J.; PICK, C.; THIEDE, J.; KOLAWOLE, O. M.; KINGSLEY, M. T.; SCHULZE, J.; COTTONTAIL, V. M.; WELLINGHAUSEN, N.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; BRUCHHAUS, I.; BURMESTER, T. Phylogeny of haemosporidian blood parasites revealed by a multi-gene approach. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 94, p. 221–231, jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.003>.

BOUNDENGA, L.; NGOUBANGOYE, B.; MOMBO, I. M.; TSOUBMOU, T. A.; RENAUD, F.; ROUGERON, V.; PRUGNOLLE, F. Extensive diversity of malaria parasites circulating in Central African bats and monkeys. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 21, p. 10578–10586, nov. 2018. <https://doi.org/10.1002/ece3.4539>.

BRETT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. D. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, centro-oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 731–770, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000300012>.

CARRENO, R. A.; KISSINGER, J. C.; MCCUTCHAN, T. F.; BARTA, J. R. Phylogenetic analysis of haemosporinid parasites (apicomplexa: Haemosporina) and their coevolution with vectors and intermediate hosts. **Archiv für Protistenkunde**, v. 148, n. 3, p. 245–252, out. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(97\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(97)80005-X).

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 297–357, jan. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1147-3>.

CHUMNANDEE, C.; PHA-OBNGA, N.; WERB, O.; MATUSCHEWSKI, K.; SCHAER, J. Molecular characterization of *Polychromophilus* parasites of *Scotophilus kuhlii* bats in Thailand. **Parasitology**, v. 148, n. 4, p. 495–499, abr. 2021. <https://doi.org/10.1017/S003118202000222X>.

CORRÊA, M. M. de O.; LAZAR, A.; DIAS, D.; BONVICINO, C. R. Quirópteros Hospedeiros de Zoonoses no Brasil. **Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v. 67, p. 23–38, 2013.

CORREIA DOS SANTOS, L.; VIDOTTO, O.; DOS SANTOS, N. J. R.; RIBEIRO, J.; PELLIZZARO, M.; DOS SANTOS, A. P.; HAISI, A.; WISCHRAL JAYME VIEIRA, T. S.; DE BARROS FILHO, I. R.; CUBILLA, M. P.; ARAUJO, J. P.; DA COSTA VIEIRA, R. F.; ULLMANN, L. S.; BIONDO, A. W. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, p. 101416, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101416>.

COX, F. E. G. Systematics of the parasitic Protozoa. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 108, mar. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02196-1](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02196-1).

DE MORAES WEBER, M.; TERRIBILE, L. C.; CACERES, N. C. Potential geographic distribution of *Myotis ruber* (Chiroptera, Vespertilionidae), a threatened Neotropical bat species. **mammalia**, v. 74, n. 3, 1 jan. 2010. DOI 10.1515/mamm.2010.037. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/mamm.2010.037/html>. Acesso em: 18 fev. 2022.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Sobre dois hemocitozoários encontrados em mamíferos silvestres da região amazônica. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 3, p. 107–10, 1961.

DIAS, D.; ESBÉRARD, C. E. L.; MORATELLI, R. A new species of *Lonchophylla* (Chiroptera, Phyllostomidae) from the Atlantic Forest of southeastern Brazil, with

comments on *L. bokermanni*. **Zootaxa**, v. 3722, n. 3, p. 347, 23 out. 2013. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3722.3.4>.

DICK, C. W.; PATTERSON, B. D. Bat flies: Obligate ectoparasites of bats. *In*: MORAND, S.; KRASNOV, B. R.; POULIN, R. (orgs.). **Micromammals and Macroparasites**. Tokyo: Springer Japan, 2006. p. 179–194. DOI 10.1007/978-4-431-36025-4_11. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-36025-4_11. Acesso em: 16 fev. 2022.

EICK, G. N.; JACOBS, D. S.; MATTHEE, C. A. A Nuclear DNA Phylogenetic Perspective on the Evolution of Echolocation and Historical Biogeography of Extant Bats (Chiroptera). **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 9, p. 1869–1886, 1 set. 2005. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi180>.

EJOTRE, I.; REEDER, D. M.; MATUSCHEWSKI, K.; SCHAER, J. Hepatocystis. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 5, p. 456–457, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.07.015>.

EMMONS, L.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. Chicago: University of Chicago Press, 1990.

ESCALANTE, A. A.; AYALA, F. J. Evolutionary origin of Plasmodium and other Apicomplexa based on rRNA genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 13, p. 5793–5797, 20 jun. 1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5793>.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Investigating the role of bats in emerging zoonoses: balancing ecology, conservation and public health interest**. Rome: FAO, 2011(FAO animal production and health, 12).

FENTON, M. B. Bats. New York: Facts On File, 1992. p. 207.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 5, p. 294–299, out. 1994. .

FORATTINI, O. P. **Culicidologia m??dica**. S??o Paulo: Edusp, 2002.

GALEN, S. C.; BORNER, J.; MARTINSEN, E. S.; SCHAER, J.; AUSTIN, C. C.; WEST, C. J.; PERKINS, S. L. The polyphyly of *Plasmodium*: comprehensive phylogenetic analyses of the malaria parasites (order Haemosporida) reveal widespread taxonomic conflict. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 5, p. 171780, maio 2018. <https://doi.org/10.1098/rsos.171780>.

GALINDO-GONZÁLEZ, J. Dispersion de semillas por murcielagos: su importancia en la conservacion y regeneracion del bosque tropical. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*. v. 73, p. 57–74, 1998. <https://doi.org/10.21829/azm.1998.73731727>.

GARDNER, R. A.; MOLYNEUX, D. H. *Polychromophilus murinus*: a malarial parasite of bats: life-history and ultrastructural studies. **Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 591–605, jun. 1988. <https://doi.org/10.1017/S0031182000080215>.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other haemosporidia**. Oxford: Blackwell Scientific, 1966.

GARNHAM, P. C. C.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. A contribution to the study of the haematozoon parasites of bats. A new mammalian haemoproteid, *Polychromophilus deanei* n. sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 69, n. 1, p. 119–125, 1971. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761971000100009>.

GARNHAM, P. C.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. A malaria-like parasite of a bat from Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 1, p. 13, 1970. .

GOULD, S. B.; THAM, W.-H.; COWMAN, A. F.; MCFADDEN, G. I.; WALLER, R. F. Alveolins, a New Family of Cortical Proteins that Define the Protist Infrakingdom Alveolata. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 1219–1230, 14 jan. 2008. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn070>.

GRACIOLLI, G.; AUTINO, A. G.; CLAPS, G. L. Catalogue of American Nycteribiidae (Diptera, Hippoboscoidea). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 2, p. 142–159, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262007000200004>.

GUNNELL, G. F.; SIMMONS, N. B. Fossil Evidence and the Origin of Bats. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 12, n. 1–2, p. 209–246, jun. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10914-005-6945-2>.

HAELEWATERS, D.; DICK, C. W.; COCHERÁN PITTÍ, K. P.; DITTMAR, K.; PATTERSON, B. D. Bats, Bat Flies, and Fungi: Exploring Uncharted Waters. *In*: LIM, B. K.; FENTON, M. B.; BRIGHAM, R. M.; MISTRY, S.; KURTA, A.; GILLAM, E. H.; RUSSELL, A.; ORTEGA, J. (orgs.). **50 Years of Bat Research**. Fascinating Life Sciences. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 349–371. DOI 10.1007/978-3-030-54727-1_21. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-54727-1_21. Acesso em: 16 fev. 2022.

HOLZ, P. H.; LUMSDEN, L. F.; LEGIONE, A. R.; HUFSCHMID, J. *Polychromophilus melanipherus* and haemoplasma infections not associated with clinical signs in southern bent-winged bats (*Miniopterus orianae bassanii*) and eastern bent-winged bats (*Miniopterus orianae oceanensis*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 10–18, abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.11.008>.

HORROCKS, P. Review of “Malaria parasites: comparative genomics, evolution and molecular biology” by Jane M. Carlton, Susan L. Perkins and Kirk W. Deitsch. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 74, 1756-3305-6–74, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-74>.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 1 ago. 2001. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>.

HUTCHEON, J. M.; KIRSCH, J. A. W. A moveable face: deconstructing the Microchiroptera and a new classification of extant bats. **Acta Chiropterologica**, v. 8, n. 1, p. 1–10, abr. 2006. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2006\)8\[1:AMFDTM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2006)8[1:AMFDTM]2.0.CO;2).

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2021. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>.

IVANOVA, N. V.; DEWAARD, J. R.; HEBERT, P. D. N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA: TECHNICAL NOTE. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 998–1002, 7 jul. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>.

JAVANBAKHT, H.; KVIČEROVÁ, J.; DVOŘÁKOVÁ, N.; MIKULÍČEK, P.; SHARIFI, M.; KAUTMAN, M.; MARŠÍKOVÁ, A.; ŠIROKÝ, P. Phylogeny, Diversity, Distribution, and Host Specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palaeartic Tortoises. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 670–678, set. 2015. <https://doi.org/10.1111/jeu.12227>.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 16, p. 6196–6200, 1 ago. 1989. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>.

KOOPMAN, K. F. A synopsis of the families of bats, part VII. **Bat Research News**, n. 25, p. 25–27, 1984. .

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

KUMAR, V.; SHARMA, N.; SHARMA, A. DNA barcoding of the Indian blackbuck (*Antilope cervicapra*) and their correlation with other closely related species. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 7, n. 1, p. 31, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s41935-017-0034-6>.

LAINSON, R. **Atlas of protozoan parasites of the Amazonian fauna of Brazil. Haemosporida of reptiles**. Ananindeua: Centro de Documentação, Informação e Memória, 2012. v. 1, .

LANDAU, I.; BACCAM, D.; RATANAWORABHAN, N.; YENBUTRA, S.; BOULARD, Y.; CHABAUD, A. G. [New Haemoproteidae parasites of Chiroptera in Thailand]. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee**, v. 59, n. 5, p. 437–447, 1984. <https://doi.org/10.1051/parasite/1984595437>.

LANDAU, I.; CHAVATTE, J. M.; BEVERIDGE, I. *Johnsprentia copemani* gen. nov., sp. nov. (Haemoproteidae), a parasite of the flying-fox, *Pteropus alecto* (Pteropidae). *Memoirs of the Queensland Museum - Nature*, v. 56, n. 1, p. 61–66, 2012. <https://doi.org/10.17082/j.2204-1478.56-1.2012.2012-05>.

LANDAU, I.; CHAVATTE, J. M.; KARADJIAN, G.; CHABAUD, A.; BEVERIDGE, I. The haemosporidian parasites of bats with description of *Sprattiella alecto* gen. nov., sp. nov. **Parasite**, v. 19, n. 2, p. 137–146, maio 2012. <https://doi.org/10.1051/parasite/2012192137>.

LANDAU, I.; ROSIN, G.; MILTGEN, F.; HUGOT, J.-P.; LEGER, N.; BEVERIDGE, I.; BACCAM, D. Sur le genre *Polychromophilus*: (Haemoproteidae, parasite de Microchiroptères). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 55, n. 1, p. 13–32, 1980. <https://doi.org/10.1051/parasite/1980551013>.

LANDAU, I.; ROSIN, G.; MILTGEN, F.; LÉGER, N.; MIALHE, E. [The schizogony of *Polychromophilus* (Haemoproteidae), cosmopolitan parasite of Microchiroptera]. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles**, v. 285, n. 15, p. 1311–1313, 28 nov. 1977. .

LÓPEZ-GONZÁLEZ, C.; PRESLEY, S. J.; OWEN, R. D.; WILLIG, M. R. TAXONOMIC STATUS OF *MYOTIS* (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE) IN PARAGUAY. **Journal of Mammalogy**, v. 82, n. 1, p. 138–160, fev. 2001. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082<0138:TSOMCV>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082<0138:TSOMCV>2.0.CO;2).

LUTZ, H. L.; PATTERSON, B. D.; KERBIS PETERHANS, J. C.; STANLEY, W. T.; WEBALA, P. W.; GNOSKE, T. P.; HACKETT, S. J.; STANHOPE, M. J. Diverse sampling of East African haemosporidians reveals chiropteran origin of malaria parasites in primates and rodents. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 99, p. 7–15, jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.03.004>.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, G. M. Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Incluindo a Lista de Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados. Fundação Biodiversitas. Belo Horizonte - Brasil: [s. n.], 2005. p. 158.

MAIZELS, R. M. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. **Journal of Biology**, v. 8, n. 7, p. 62, 2009. <https://doi.org/10.1186/jbiol166>.

MARTINSEN, E. S.; PAPERNA, I.; SCHALL, J. J. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: an exploration of three species concepts. **Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 279–288, set. 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000424>.

MARTINSEN, E. S.; PERKINS, S. L.; SCHALL, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 1, p. 261–273, abr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.012>.

MEGALI, A.; YANNIC, G.; CHRISTE, P. Disease in the dark: molecular characterization of *Polychromophilus murinus* in temperate zone bats revealed a worldwide distribution of this malaria-like disease: BAT MALARIAL PARASITES. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 5, p. 1039–1048, mar. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04905.x>.

MEIER, R.; SHIYANG, K.; VAIDYA, G.; NG, P. K. L. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. **Systematic Biology**, v. 55, n. 5, p. 715–728, 1 out. 2006. <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>.

MERCIER, C.; ADJOGLE, K. D. Z.; DÄUBENER, W.; DELAUW, M.-F.-C. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 829–849, jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.011>.

MIRETZKI, M. Morcegos do Estado do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, v. 43, n. 6, 2003. DOI 10.1590/S0031-10492003000600001. Disponível em: <http://ojps.aip.org/link/?apl/74/2268/ab>. Acesso em: 17 fev. 2022.

MORRISON, D. A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 375–382, ago. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>.

NOGUEIRA, M. R.; DE LIMA, I. P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V. da C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v. 10, n. 4, p. 808–821, set. 2014. <https://doi.org/10.15560/10.4.808>.

NOWAK, R. M.; WALKER, E. P. **Walker's bats of the world**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1994.

PACHECO, S. M.; SODRÉ, M.; GAMA, A. R.; BREDT, A.; SANCHES, E. M. C.; MARQUES, R. V.; GUIMARÃES, M. M.; BIANCONI, G. Morcegos Urbanos: Status do Conhecimento e Plano de Ação para a Conservação no Brasil. **Chiroptera Neotropical**. 1. ed. Porto Alegres - RS: [s. n.], 2010. v. 16, p. 1–19.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, A. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. **Occasional Papers in Conservation Biology**. [S. l.: s. n.], 2012. v. 6, p. 76.

PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; ORTÊNCIOFILHO, H. Ordem Chiroptera. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: [s. n.], 2006. p. 153–230.

PERACCHI, A. L.; NOGUEIRA, M. R.; LIMA, I. P. Novos achegos à lista dos quirópteros do município de Linhares, estado do Espírito Santo, sudeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Chiroptera Neotropical*. v. 1, n. 17, p. 842–852, 2011. .

PERKINS, S. L.; AUSTIN, C. C. Four New Species of Plasmodium from New Guinea Lizards: Integrating Morphology and Molecules. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 424–433, abr. 2009. <https://doi.org/10.1645/GE-1750.1>.

PERKINS, S. L.; SCHAER, J. A Modern Menagerie of Mammalian Malaria. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 772–782, out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.06.001>.

PERKINS, S. L.; SCHALL, JosJ. A MOLECULAR PHYLOGENY OF MALARIAL PARASITES RECOVERED FROM CYTOCHROME *b* GENE SEQUENCES. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 5, p. 972–978, out. 2002. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0972:AMPOMP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0972:AMPOMP]2.0.CO;2).

POULIN, R.; RANDHAWA, H. S. Evolution of parasitism along convergent lines: from ecology to genomics. **Parasitology**, v. 142, n. S1, p. S6–S15, fev. 2015. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001674>.

RADFORD, A. D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A. C.; HALL, N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 9, p. 1853–1868, 1 set. 2012. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043182-0>.

RAMASINDRAZANA, B.; GOODMAN, S. M.; DSOULI, N.; GOMARD, Y.; LAGADEC, E.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; DELLAGI, K.; TORTOSA, P. Polychromophilus spp. (Haemosporida) in Malagasy bats: host specificity and insights on invertebrate vectors. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 318, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2461-8>.

RAMBAUT. **FigTree: Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0**, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Edinburgh, UK: [s. n.], 2010.

RASOANORO, M.; GOODMAN, S. M.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; RAKOTONDRATSIMBA, M.; DELLAGI, K.; TORTOSA, P.; RAMASINDRAZANA, B. Diversity, distribution, and drivers of Polychromophilus infection in Malagasy bats. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 157, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03696-0>.

REIS, N. R. dos. **Morcegos do Brasil**. São Paulo: Unesp; Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2007.

REIS, N. R. **Estudos ecológicos dos quirópteros de matas primárias e capoeiras da região de Manaus, Amazonas**. 1981. 242 f. Tese (Doutorado) – Universidade do Amazonas, INPA, Manaus, 1981.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; BATISTA, C. B.; LIMA, I. P.; PEREIRA, A. D. (Orgs.). **História natural dos morcegos brasileiros: chave de identificação de espécies**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2017.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P. **Morcegos da Bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Eds.). A Bacia do rio Tibagi**. Londrina - PR: [s. n.], 2002.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; SANTOS, G. A. S. D. **Ecologia de morcegos**. Londrina, Paraná: Technical Books Editora : Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2008.

REIS, Nelio R.; FREGONEZI, M. N.; PERACCHI, A. L.; SHIBATTA, O. A. (Orgs.). **Morcegos do Brasil: guia de campo**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2013(Série Manuais & guias TB).

ROSA, A. R.; SODRÉ, M. M.; ROCCO, S. C.; OLIVEIRA, R. C.; SHIMABUKURO, C. E. M. Manual de Manejo e controle de Morcegos urbanos. **Prefeitura de São Paulo - Saúde**. 1. ed. São Paulo: [s. n.], 2017. v. Único, p. 25.

RUGGIERO, M. A.; GORDON, D. P.; ORRELL, T. M.; BAILLY, N.; BOURGOIN, T.; BRUSCA, R. C.; CAVALIER-SMITH, T.; GUIRY, M. D.; KIRK, P. M. A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0119248, 29 abr. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>.

RUIZ, F.; LINTON, Y.-M.; PONSONBY, D. J.; CONN, J. E.; HERRERA, M.; QUIÑONES, M. L.; VÉLEZ, I. D.; WILKERSON, R. C. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 899–903, nov. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700010>.

SCHAER, J.; PERKINS, S. L.; DECHER, J.; LEENDERTZ, F. H.; FAHR, J.; WEBER, N.; MATUSCHEWSKI, K. High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent *Plasmodium* taxa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17415–17419, 22 out. 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311016110>.

SCHAER, J.; MCMICHAEL, L.; GORDON, A. N.; RUSSELL, D.; MATUSCHEWSKI, K.; PERKINS, S. L.; FIELD, H.; POWER, M. Phylogeny of *Hepaticystis* parasites of Australian flying foxes reveals distinct parasite clade. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 7, n. 2, p. 207–212, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.06.001>.

SCHAER, J.; PERKINS, S. L.; EJOTRE, I.; VODZAK, M. E.; MATUSCHEWSKI, K.; REEDER, D. M. Epauletted fruit bats display exceptionally high infections with a *Hepaticystis* species complex in South Sudan. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6928, dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07093-z>.

SCHAER, J.; REEDER, D. M.; VODZAK, M. E.; OLIVAL, K. J.; WEBER, N.; MAYER, F.; MATUSCHEWSKI, K.; PERKINS, S. L. Nycteria parasites of

Afrotropical insectivorous bats. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 6, p. 375–384, maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.01.008>.

SEKIAMA, M. L.; REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ROCHA, V. J. Morcegos do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná (Chiroptera, Mammalia). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 3, p. 749–754, set. 2001. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752001000300011>.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. **Wilson, D. E.; Reeder, D. M. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 312–529.

SPRINGER, M. S. Phylogenetics: Bats United, Microbats Divided. **Current Biology**, v. 23, n. 22, p. R999–R1001, nov. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.053>.

SPRINGER, M. S.; TEELING, E. C.; MADSEN, O.; STANHOPE, M. J.; DE JONG, W. W. Integrated fossil and molecular data reconstruct bat echolocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 11, p. 6241–6246, 22 maio 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551998>.

SZYMANSKI, M. M.; LOVETTE, I. J. HIGH LINEAGE DIVERSITY AND HOST SHARING OF MALARIAL PARASITES IN A LOCAL AVIAN ASSEMBLAGE. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 768–774, ago. 2005. <https://doi.org/10.1645/GE-417R1.1>.

TEELING, E. C.; SPRINGER, M. S.; MADSEN, O.; BATES, P.; O'BRIEN, S. J.; MURPHY, W. J. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. **Science**, v. 307, n. 5709, p. 580–584, 28 jan. 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1105113>.

THURBER, M. I.; GHAI, R. R.; HYEROBA, D.; WENY, G.; TUMUKUNDE, A.; CHAPMAN, C. A.; WISEMAN, R. W.; DINIS, J.; STEEIL, J.; GREINER, E. C.; FRIEDRICH, T. C.; O'CONNOR, D. H.; GOLDBERG, T. L. Co-infection and cross-species transmission of divergent Hepatocystis lineages in a wild African primate community. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 8, p. 613–619, jul. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.03.002>.

TOWNER, J. S.; SEALY, T. K.; KHRISTOVA, M. L.; ALBARIÑO, C. G.; CONLAN, S.; REEDER, S. A.; QUAN, P.-L.; LIPKIN, W. I.; DOWNING, R.; TAPPERO, J. W.; OKWARE, S.; LUTWAMA, J.; BAKAMUTUMAHO, B.; KAYIWA, J.; COMER, J. A.; ROLLIN, P. E.; KSIAZEK, T. G.; NICHOL, S. T. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000212, 21 nov. 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212>.

TRAJANO, E. Ecologia de populações de morcegos cavernícolas em uma região cárstica do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, n. 5, p. 255–320, 1984. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751984000100001>.

TRINDADE, R. L. **Maruins (Diptera : Ceratopogonidae) que atacam o homem no litoral atlântico e estuário do rio Pará, Estado do Pará, Brasil**. 2004. 83 f. Dissertação Mestrado – Universidade Federal do Pará Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2004.

TSAGUE, K. J. A.; BAKWO FILS, E. M.; ATAGANA, J. P.; DONGUE, N. V.; MBENG, D. W.; SCHAER, J.; TCHUINKAM, T. *Hepatocystis* and *Nycteria* (Haemosporida) parasite infections of bats in the Central Region of Cameroon. **Parasitology**, , p. 1–8, 6 set. 2021. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001542>.

VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other haemosporidia**. Boca Raton: CRC Press, 2005.

VALKIŪNAS, G.; ATKINSON, C. T. Introduction to Life Cycles, Taxonomy, Distribution, and Basic Research Techniques. *In*: SANTIAGO-ALARCON, D.; MARZAL, A. (orgs.). **Avian Malaria and Related Parasites in the Tropics**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 45–80. DOI 10.1007/978-3-030-51633-8_2. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-51633-8_2. Acesso em: 26 fev. 2022.

VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; DIMITROV, D.; BERNOTIENĖ, R.; ZEHTINDJIEV, P.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T. A. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. **Parasitology Research**, v. 113, n. 6, p. 2251–2263, jun. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3880-2>.

VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; OBORNÍK, M.; ŠLAPETA, J.; LUKEŠ, J. Apicomplexa. *In*: ARCHIBALD, J. M.; SIMPSON, A. G. B.; SLAMOVITS, C. H. (orgs.). **Handbook of the Protists**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 567–624. DOI 10.1007/978-3-319-28149-0_20. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-28149-0_20. Acesso em: 8 fev. 2022.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 29 out. 2005. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>.

WERNSDORFER, W. H.; MCGREGOR, I. (Orgs.). **Malaria: principles and practice of malariology**. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone, 1988.

WITSENBURG, F.; CLÉMENT, L.; LÓPEZ-BAUCCELLS, A.; PALMEIRIM, J.; PAVLINIĆ, I.; SCARAVELLI, D.; ŠEVČÍK, M.; DUTOIT, L.; SALAMIN, N.; GOUDET, J.; CHRISTE, P. How a haemosporidian parasite of bats gets around: the genetic structure of a parasite, vector and host compared. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 4, p. 926–940, fev. 2015. <https://doi.org/10.1111/mec.13071>.

WITSENBURG, F.; SALAMIN, N.; CHRISTE, P. The evolutionary host switches of *Polychromophilus*: a multi-gene phylogeny of the bat malaria genus suggests

a second invasion of mammals by a haemosporidian parasite. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 53, dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-53>.

YOON, H. S.; GRANT, J.; TEKLE, Y. I.; WU, M.; CHAON, B. C.; COLE, J. C.; LOGSDON, J. M.; PATTERSON, D. J.; BHATTACHARYA, D.; KATZ, L. A. Broadly sampled multigene trees of eukaryotes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 14, dez. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-14>.

Apêndice A. Sequências do gene mitocondrial Citocromo b (*cytb*) utilizadas como referências nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso no GenBank®

Número de Acesso GenBank®	Espécie de Parasita	Hospedeiro
HQ173882	<i>Eimeria magna</i>	Coelho
HQ173892	<i>Eimeria vej dovskyi</i>	Coelho
KT367832, KT367833, KT367822, KT367828	Haemosporida sp.	Antílope
KT367830, KT367819, KT367837	Haemosporida sp.	Antílope
FJ168565	<i>Hepaticystis</i> sp.	Morcego
JQ070951, JQ070956	<i>Hepaticystis</i> sp.	Macaco
AF069611	<i>Plasmodium elongatum</i>	Ave
AY377128	<i>Plasmodium cathemerium</i>	Ave
NC_012450, FJ168563	<i>Leucocytozoon majoris</i>	Ave
FJ168562	<i>Haemoproteus columbae</i>	Ave
KY653756	<i>Haemoproteus multipigmentatus</i>	Ave
KY653760	<i>Haemoproteus jenniae</i>	Ave
KY653778	<i>Haemoproteus iwa</i>	Ave
AY099040	<i>Haemoproteus sylvae</i>	Ave
MK843312	<i>Haemoproteus nucleococondensus</i>	Ave
MK843310	<i>Haemoproteus belopolskyi</i>	Ave
DQ630009	<i>Haemoproteus payevsky</i>	Ave
JN164722	<i>Haemoproteus parabelopolsky</i>	Ave
MK843311	<i>Haemoproteus hirundinis</i>	Ave
MK843313	<i>Haemoproteus lanii</i>	Ave
DQ630014	<i>Haemoproteus balmorali</i>	Ave
KU160476	<i>Haemoproteus minchini</i>	Ave
JN164728	<i>Haemoproteus majoris</i>	Ave
DQ630005	<i>Haemoproteus pallidus</i>	Ave
DQ630013	<i>Haemoproteus minutus</i>	Ave
KF159690, KF159720, MK098843- MK098847	<i>Nycteria</i> sp.	Morcego
NC_012447	<i>Parahaemoproteus vireonis</i>	Ave
HM235081	<i>Plasmodium adleri</i>	Gorila
HQ712051	<i>Plasmodium atheruri</i>	Roedor
AY099055	<i>Plasmodium azurophilum</i>	Lagarto
KP875474	<i>Plasmodium billcollinsi</i>	Chimpanzé
HM235065	<i>Plasmodium blacklocki</i>	Gorila
AB444126	<i>Plasmodium cynomolgi</i>	Macaco
FJ895307	<i>Plasmodium gaboni</i>	Chimpanzé
AY099053	<i>Plasmodium giganteum</i>	Lagarto
JF923751	<i>Plasmodium gonderi</i>	Mandrill
JQ345504	<i>Plasmodium knowlesi</i>	Humano
HM000110	<i>Plasmodium malariae</i>	Chimpanzé

Apêndice A. Sequências do gene mitocondrial Citocromo b (*cytb*) utilizadas como referências nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso no GenBank® (continuação)

Número de Acesso GenBank®	Espécie de Parasita	Hospedeiro
GU723548	<i>Plasmodium ovale</i>	Humano
JF923762	<i>Plasmodium praefalciparum</i>	Macaco
KP875479	<i>Plasmodium reichenowi</i>	Chimpanzé
KJ700853	<i>Plasmodium vinckei</i>	Roedor
KF591834	<i>Plasmodium vivax</i>	Humano
DQ414658	<i>Plasmodium yoelii killicki</i>	Roedor
HM055583	<i>P. murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>
HM055583	<i>P. murinus</i>	<i>Eptesicus serotinus</i>
HM055583	<i>P. murinus</i>	<i>Nyctalus noctula</i>
HM055583	<i>P. murinus</i>	<i>Myotis myotis</i>
HM055584–HM055589	<i>P. murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>
MH744509–MH744511, MH744518, MH744521	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus gleni</i>
MH744506, MH744519	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus griffithsi</i>
MH744514–MH744516	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus griveaudi</i>
MH744508, MH744522–MH744525	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus griveaudi</i>
JQ995284–JQ995288	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Miniopterus inflatus</i>
MH744504, MH744505	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>
MH744512, MH744526	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus manavi</i>
MW007671–MW007674, MW007676	<i>P. melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>
KU182361–KU182367	<i>P. melanipherus</i>	<i>Nycteribia schmidlii scotti</i>
MH744527	<i>P. melanipherus</i>	<i>Nycteribia stylidiopsis</i>
MH744520	<i>P. melanipherus</i>	<i>Paratriaenops furculus</i>
KU182368	<i>P. melanipherus</i>	<i>Penicillidia fúlvida</i>
MH744528–MH744531	<i>P. melanipherus</i>	<i>Penicillidia leptothrinax</i>
MH744537	<i>P. murinus</i>	<i>Penicillidia</i> sp.
KF159714	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Pipistrellus</i> aff. <i>grandidieri</i>
LN483036	<i>P. murinus</i>	<i>Rhinolophus</i> sp.
MT750305, MT750307, MT750308	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Scotophilus kuhlii</i>
MT136167	<i>P. melanipherus</i>	<i>Taphozous melanopogon</i>

Apêndice B. Sequências do gene do apicoplasto protease caseinolítica c (*clpc*) utilizadas como referências nas análises filogenéticas e seus respectivos números de acesso no GenBank®

Número de Acesso GenBank®	Espécie do Parasita	Hospedeiro	Origem	Referência
JN990721	<i>P. melanipherus</i>	<i>Miniopterus schreibersii</i>	Suíça	Witsenburg <i>et al</i> 2012
KT750734	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus africanus</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750738	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750740	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750651	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus cf. fraterculus</i>	Tanzânia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750750	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus sp.</i>	Tanzânia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750735	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750736	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750739	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750742	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750743	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750737	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750744	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus rufus</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750746	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus rufus</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750749	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus sp.</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750748	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus rufus</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750741	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750751	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus sp.</i>	Tanzânia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750745	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus natalensis</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
KT750747	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Miniopterus rufus</i>	Quênia	Lutz <i>et al</i> 2016
MT750315	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Scotophilus kuhlii</i>	Tailândia	Chumnandee <i>et al</i> 2020
JN990723	<i>Polychromophilus murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>	Suíça	Witsenburg <i>et al</i> 2012
JN990724	<i>Polychromophilus murinus</i>	<i>Myotis daubentonii</i>	Suíça	Witsenburg <i>et al</i> 2012
KF159639	<i>Polychromophilus sp.</i>	<i>Pipistrellus aff. grandidieri</i>	Guiné	Schaer <i>et al</i> 2013

Apêndice C. Sequências dos genes Citocromo b (*cytb*) e protease caseinolítica c (*clpC*) encontradas neste estudo e respectivos números de acesso no GenBank®.

Número de Acesso GenBank®	Gene Alvo	Espécie de Parasita	Hospedeiro	Origem
MW984521	<i>cytb</i>	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Eptesicus diminutus</i>	Brasil (este estudo)
MW984519, MW984520, MW984522, 607	<i>cytb</i>	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Myotis riparius</i>	
MW984518	<i>cytb</i>	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Myotis ruber</i>	
Bat17	<i>cytb</i>	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>Noctilio albiventris</i>	
I11	<i>cytb</i>	<i>Plasmodium malariae</i>	<i>Homo sapiens</i>	
198	<i>clpC</i>	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Myotis riparius</i>	
607	<i>clpC</i>	<i>Polychromophilus</i> sp.	<i>Myotis riparius</i>	

Apêndice D. Artigo publicado na revista *Microorganisms* sob o título “First molecular detection of *Polychromophilus* parasites in Brazilian bat species”. MINOZZO et al., 2021.



Article

First Molecular Detection of *Polychromophilus* Parasites in Brazilian Bat Species

Guilherme Augusto Minozzo ^{1,†}, Bruno da Silva Mathias ^{2,†}, Irina Nastassja Riediger ¹, Lilian de Oliveira Guimarães ³, Carolina Clares dos Anjos ², Eliana Ferreira Monteiro ², Andrea Pires dos Santos ⁴, Alexander Welker Biondo ⁵ and Karin Kirchgatter ^{2,3,*}

- ¹ Laboratório Central de Saúde Pública do Paraná, São José dos Pinhais 83060-500, PR, Brazil; guilhermeaminozzo@gmail.com (G.A.M.); irinarieidiger@sesa.pr.gov.br (I.N.R.)
 - ² Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-000, SP, Brazil; brunomathiasbio@gmail.com (B.d.S.M.); carolinaclares@gmail.com (C.C.d.A.); elianafmonteiro@usp.br (E.F.M.)
 - ³ Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo 01027-000b, SP, Brazil; lilianguima@gmail.com
 - ⁴ Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA; santos1@purdue.edu
 - ⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 80035-050, PR, Brazil; abiondo@ufpr.br
- * Correspondence: karink@usp.br
 † These authors contributed equally to this work



Citation: Minozzo, G.A.; da Silva Mathias, B.; Riediger, I.N.; de Oliveira Guimarães, L.; dos Anjos, C.C.; Monteiro, E.E.; dos Santos, A.P.; Biondo, A.W.; Kirchgatter, K. First Molecular Detection of *Polychromophilus* Parasites in Brazilian Bat Species. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1240. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061240>

Academic Editor: Graham H. Mitchell

Received: 22 April 2021

Accepted: 3 June 2021

Published: 7 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Blood parasites of the Haemosporida order, such as the *Plasmodium* spp. responsible for malaria, have become the focus of many studies in evolutionary biology. However, there is a lack of molecular investigation of haemosporidian parasites of wildlife, such as the genus *Polychromophilus*. Species of this neglected genus exclusively have been described in bats, mainly in Europe, Asia, and Africa, but little is known about its presence and genetic diversity on the American continent. Here, we investigated 406 bats from sites inserted in remnant fragments of the Atlantic Forest and Cerrado biomes and urbanized areas from southern Brazil for the presence of *Polychromophilus* species by PCR of the mitochondrial cytochrome b encoding gene. A total of 1.2% of bats was positive for *Polychromophilus*, providing the first molecular information of these parasites in *Myotis riparius* and *Eptesicus diminutus*, common vespertilionid bats widely distributed in different Brazilian biomes, and *Myotis ruber*, an endangered species. A Bayesian analysis was conducted to reconstruct the phylogenetic relationships between *Polychromophilus* recovered from Brazilian bats and those identified elsewhere. Sequences of Brazilian *Polychromophilus* lineages were placed with *P. murinus* and in a clade distinct from *P. mdaniphetus*, mainly restricted to bats in the family Vespertilionidae. However, the sequences were split into two minor clades, according to the genus of hosts, indicating that *P. murinus* and a distinct species may be circulating in Brazil. Morphological observations combined with additional molecular studies are needed to conclude and describe these *Polychromophilus* species.

Keywords: *Polychromophilus*; bats; phylogeny; Brazil

1. Introduction

The phylum Apicomplexa forms one of the most diverse groups of unicellular protists with a wide environmental distribution. They are classified as mandatory intracellular parasites and they have mobile invasive stages. They are characterized by the presence of an evolutionarily unique structure called the apical complex, used to adhere and invade host cells. Many of the species that are part of this group are considered pathogens in humans and other vertebrates. All animal species are believed to host at least one species of apicomplexan parasites [1–3]. Apicomplexa are divided into two orders: Eucoccidiorida (coccidian parasites) and Haemosporida (haemosporidian parasites). Haemosporida are

Anexo A. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA-SUCEN no.0009)



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
"SUCEN"



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação molecular de parasitas hemosporídeos (Apicomplexa: Haemosporida) em quirópteros silvestres brasileiros", protocolada sob o CEUA-SUCEN No. 0009, sob a responsabilidade de Karin Kirchgatter Hildebrand que envolve o recebimento e utilização secundária de material biológico de quirópteros capturados em vida livre, em projetos de pesquisa aprovados em suas instituições de origem, a saber: CEUA UNESP Botucatu - Protocolo nº 809 e CEUA FIOCRUZ - Protocolo nº LM-6/18, com aprovação do SISBIO, números: 51714-1 e 19037-1 e licença nº ICMBIO 72790. A presente proposta está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi avaliado *ad referendum* em 30/09/2021 e aprovada por revisor *ad hoc* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Sucen.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2021](#) a [09/2022](#)

São Paulo, 30 de Setembro de 2021

Adriano Pinter dos Santos

Med. Veterinário
Pesquisador Científico VI
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
SUCEN