

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Ocorrência e diversidade genética de *Babesia* e *Hepatozoon*
em roedores e marsupiais nos estados do Rio de Janeiro e
Paraná**

Tatiana Pádua Tavares de Freitas

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Babesia* E
Hepatozoon EM ROEDORES E MARSUPIAIS NOS ESTADOS
DO RIO DE JANEIRO E PARANÁ**

TATIANA PÁDUA TAVARES DE FREITAS

Sob a orientação da Professora

Maristela Peckle Peixoto

E coorientação dos Doutores

Bernardo Rodrigues Teixeira

Carlos Luiz Massard

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciências**, no Curso de Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária,
Área de Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F849o Freitas, Tatiana Pádua Tavares de, 1967-
Ocorrência e diversidade genética de Babesia e
Hepatozoon em roedores e marsupiais nos estados do
Rio de Janeiro e Paraná / Tatiana Pádua Tavares de
Freitas. - Rio de Janeiro, 2025.
116 f.: il.

Orientadora: Maristela Peckle Peixoto.
Coorientador: Bernardo Rodrigues Teixeira.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2025.

1. Hepatozoon. 2. Babesia. 3. Roedores . 4.
Marsupiais. 5. Diversidade genética. I. Peixoto,
Maristela Peckle, 1986-, orient. II. Teixeira,
Bernardo Rodrigues, 1977-, coorient. III. Massard,
Carlos Luiz, 1947-, coorient. IV Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Ciências Veterinárias. V.
Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE
JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**



ATA Nº 7194 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.073637/2025-12

Seropédica-RJ, 17 de dezembro de 2025.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TATIANA PÁDUA TAVARES DE FREITAS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora** em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 16/12/2025

(Assinado digitalmente em 17/12/2025 13:13)

BRUNA DE AZEVEDO BAETA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: 00047509

(Assinado digitalmente em 18/12/2025 23:20)

MARISTELA PECKLE PEIXOTO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: 00003408

(Assinado digitalmente em 17/12/2025 11:40)

PATRICIA GONZAGA PAULINO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptG (12.28.01.00.00.00.50)
Matricula: 00099103

(Assinado digitalmente em 21/12/2025 19:18)

KARINA VARELLA ARPON

ASSINANTE EXTERNO
CPF: 000.000.107-00

(Assinado digitalmente em 07/01/2026 11:57)

LETÍCIA PEREIRA ÚNGARI

ASSINANTE EXTERNO
CPF: 000.000.818-00

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Santíssima Trindade, Deus Pai, Filho e Espírito Santo, e à Nossa Senhora, minha mãe, por minha vida e por estarem sempre comigo. Ao meu Santo Anjo da Guarda pela proteção, conforto e conselho em tudo o que faço.

À minha amada família, meus falecidos pais, Jair e Maria do Carmo, por todo amor, apoio e suporte em todas as etapas de minha vida, sem isso não seria quem sou, queridas irmãs Cíntia e Natália, maravilhosas sobrinhas Tayná e Thamiris, cunhadinho Alecks e sobrinho Tiago por estarmos sempre unidos.

À minha orientadora e amiga Maristela Peckle por ter aceitado me orientar sem me conhecer, pelos excelentes momentos de aprendizado, trocas de ideias e agradável convivência.

Ao meu coorientador, colega e amigo Bernardo Rodrigues Teixeira pela oportunidade de me inserir em seu projeto de pesquisa, pelos ensinamentos, apoio, paciência e gargalhadas.

Ao meu coorientador, ilustre parasitologista e pessoa adorável, Dr. Carlos Luiz Massard, por me incentivar com seu entusiasmo científico e grande conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV) da UFRRJ, pelo companheirismo e convivência maravilhosa, no laboratório, festinhas e congressos, com especial ênfase para Eduarda Machado, Duda para os íntimos, minha mestra das imagens e amiga de todas as horas. À equipe de apoio da Estação Experimental da UFRRJ, onde fica o LHV, por sempre me receberem com um sorriso solícito.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ pelo conhecimento compartilhado nestes anos, especialmente à professora Raquel Simões que me incentivou a iniciar o doutorado e me indicou a orientadora ideal.

Ao meu chefe e amigo, Dr. Arnaldo Maldonado, por me apoiar e incentivar nesta etapa, em muito adiada por mim.

Ao meu vice-chefe e amigo, Dr. Paulo Sérgio D'Andreia, por sempre me apoiar, mesmo quando eu não fazia parte de sua equipe, me permitindo trabalhar com o que amo.

À amiga Karina Varella que sempre me incentivou e ajudou no mundo molecular, pela troca de informações, apoio e pela amizade sincera.

Ao colega e amigo Fernando Oliveira pela elaboração dos mapas, pelos ensinamentos e pela pessoa sincera e suave que é.

Aos colegas do meu laboratório, LABPMR, pela agradável convivência diária, em especial às amigas Michele Maria, Natália Costa e Camila Lúcio pelo incentivo no início e apoio na etapa final e Roberto Vilela por me iniciar na bioinformática.

À equipe da Plataforma de Genômica da Fiocruz pelo apoio, paciência e extremo profissionalismo, aliado à sincera amizade.

À Dra. Alexine Keuroghlian pelo incentivo na pesquisa científica e amizade sincera.

Aos animais, criaturas maravilhosas, que me indicaram a profissão que me realiza e com suas vidas nos dão alimento, suporte, alegria e dados científicos. Gratidão sem fim.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Tatiana Pádua Tavares de Freitas, filha de Jair Tavares de Freitas e Maria do Carmo Pádua Tavares de Freitas, nasceu em 31 de março de 1967, na cidade do Rio de Janeiro. Estudou o ensino fundamental nas Escolas Municipais Cervantes e Francisco Palheta, localizadas no bairro de Bento Ribeiro. Iniciou o Ensino Médio no Colégio João Lyra Filho, no bairro de Quintino Bocaiúva, e finalizou no Colégio Lemos de Castro, no bairro de Madureira.

Ingressou no curso de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1988, trancando o curso após um ano. Após novo concurso, iniciou o curso de Medicina Veterinária na mesma universidade em 1989. Concluiu a graduação em 1993.

Após formada, atuou como médica veterinária de pequenos animais em clínicas particulares do Rio de Janeiro e Resende, durante cinco anos.

Em 1998, após concurso público, iniciou como professora substituta nas disciplinas de Clínica de Pequenos Animais e Prática Hospitalar na Universidade Federal de Mato Grosso, durante dois anos.

Em 2001, iniciou o trabalho como médica veterinária de campo e de laboratório no LABTRIP (Laboratório de Tripanossomatídeos), localizado na Fiocruz campus Manguinhos, em parceria com a “Conservation International” do Brasil, atuando no Pantanal de Mato Grosso do Sul, durante dois anos.

Em 2003, continuou o trabalho no Pantanal de Mato Grosso do Sul com a equipe da pesquisadora americana Alexine Keuroghlian, atuando como médica veterinária, para avaliação da saúde de pecarídeos, com ênfase na busca de patógenos, como *Leptospira* e tripanossomatídeos, durante cinco anos.

Em 2008, após concurso público, iniciou como professora substituta da disciplina de Zoonoses e Prática Hospitalar na Universidade Federal de Mato Grosso, durante um ano. Ingressou no mestrado em Ciências Veterinárias na mesma universidade em 2008, avaliando a prevalência de infecção por *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos nos municípios de Guarantã do Norte, Alta Floresta e Rondonópolis, no estado de Mato Grosso, finalizado no início de 2010.

Após concurso público ocorrido em 2010, iniciou em 2011 como Tecnologista em Saúde Pública no Centro de Experimentação Animal (CEA) do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, campus Manguinhos) atuando como médica veterinária responsável técnica na experimentação de primatas não humanos (*Macaca fascicularis*, *Saimiri sciureus* e *Saimiri ustus*) e, posteriormente, de roedores (*Sigmodon hispidus* e *Mus musculus*) em três biotérios desta instituição, durante cinco anos. Em 2017, iniciou como médica veterinária e responsável técnica do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Pequenos Mamíferos (LABPMR) da Fiocruz, campus Manguinhos e responsável por realizar a análise molecular para identificação dos espécimes da Coleção de Referência deste laboratório (COLMASTO), onde atua até hoje.

RESUMO

FREITAS, Tatiana Pádua Tavares de. **Ocorrência e diversidade genética de *Babesia* e *Hepatozoon* em roedores e marsupiais dos Estados do Paraná e Rio de Janeiro.** 2025. 98 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Entre os protozoários do Filo Apicomplexa estão parasitos obrigatórios que apresentam ciclo de vida heteroxeno e infectam uma gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados hematófagos. Apicomplexos do gênero *Hepatozoon* foram inicialmente registrados parasitando pequenos mamíferos no Brasil no século passado, com detecção de *Hepatozoon muris* em *Akodon fuliginosus* em 1915, em São Paulo e de *Hepatozoon didelphydis* em *Didelphis aurita* em 1916, no Rio de Janeiro. Mais recentemente, uma nova espécie, *Hepatozoon milleri*, foi descrita em *Akodon montensis* em São Paulo, utilizando microscopia e análise filogenética. *Babesia* é transmitida por carrapatos ixodídeos e possui estratégias únicas, como transmissão transovariana e transtadial, garantindo a propagação e perpetuação de seus estágios infectivos. No Brasil, a primeira descrição morfológica de *Babesia* sp. ocorreu em marsupiais da espécie *Philander quica* no Rio de Janeiro em 1928, sendo denominada *Nuttalia brasiliensis* e, recentemente, acrescentando a análise filogenética, em outros didelídeos. Para ampliar o estado de arte destes parasitos, este estudo objetivou detectar a ocorrência e a diversidade genética de *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp., utilizando uma abordagem de taxonomia integrativa, em roedores e marsupiais do Paraná e Rio de Janeiro. Para este fim, amostras de fígado e esfregaços sanguíneos foram obtidos de 309 pequenos mamíferos capturados em municípios do Paraná (Cruz Machado, Lidianópolis e Ponta Grossa) e do Rio de Janeiro (Iguaba Grande e Nova Friburgo), em três espécies de marsupiais (*Didelphis aurita*, *Monodelphis americana* e *Philander quica*), 14 de roedores cricetídeos (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Delomys sublineatus*, *Euryoryzomys russatus*, *Juliomys ossitenuis*, *Necomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus nasutus*, *Oxymycterus quaestor*, *Sooretamys angouya* e *Thaptomys nigrita*) e duas de roedores murídeos (*Mus musculus* e *Rattus rattus*). Nos esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa e analisados sob microscopia ótica, foram detectados gametócitos de *Hepatozoon* sp. em 10% (31/309) dos pequenos mamíferos (*Akodon cursor*, *Akodon montensis* e *Oligoryzomys nigripes*) e merozoítos de *Babesia* spp. em 40% (4/10) dos *Philander quica* analisados. Diferenças morfométricas significativas foram observadas em medidas de gametócitos em *Akodon* sp. e amplificados fragmentos de *18S rDNA* de *Hepatozoon* spp. em 23,3% (72/309) dos roedores analisados (*A. cursor*, *A. montensis*, *O. nigripes*, *O. nasutus*, *O. quaestor*, *S. angouya* e *M. musculus*). As análises filogenéticas demonstraram a existência de quatro diferentes haplótipos de *Hepatozoon* spp. entre roedores deste estudo. Na pesquisa de *Babesia* spp., foram amplificadas sequências dos genes *18S rDNA*, *cox1*, *cox3* e *cytb* em amostras de *P. quica*, *M. musculus* e *O. nasutus*. Nossas descobertas expandem o conhecimento sobre os hospedeiros de *Hepatozoon* spp. descrevendo *Oxymycterus nasutus* e *Oxymycterus quaestor* como novas espécies hospedeiras e identificando dois novos haplótipos circulantes em roedores no Paraná. Também detectamos dois novos hospedeiros entre roedores infectados por *Babesia* sp., *Mus musculus* e *Oxymycterus nasutus*, e um novo haplótipo foi obtido em *Philander quica* no Paraná, além de possivelmente termos sequenciado o DNA de *Babesia brasiliensis* na espécie de marsupial originalmente descrita, utilizando uma abordagem multigênica e de taxonomia integrativa, ampliando o clado “Marsupialia da América do Sul”.

Palavras-chave: Pequenos mamíferos, hemoparasitos, haplótipos

ABSTRACT

FREITAS, Tatiana Pádua Tavares de. **Occurrence and genetic diversity of *Babesia* and *Hepatozoon* in rodents and marsupials in the states of Paraná and Rio de Janeiro.** 2025. 98 p. Thesis. (Doctor of Veterinary Science). Veterinary Institute, Animal Parasitology Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Among the protozoans of the Phylum Apicomplexa are obligate parasites that have a heteroxenous life cycle and infect a range of vertebrate hosts and blood-feeding invertebrates. Apicomplexans of the genus *Hepatozoon* were initially recorded parasitizing small mammals in Brazil in the last century, with the detection of *Hepatozoon muris* in *Akodon fuliginosus* in 1915, in São Paulo, and of *Hepatozoon didelphydis* in *Didelphis aurita* in 1916, in Rio de Janeiro. More recently, a new species, *Hepatozoon milleri*, was described in *Akodon montensis* in São Paulo, using microscopy and molecular analysis. *Babesia* is transmitted by ixodid ticks and has unique strategies, such as transovarial and transstadial transmission, ensuring the propagation and perpetuation of its infective stages. In Brazil, the first morphological description of *Babesia* sp. occurred in marsupials of the species *Philander quica* in Rio de Janeiro in 1928, being named *Nuttalia brasiliensis*, and more recently, with the addition of phylogenetic analysis, in other didelphids. To expand the state of the art of these parasites, this study aimed to detect the occurrence and genetic diversity of *Hepatozoon* spp. and *Babesia* spp., using an integrative taxonomy approach, in rodents and marsupials from Paraná and Rio de Janeiro. For this purpose, liver samples and blood smears were obtained from 309 small mammals captured in municipalities of Paraná (Cruz Machado, Lidianópolis and Ponta Grossa) and Rio de Janeiro (Iguaba Grande and Nova Friburgo), in three species of marsupials (*Didelphis aurita*, *Monodelphis americana* and *Philander quica*), 14 of cricetid rodents (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Akodon paranaensis*, *Delomys sublineatus*, *Euryoryzomys russatus*, *Juliomys ossitenuis*, *Necomys lasiurus*, *Nectomys squamipes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus nasutus*, *Oxymycterus quaestor*, *Sooretamys angouya* and *Thaptomys nigrita*) and two of murid rodents (*Mus musculus* and *Rattus rattus*). In blood smears, stained with Giemsa and analyzed under a light microscope, gametocytes of *Hepatozoon* sp. were detected in 10% (31/309) of the small mammals analyzed (*A. cursor*, *A. montensis* e *O. nigripes*) and merozoites of *Babesia* spp. in 40% (4/10) of the analyzed *P. quica*. Significant morphometric differences were observed in gametocytes measurements in *Akodon* sp., and amplified 18S rDNA fragments of *Hepatozoon* spp. were found in 23.3% (72/309) of the analyzed rodents (*A. cursor*, *A. montensis*, *O. nigripes*, *O. nasutus*, *O. quaestor*, *S. angouya*, and *M. musculus*). Phylogenetic analyses demonstrated the existence of four different haplotypes of *Hepatozoon* spp. among rodents in this study. In the *Babesia* spp. survey, sequences of the 18S rDNA, *cox1*, *cox3*, and *cytb* genes were amplified in *P. quica*, *M. musculus* and *O. nasutus*. Our findings expand knowledge about *Hepatozoon* spp. hosts by describing *Oxymycterus nasutus* and *Oxymycterus quaestor* as new host species and identifying two new haplotypes circulating in rodents in Paraná. We also detected two new hosts among rodents infected with *Babesia* sp., *Mus musculus* and *Oxymycterus nasutus*, and a new haplotype was obtained in *Philander quica* in Paraná, in addition to possibly having sequenced the DNA of *Babesia brasiliensis* in the originally described marsupial species, using a multigene and integrative taxonomy approach, expanding the “South American Marsupialia” clade.

Key-words: Small mammals, hemoparasites, haplotypes

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

BI	Inferência bayesiana
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CM	Cruz Machado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio padrão
ESS	Effective Sample Size
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Hap	Haplótipo
kg	Quilograma
LABPMR	Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
LID	Lidianópolis
LHV	Laboratório de Hemoparasitos e Vetores
IG	Iguaba Grande
MCMC	Monte Carlo Markov Chain
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ng	Nanograma
n	Número
ns	Não significativo
nPCR	nested PCR
p	p-valor
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PG	Ponta Grossa
pmol	Picomol
rDNA	Ácido nucleico ribossomal
°C	Celsius
®	Marca registrada
™	Marca comercial
μL	Microlitro
μM	Micrometro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de parasitos do gênero <i>Hepatozoon</i> , nomes dos <i>primers</i> , tipo de reação, sequência dos <i>primers</i> , tamanho da banda, condições termais e referência.....	20
Tabela 2.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de piroplasmas dos gêneros <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i> , nomes dos <i>primers</i> , tipo de reação, sequência dos <i>primers</i> , tamanho da banda, condições termais e referência.....	23
Tabela 3.	Pequenos mamíferos capturados de acordo com a ordem, espécie, área de estudo, número total por espécie e número total.....	27
Tabela 4.	Dados morfométricos de cápsulas e núcleos de diferentes espécies de <i>Hepatozoon</i> detectados em roedores encontrados na literatura e neste estudo.....	28
Tabela 5.	Médias de comprimento e largura de gametócito de <i>Hepatozoon</i> spp. observados em roedores deste estudo, de acordo com a localidade.....	30
Tabela 6.	Prevalência de <i>Hepatozoon</i> spp. de acordo a espécie hospedeira por município estudado e prevalência total por espécie de hospedeiro...	32
Tabela 7.	Resultados das análises de BLASTn das sequências representativas de haplótipos de <i>Hepatozoon</i> spp. detectados em roedores neste estudo, demonstrando o código de acesso ao GenBank das sequências deste estudo, a relativa espécie de hospedeiro e localidade de captura, código de acesso ao GenBank dos melhores resultados e dados da análise.....	32
Tabela 8.	Médias do comprimento e largura dos gametócitos e do comprimento e largura do núcleo de <i>Hepatozoon</i> spp., de acordo com os haplótipos detectados neste estudo.....	38
Tabela 9.	Resultados de BLASTn das sequências dos genes <i>18S rDNA</i> (~1500 pb), <i>cox3</i> , <i>cox1</i> e <i>cytb</i> obtidas em pequenos mamíferos neste estudo.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de um merozoíto de apicomplexa, demonstrando as estruturas do complexo apical visíveis à microscopia eletrônica. Fonte: Perkins <i>et al.</i> , 2000.....	2
Figura 2.	Mapa demonstrando os municípios com captura de pequenos mamíferos no Estado do Rio de Janeiro: Nova Friburgo e Iguaba Grande e Estado do Paraná: Cruz Machado, Lidianópolis e Ponta Grossa no período de 2019 a 2021.....	15
Figura 3.	Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Cruz Machado, no estado do Paraná.....	16
Figura 4.	Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Ponta Grossa, no estado do Paraná.....	17
Figura 5.	Áreas de coleta de pequenos mamíferos no município de Lidianópolis, no estado do Paraná.....	17
Figura 6.	Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Nova Friburgo, no estado do Rio de Janeiro.....	18
Figura 7.	Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Iguaba Grande, no estado do Rio de Janeiro.....	18
Figura 8.	Gametócitos (setas) de <i>Hepatozoon</i> sp. em sangue periférico de roedores.....	29
Figura 9.	Relação filogenética de <i>Hepatozoon</i> spp. com base no <i>18S rDNA</i> com um conjunto final de dados de 519 pb.....	34
Figura 10.	Mapa de parte das regiões Sul e Sudeste do Brasil demonstrando as áreas de estudo e a frequência dos haplótipos de <i>Hepatozoon</i> spp. detectados em roedores.....	35
Figura 11.	Relação filogenética de <i>Hepatozoon</i> spp. com base no <i>18S rDNA</i> com um conjunto de dados final de 1605 pb.....	36
Figura 12.	Rede de haplótipos formada a partir de sequências de <i>18S rDNA</i> (519 pb) de <i>Hepatozoon</i> spp. detectadas em pequenos roedores do Brasil e do Chile.....	37
Figura 13.	Merozoítos intraeritrocíticos de <i>Babesia</i> spp. (setas) observados em esfregaços de sangue de <i>Philander quica</i> de Ponta Grossa, Paraná e Iguaba Grande, Rio de Janeiro.....	39
Figura 14.	Relação filogenética de <i>Babesia</i> sp. com base no <i>18S rDNA</i> com um conjunto de dados final de 511 pb.....	42

Figura 15.	Rede de haplótipos formada a partir de sequências de <i>18S rDNA</i> (511 pb) de <i>Babesia</i> spp. do clado Marsupialia da América do Sul.....	43
Figura 16.	Relação filogenética de <i>Babesia</i> sp. com base no gene <i>18S rDNA</i> com um conjunto de dados final de 1633 pb.....	45
Figura 17.	Relação filogenética de <i>Babesia</i> sp. com base no gene <i>cox3</i> com um conjunto de dados final de 506 pb.....	46
Figura 18.	Relação filogenética de <i>Babesia</i> sp. com base no gene <i>cox1</i> com um conjunto de dados final de 521 pb.....	47
Figura 19.	Relação filogenética de <i>Babesia</i> sp. com base no gene <i>cytb</i> com um conjunto de dados final de 803 pb.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	O FILO APICOMPLEXA.....	2
2.1.1	História do filo.....	2
2.1.2	Estrutura dos apicomplexos.....	2
2.1.3	O ciclo de vida dos apicomplexos.....	3
2.2	A subordem Adeleorina.....	3
2.2.1	O gênero <i>Hepatozoon</i>	4
2.2.2	Posição taxonômica de <i>Hepatozoon</i> spp.	4
2.2.3	Ciclo biológico de vida e transmissão de <i>Hepatozoon</i> spp.	5
2.2.4	Características morfológicas dos estágios de parasitos do gênero <i>Hepatozoon</i> em mamíferos da ordem Rodentia e Didelphimorphia.....	5
2.2.5	Distribuição de infecção por <i>Hepatozoon</i> spp. em roedores no mundo	5
2.2.6	<i>Hepatozoon</i> spp. detectados em roedores no Brasil.....	6
2.2.7	Deteção e distribuição de infecção por <i>Hepatozoon</i> spp. em marsupiais no mundo.....	6
2.2.8	<i>Hepatozoon</i> spp. detectados em marsupiais no Brasil.....	6
2.2.9	Diagnóstico de infecção por <i>Hepatozoon</i> spp. em mamíferos.....	7
2.2.10	Sinais clínicos de hepatozoonose em roedores.....	7
2.3	A Ordem Piroplasmida.....	8
2.3.1	Ciclo de vida dos piroplasmas.....	8
2.3.2	Reconstrução filogenética dos Piroplasmas (<i>18S rDNA</i>).....	9
2.3.3	O gênero <i>Babesia</i>	9
2.3.4	Posição taxonômica de <i>Babesia</i> spp.....	10
2.3.5	<i>Babesia</i> spp. em animais domésticos no mundo.....	11
2.3.6	Piroplasmas detectados em pequenos mamíferos.....	12
2.3.7	Diagnóstico de infecção por <i>Babesia</i> spp. em mamíferos.....	13
2.3.8	Sinais clínicos de babesiose em mamíferos.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1	Áreas de estudo e manipulação de pequenos mamíferos.....	15
3.2	Elaboração de esfregaços sanguíneos e análises de gametócitos.....	16
3.3	Análises estatísticas.....	19
3.4	Extração de DNA.....	19
3.5	Análises moleculares.....	19
3.6	Eletroforese das reações, purificação dos produtos amplificados e sequenciamento.....	22
3.7	Análises filogenéticas.....	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Distribuição dos pequenos mamíferos analisados.....	27
4.2	Análises morfométricas de gametócitos de <i>Hepatozoon</i> spp.	28
4.3	Deteção e análises filogenéticas de <i>Hepatozoon</i> spp.	31
4.4	Análises morfométricas de merozoítos de <i>Babesia</i> spp.....	38
4.5	Deteção e análises filogenéticas de <i>Babesia</i> spp.....	40
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÕES.....	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

9	ANEXOS.....	72
I	Árvore consenso do gene do gene 18S rRNA de sequências de piroplasmidas com seis clados, extraída do artigo de Schnittger <i>et al.</i> , 2012.....	72
II	Figura do artigo de Jalovecka <i>et al.</i> , 2019, demonstrando a filogenia molecular de piroplasmas baseada em sequências do gene 18S rRNA, divididos em 10 clados.....	73
III	Protocolo de extração de DNA do kit Qiagen.....	74
IV	Lista das sequências do gene <i>18S rDNA</i> utilizadas na análise filogenética de <i>Hepatozoon</i> spp.....	76
V	Lista de haplótipos de <i>Hepatozoon</i> spp. usados na rede de haplótipos (Figura 12), relacionando o respectivo haplótipo ao acesso GenBank, ao hospedeiro intermediário e ao país de origem.....	78
VI	Lista das sequências de <i>18S rDNA</i> , <i>cox1</i> , <i>cox3</i> e <i>cytb</i> utilizadas na análise filogenética de <i>Babesia</i> spp.....	80
VII	Lista de sequências do gene <i>18S rDNA</i> usados na rede de haplótipos do clado Marsupialia da América do Sul (Figura 19).....	84
VIII	Artigo publicado na revista Pathogens, 2025, v. 14, n. 756, p. 1-18.....	85

1 INTRODUÇÃO

O Filo Apicomplexa é composto por um grupo altamente diverso de protozoários parasitos e com membros causadores de doenças de importância para a Saúde Pública, como a malária. Infecções por apicomplexos em pequenos mamíferos não voadores foram descritas em diversas partes do mundo, e revelam as complexas relações ecológicas entre estas ordens de animais, seus ectoparasitos associados e o ambiente onde se encontram. No início, as descrições taxonômicas se baseavam em observações microscópicas relacionadas aos hospedeiros onde eram detectados, mas com o avanço dos dados moleculares mais recursos foram apresentados para uma classificação mais precisa destes parasitos (Adl *et al.*, 2019; Hrazdilová *et al.*, 2021).

Pequenos mamíferos representam uma elevada biomassa e são conhecidos como hospedeiros de patógenos que afetam a saúde global, particularmente os protozoários que estão associados a diversos grupos de mamíferos (Woolhouse e Gowtage-Sequeria, 2005). O Brasil é considerado por alguns autores o país que possui a maior diversidade de mamíferos do mundo e onde foram descritas, até o momento, cerca de 270 espécies de roedores e 69 espécies de marsupiais (Abreu-Jr *et al.*, 2024). Alguns apicomplexos estão relacionados a estas ordens de animais, como *Babesia microti*, *Plasmodium* spp. e *Hepatozoon milleri*, patógenos que têm roedores como seus hospedeiros, demonstrando uma possível coevolução entre parasitos e seus hospedeiros vertebrados (Demoner *et al.*, 2019; Perkins *et al.*, 2007; Saito-Ito *et al.*, 2008; Yasbley & Shock, 2013).

A classificação taxonômica dos parasitos baseada na biologia e morfologia pode detectar eventos de homoplasia e levar a interpretações subjetivas dos caracteres individuais observados (Hrazdilová *et al.*, 2021). Protozoários do gênero *Hepatozoon* têm ciclo de vida heteroxeno obrigatório e parasitam uma gama de hospedeiros vertebrados, seus hospedeiros intermediários, e são transmitidos, principalmente, pela ingestão de invertebrados hematófagos infectados, seus hospedeiros definitivos (Baneth *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2016; Miller, 1908; Smith, 1996). Algumas espécies deste parasito são conhecidamente patogênicas para algumas ordens de animais, como carnívoros, além de já terem sido reportadas alterações clínicas e anatomopatológicas em pequenos mamíferos infectados (Ijaz *et al.*, 2025; Miller, 1908; Modrý *et al.*, 2017).

Protozoários do gênero *Babesia* são transmitidos por carrapatos ixodídeos, sendo conhecidas mais de 100 espécies que infectam mamíferos e aves, porém muitas permanecem desconhecidas, sendo o parasito mais comum entre os animais de vida livre (Jalovecka *et al.*, 2019; Yasbley e Shock, 2013). Este parasito tem importância mundial pelo impacto na produtividade e saúde animal, causando grandes prejuízos econômicos, além de afetar a saúde de animais domésticos, com espécies patogênicas para humanos, que são considerados hospedeiros acidentais (Bock *et al.*, 2004; Hunfeld *et al.*, 2008). Desta forma, estudos que ampliem o conhecimento atual sobre os apicomplexos em pequenos mamíferos utilizando técnicas como a tradicional análise microscópica, aliada às análises filogenéticas de ponta, tendem a preencher lacunas no estado de arte de hemoparasitos deste filo.

Este trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência e a diversidade genética de hemoparasitos dos gêneros *Hepatozoon* spp. e *Babesia* spp., em populações de roedores e marsupiais coletados em municípios dos estados do Paraná (Cruz Machado, Lidianópolis e Ponta Grossa) e Rio de Janeiro (Iguaba Grande e Nova Friburgo), utilizando uma abordagem de taxonomia integrativa ao aliar análises morfológicas e análises filogenéticas dos parasitos analisados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Filo Apicomplexa Levine, 1980 emend. Adl *et al.*, 2005

2.1.1 História do filo

O Filo Apicomplexa Levine, 1980 é composto por protozoários parasitos obrigatórios encontrados em grande número de hospedeiros vertebrados e invertebrados (Levine, 1988). A origem do nome apicomplexa provém de um complexo de organelas encontradas nos estágios de merozoítos e esporozoítos destes parasitos. Alguns membros deste grupo são conhecidos por serem agentes de doenças severas, tais como a malária (*Plasmodium* spp. Marchiafava e Celli), coccidiose (*Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1908 e *Eimeria* spp. Schneider, 1875) e piroplasmose (*Babesia* spp. Starcovici, 1893 e *Theileria* spp. Bettencourt *et al.*, 1907). O primeiro registro de observação de um parasito apicomplexo foi feito por Antony Van Leeuwenhoek, em 1674, em vesícula biliar de coelhos. Posteriormente, em 1865, Lindermann descreveu este parasito como uma gregarina *Monocystis stiedai*, porém em 1907, Kiskalt e Hartmann transferiram o parasito para o gênero *Eimeria* (Levine, 1988).

2.1.2 Estrutura dos apicomplexos

Após o evento da microscopia eletrônica, revelou-se um grupo de estruturas denominadas de “complexo apical”, das quais deriva o nome do filo, e que estão envolvidas na invasão das células-alvo, estabelecimento do vacúolo parasitóforo dentro das células infectadas e replicação do parasito (Perkins *et al.*, 2000). Este complexo apical consiste em um ou mais anéis polares, um conoide formado por vários microtubos espiralados encaixados no anel polar, duas a oito roptrias tubulares ou saculares, micronemas e microtúbulos subpeliculares (Figura 1). Os microtúbulos subpeliculares não são observados no gênero *Babesia* (Levine, 1988; Perkins *et al.*, 2000).

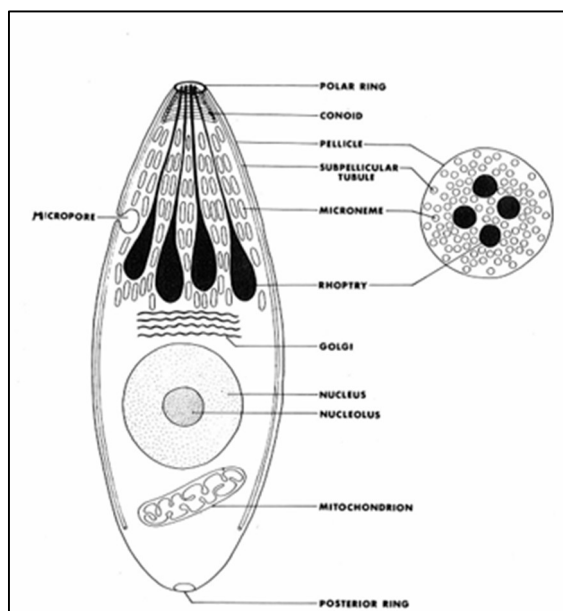


Figura 1. Esquema de um merozoíto de apicomplexa, demonstrando as estruturas do complexo apical e outras organelas visíveis à microscopia eletrônica. Fonte: Perkins *et al.*, 2000.

Estudos baseados em algumas espécies das Ordens Haemosporida, Piroplasmorida e Eucoccidiorida demonstraram uma sequência de eventos de invasão celular. Inicialmente ocorre a adesão do parasito à célula hospedeira envolvendo as proteínas de superfície do parasito que reconhecem moléculas na superfície da célula hospedeira. Após a adesão inicial, o conóide projeta sua extremidade anterior, como um estilete, e uma junção anular estreita é formada entre as duas células, do hospedeiro e do parasito. Essa junção se move até todo o parasito entrar na célula hospedeira. Uma membrana de vacúolo parasitóforo é formada ao redor do parasito e a membrana da célula hospedeira é selada novamente (Perkins *et al.*, 2000).

2.1.3 O ciclo de vida dos apicomplexos

O ciclo de vida dos apicomplexos envolve os ciclos básicos de replicação e desenvolvimento: gametogonia, esporogonia e merogonia. Alguns parasitos têm ciclo de vida monoxeno, os quais requerem um único hospedeiro para completar seu ciclo de vida, enquanto outros tem ciclos de vida heteroxenos, que requerem dois ou mais hospedeiros para completar seu desenvolvimento (Breshears *et al.*, 2009; Perkins *et al.*, 2000).

A reprodução sexual ocorre exclusivamente nos hospedeiros definitivos, onde os macrogamontes (femininos) e microgamontes (masculinos) passam por gametogonia para produzir macrogametas e microgametas que se fundem (singamia) para formar o zigoto, que é a única forma em estágio diplóide, todos os demais estágios são haplóides devido a ocorrência de divisões meióticas. Por exemplo, no gênero *Hepatozoon* Miller, 1908, o zigoto se desenvolve dentro de um oocisto. Os oocistos esporulados são infectivos para o hospedeiro intermediário, no ciclo heteroxeno. Através do processo de esporogonia (múltiplas fissões) nos oocistos, formam-se os esporozoítos. Dentro da célula hospedeira, cada esporozoíto cresce e se divide através de múltiplas fissões (merogonia ou esquizogonia) para formar uma ou mais gerações de merozoítos. Finalmente, alguns merozoítos tornam-se macrogamontes ou microgamontes, penetram nos tecidos ou diretamente na corrente circulatória, onde se diferenciam em gametócitos (Breshears *et al.*, 2009; Perkins *et al.*, 2000).

A última revisão taxonômica do filo foi descrita por Adl e colaboradores (2019), sendo uma atualização de publicações anteriores (Adl *et al.*, 2005, 2012). Esta publicação reporta pertencerem ao filo cerca de 350 gêneros, com seus membros possuindo um complexo apical constituído por um ou mais anéis polares, roptrias, micronemas, microtúbulos conóides e subpeliculares, além de sexualidade conhecida por singamia, seguida de meiose. Algumas características são determinantes para o agrupamento de apicomplexos, como o tipo de hospedeiro definitivo (vertebrado ou invertebrado), o modo de infecção, a presença ou ausência de estruturas e a localização no hospedeiro vertebrado (Perkins *et al.*, 2000).

2.2 A Subordem Adeleorina

Entre os apicomplexos, os protozoários da subordem Adeleorina Léger, 1911 estão entre os menos estudados e diversos. Nos parasitos desta subordem o microgametócito e o macrogametócito são fixados ou pressionados entre si, em um processo biológico chamado singamia (reprodução sexuada) (Barta *et al.*, 2012; Perkins *et al.*, 2000). Membros desta subordem incluem sete famílias com parasitos que possuem ciclos de vida monoxeno (Adeleidae, Legerellidae e Klossiellidae) e heteroxeno (Hepatozoidae, Karyolysidae, Haemogregarinidae e Dactylosomatidae) (Barta *et al.*, 2012).

A família Hepatozoidae é composta por um único gênero, *Hepatozoon*. A maioria das descrições das espécies destes parasitos foram baseadas na morfologia dos gametócitos presentes no sangue do hospedeiro intermediário (Smith, 1996), porém mais recentemente novas revisões taxonômicas foram propostas baseadas em análises filogenéticas de sequências de 18S rDNA (Karadjian *et al.*, 2015; Maia *et al.*, 2016).

2.2.1 O gênero *Hepatozoon*

O gênero *Hepatozoon* foi estabelecido por Miller (1908) que descreveu o ciclo de vida de um protozoário intraleucocítico de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769). Este parasito fazia gametogênese e esporogonia na hemocele do ácaro *Laelaps echidninus* Berlese, 1887 (Acari: Mesostigmata), onde foram observados oocistos poliesporocísticos, e foi então denominado *Hepatozoon perniciosus*. Porém a primeira detecção deste parasito, nesta ordem de animais, foi relacionada à Balfour (1905) que descreveu o parasito em leucócito de rato norueguês, *Jaculus jaculus* Linnaeus, 1758, no Sudão, como *Leucocytozoon muris*. Posteriormente, Wenyon (1926) unificou os achados, determinando que *H. perniciosus* seria sinônimo de *L. muris*, sendo o espécie-tipo denominado como *Hepatozoon muris* Balfour, 1905 (Wenyon, 1926).

Estes protozoários têm ciclo de vida heteroxeno obrigatório e foram encontrados parasitando uma gama de hospedeiros vertebrados, como mamíferos, répteis e anfíbios, seus hospedeiros intermediários, e invertebrados hematófagos, como carrapatos, moscas, mosquitos, pulgas, piolhos e reduvídeos, seus hospedeiros definitivos (Baneth *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2016; Miller, 1908; Smith, 1996). A transmissão para o hospedeiro intermediário vertebrado geralmente ocorre através da ingestão do hospedeiro invertebrado infectado (Smith, 1996). Outras formas de transmissão foram sugeridas, como através da predação de vertebrados infectados que atuam como hospedeiros paratênicos (Johnson *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2014; Smith, 1996), da presa com ectoparasitos parasitados afixados (Johnson *et al.*, 2009) e por transmissão vertical observada em cães (Murata *et al.*, 1993; Schäfer *et al.*, 2022) e roedores (Tolkacz *et al.*, 2023). São de importância veterinária as espécies que infectam canídeos e felídeos, como *Hepatozoon americanum* Vicent-Johnson *et al.*, 1997, *Hepatozoon canis* James, 1905 e *Hepatozoon felis* Patton, 1908 (Modrý *et al.*, 2017).

2.2.2 Posição taxonômica de *Hepatozoon* spp.

A classificação taxonômica dos protozoários é desafiadora e tem sido atualizada com a utilização das análises filogenéticas, com acréscimos de novos clados e gêneros (Adl *et al.*, 2019). Para este fim, seguimos as mais recentes revisões da Sociedade Internacional de Protozoologia (Adl *et al.*, 2012, 2019), bem como a publicação de Barta e colaboradores (2012). Além disso, todos os táxons foram consultados como válidos no banco de dados do Genbank – Taxonomy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Domínio: Eukaryota Chatton, 1925

Supergrupo: SAR (Stramenopiles – Alveolata – Rhizaria)

Subgrupo: Alveolata Cavalier-Smith, 1991

Filo: Apicomplexa Levine 1980, *emend.* Adl *et al.*, 2005

Classe: Conoidasida Levine, 1988

Subclasse: Coccidia Leuckart, 1879

Ordem: Eucoccidiorida Léger, 1911

Subordem: Adeleorina Léger, 1911

Família: Hepatozoidae Wenyon, 1926

Gênero: *Hepatozoon* Miller, 1908

2.2.3 Ciclo de vida e transmissão do *Hepatozoon* spp.

Após o repasto sanguíneo de um ectoparasito em um hospedeiro vertebrado infectado por *Hepatozoon* sp., os gametócitos do parasito penetram a parede do intestino ou hemocele e alcançam os tecidos do invertebrado, onde microgamontes (gametócitos masculinos) e macrogamontes (gametócitos femininos) se associam em singamia (reprodução sexual), culminando com a formação de grandes oocistos poliesporocísticos. Esta é a denominada reprodução sexuada. A transmissão do protozoário ao hospedeiro vertebrado ocorre principalmente pela ingestão dos ectoparasitos infectados, e liberação de esporozoítos dos oocistos, que invadem os tecidos do novo hospedeiro e realizam merogonia em diversos órgãos, especialmente no fígado. Após ciclos de merogonia tecidual, os merozoítos podem se manter em sua forma quiescente (estágio cístico), continuar o processo de merogonia tecidual, ou se disseminar através do sangue, penetrando nas células sanguíneas e se transformando em gametócitos. Os gametócitos são observados em leucócitos, em aves e mamíferos (exceto em marsupiais) e eritrócitos em marsupiais, répteis e anfíbios (Baneth *et al.*, 2007; Demoner *et al.*, 2018; Léveillé *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2024; Smith, 1996; Ungari *et al.*, 2022; Wick *et al.*, 2006).

2.2.4 Características morfológicas dos estágios de parasitos do gênero *Hepatozoon* em mamíferos da ordem Rodentia e Didelphimorphia

Nas infecções descritas em roedores, o meronte precoce está presente no citoplasma do hepatócito e é um corpo esférico com cerca de 12 µm de diâmetro que contém um largo núcleo central. Nesta fase, o vacúolo parasitóforo não é aparente à microscopia ótica. O meronte aumenta de tamanho, enquanto o núcleo se divide, alcançando cerca de 25 a 30 µm, e nesta fase já é possível observar o vacúolo parasitóforo. Os núcleos, cerca de 20 a 30, se organizam nas extremidades em torno de um corpo residual, formando merozoítos curvilíneos alongados com aproximadamente 2,5 a 9 µm (Breshears *et al.*, 2009; Demoner *et al.*, 2019; Miller, 1908). Os gametócitos não apresentam dimorfismo sexual quando observados na corrente circulatória dos hospedeiros intermediários (Miller, 1908). Os gametócitos são alongados e ovóides, com citoplasma de coloração azul pálido, núcleo largo, levemente condensado e granular, ocupando cerca de metade do citoplasma do gametócito (Demoner *et al.*, 2019). Os cistozoítos tem formato ovóide e são mononucleares, podendo ser detectados em diversos tecidos (Demoner *et al.*, 2019).

Nos marsupiais os gametócitos são observados dentro de eritrócitos ou livres no plasma (Ayla *et al.*, 1973; Merino *et al.*, 2009; Regendanz e Kikuth, 1928; Wick *et al.*, 2006). Os gametócitos são ovais a alongados, com citoplasma levemente basofílico, núcleo centralizado ou subterminal e eosinofílico (Silva e Arantes, 1916; Wicks *et al.*, 2006). Silva e Arantes (1916) também observaram formas em tecido pancreático com tamanho variável, mas multinucleares e com tamanho de 6-9 µm a 2-2,5 µm.

2.2.5 Distribuição de infecção por *Hepatozoon* spp. em roedores no mundo

Diversos relatos de infecção por *Hepatozoon* sp. através da observação microscópica do parasito foram descritos em vários hospedeiros vertebrados, e geralmente nomeados de acordo com o hospedeiro onde eram detectados. Assim, por exemplo, foram descritos em roedores *Hepatozoon rattii* Adie, 1907 detectado em *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 na Índia e *Hepatozoon criceti* Nöller, 1912 observado em hamster, *Cricetus frumentarius* Leske, 1779 na Áustria (Wenyon, 1926).

Mais recentemente com o incremento da biologia molecular, infecções por este parasito em roedores foram descritas em diversas regiões do mundo, como: Europa (Baltrunaite *et al.*, 2020; Criado-Fornelio *et al.*, 2009; Galfsky *et al.*, 2019; Laakkonen *et al.*, 2001; Hamsiková *et*

al., 2016; Rigó *et al.*, 2016), Eurasia (Modrý *et al.*, 2021); África (Daman *et al.*, 2020; Harris *et al.*, 2017; Kamani *et al.*, 2018; Maia *et al.*, 2014), Oceania (Hrazdilová *et al.*, 2021), América do Norte (Breshears *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2007; Léveillé *et al.*, 2020), Ásia (Ji *et al.*, 2021; Moustafa *et al.*, 2017; Usluca *et al.*, 2019) e América do Sul (Alabi *et al.*, 2021; Criado-Fornelio *et al.*, 2009; Demoner *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2025; Gomes *et al.*, 2018; Merino *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2025; Perles *et al.*, 2019; Santodomingo *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2018; Weck *et al.*, 2022; Wolf *et al.*, 2016).

2.2.6 Hepatozoon spp. detectados em roedores no Brasil

No Brasil, o primeiro relato de infecção por este parasito em roedores silvestres ocorreu em 1915, no estado de São Paulo, com descrição morfológica de *Hepatozoon akodoni* Carini e Maciel, 1915 em *Akodon fuliginosus* Lichtenstein, 1829 (= *Thaptomys nigrita*). Mais recentemente ocorreu a primeira detecção molecular de *Hepatozoon* sp. em roedor da espécie *Calomys callosus* Rengger, 1830, capturado no Estado de Mato Grosso (Wolf *et al.*, 2016) e uma nova espécie do parasito, *Hepatozoon milleri* Demoner *et al.*, 2019, foi descrita em roedor da espécie *Akodon montensis* Thomas, 1913 em São Paulo, utilizando análises morfológicas e moleculares. Outros relatos de detecção molecular de *Hepatozoon* spp. em pequenos roedores silvestres ocorreram nos estados da Bahia (Perles *et al.*, 2019), Ceará (Perles *et al.*, 2019), Mato Grosso (Pacheco *et al.*, 2025; Perles *et al.*, 2019), Mato Grosso do Sul (Perles *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2018; Weck *et al.*, 2022), São Paulo (Demoner *et al.*, 2016; Weck *et al.*, 2022) e Rio de Janeiro (Perles *et al.*, 2019).

2.2.7 Detecção e distribuição de Hepatozoon spp. em marsupiais no mundo

A primeira descrição de *Hepatozoon* sp. em marsupiais ocorreu na Austrália em *Petaurus sciureus* Shaw, 1791, denominado como *Hepatozoon petauri* Welsh e Barling, 1909 e em *Perameles nasuta* Geoffroy, 1804, denominado *Hepatozoon peramelis* Welsh e Dalyell, 1910 (Wenyon, 1926). Posteriormente, foram descritas infecções por *Hepatozoon didelphydis* em eritrócitos de marsupiais das espécies *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758, *Philander opossum* Linnaeus, 1758 e *Metachirus nudicaudatus* Geoffroy, 1804 na Colômbia (Ayla *et al.*, 1973), em *D. marsupialis*, *D. albiventris*, *P. opossum* e *M. nudicaudatus* na Guiana Francesa (Thoisly *et al.*, 2000), e em *P. opossum* na Costa Rica (Chinchilla-Carmona *et al.*, 2013). Recentemente, novas infecções foram reportadas utilizando técnicas moleculares, na Austrália, em *Sarcophilus harrisii* Boitard, 1841 (Egan *et al.*, 2020; Wick *et al.*, 2006) e Chile, em *Dromiciops gliroides* Thomas, 1894 (Merino *et al.*, 2009).

2.2.8 Hepatozoon spp. detectados em marsupiais no Brasil

A primeira descrição morfológica do parasito em marsupiais no Brasil ocorreu em *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 capturado no município de Meriti, no estado do Rio de Janeiro, sendo o parasito denominado *Hepatozoon (Hemogregarina) didelphydis* Silva e Arantes, 1916. Estes autores observaram gametócitos livres, dentro de eritrócitos e em células pancreáticas do marsupial. Posteriormente, também no estado do Rio de Janeiro, no município de Petrópolis, foi descrita infecção por este parasito que ocupava quase a totalidade de eritrócitos do marsupial da espécie *Metachirus quica*, atual *Philander quica* Temminck, 1824, sugerindo os autores denominá-lo como *Haemogregarina metachiri* (Regendanz e Kikuth, 1928). Recentemente, outras infecções detectadas através de análises moleculares foram descritas em *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (André *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2017), *D. aurita* (Orozco *et al.*, 2022), *D. marsupialis* Linnaeus, 1758 (Colle *et al.*, 2019), *Gracilinanus microtarsus* Wagner, 1842 e *Monodelphis domestica* Wagner, 1842 (Weck *et al.*, 2022) e *Thylamys macrurus* Olfers, 1818 (Sousa *et al.*, 2017).

2.2.9 Diagnóstico de infecção por *Hepatozoon* spp. em mamíferos

Devido ao seu complexo ciclo de vida, estágios de *Hepatozoon* podem ser detectados em uma variedade de tecidos, como fígado, medula óssea, baço, rins, pulmões, intestinos e linfonodos. A depender da espécie de *Hepatozoon*, estes estágios do parasito podem ser detectados por citologia ou histopatologia (Modrý *et al.*, 2017). As técnicas empregadas irão variar de acordo com a espécie do parasito e o resultado dependerá do estágio da doença. A análise de sangue periférico corado sob microscopia ótica é o método mais tradicional para observação dos gametócitos nas células brancas (neutrófilos e monócitos), eritrócitos (marsupiais) ou livres. Porém, quando empregada no diagnóstico de hepatozoonose canina, apresenta baixa sensibilidade nas infecções por *Hepatozoon americanum* Vicent-Johnson *et al.*, 1997 e boa sensibilidade na infecção por *Hepatozoon canis* James, 1905. Por concentrar as células brancas, a técnica de esfregaço da camada branca do sangue (buffy coat) é capaz de aumentar a sensibilidade da técnica em canídeos (Otranto *et al.*, 2011). Porém, estes métodos são efetivos somente se o animal estiver com alta parasitemia (Modrý *et al.*, 2017). Histopatologia também pode ser utilizada tanto para observar os estágios do parasito nos tecidos, como para caracterizar a resposta inflamatória à infecção, sendo especialmente válida nas infecções subclínicas, com poucos gametócitos circulantes no sangue (Modrý *et al.*, 2017).

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional, são as mais sensíveis e específicas, já que são capazes de detectar baixos níveis de parasitemia, sendo consideradas padrão-ouro para o diagnóstico e caracterização de *Hepatozoon* spp. (Thomas *et al.*, 2024). O alvo molecular mais empregado para detecção e caracterização de *Hepatozoon* é o gene *18S rDNA* (Modrý *et al.*, 2017). A detecção de *Hepatozoon* é altamente influenciada pela especificidade do par de *primers* empregado, como o *18S rDNA* é um gene universal, uma gama de apicomplexos podem ser amplificados, logo a escolha do par de *primers* deve refletir o propósito do estudo (Thomas *et al.*, 2024). Para o diagnóstico de *Hepatozoon*, *primers* que amplifiquem sequências curtas são preferenciais porque maximizam a sensibilidade dos resultados já que são mais prováveis de serem amplificados, mas todos os produtos devem ser sequenciados para confirmar a presença do parasito (Modrý *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2024). A PCR em tempo real tem sido empregada por poucos estudos para estimar a prevalência e a intensidade das infecções em carnívoros e répteis (Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Grillini *et al.*, 2023; Maia *et al.*, 2014). Até o momento, as análises filogenéticas de *Hepatozoon* são construídas, quase que exclusivamente, com sequências do gene *18S rDNA*. Este gene é conservado o suficiente para a construção de *primers* universais e para estabelecer relações filogenéticas do filo Apicomplexa ao nível de gênero (Hrazdilová *et al.*, 2021; Schnittger *et al.*, 2012). A pequena subunidade ribossomal é composta de nove regiões, sendo as regiões V2, V4 e V9 as mais hipervariáveis (Thomas *et al.*, 2024).

Para se alcançar relações mais profundas e distinguir a nível de espécie, é sugerida a utilização de marcadores moleculares mitocondriais, especialmente o *cox1*, porém, até o momento, poucas sequências mitocondriais completas deste parasito estão disponíveis, sendo de: *Hepatozoon catesbiana* Stebbins, 1903, obtida em anfíbio *Lithobates clamitans* Latreille, 1801; *Hepatozoon* cf. *griseisciuri*, obtida de esquilo *Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788 e de *Hepatozoon* sp. obtida de *Rattus exulans* Peale, 1848 e de *R. rattus* (Hrazdilová *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2024).

2.2.10 Sinais clínicos de *Hepatozoon* sp. em roedores

Miller (1908) em sua descrição de *Hepatozoon perniciosus* (atual *H. muris*) em roedores infectados descreveu sinais clínicos observados nos animais, como anemia, mucosas, orelhas e pele pálidas, e em caso do animal não se recuperar, culminava com a morte. Este autor também descreveu as alterações observadas durante a necropsia, como músculos e membranas mucosas

pálidas, esplenomegalia, hepatomegalia, hemorragia pulmonar, linfonodos mesentéricos aumentados e hemorrágicos. Recentemente, foi detectado estresse oxidativo nos órgãos vitais, como coração, fígado, rins e pulmão, em roedores naturalmente infectados por *Hepatozoon* sp. no Paquistão, sugerindo danos teciduais e alterações dos parâmetros hematológicos relacionados à infecção (Ljaz *et al.*, 2025).

2.3 A Ordem Piroplasmida

A ordem Piroplasmida foi assim denominada por apresentar sua forma intraeritrocítica em formato piriforme (*Pirum* = pera, em latim) e onde estão incluídos os gêneros *Babesia* Starcovici, 1893, *Cytauxzoon* Neitz e Thomas, 1948 e *Theileria* Bettencourt *et al.*, 1907 (Allsopp e Allsopp, 2006; Schnittger *et al.*, 2022). Os piroplasmas são hemoparasitos intracelulares obrigatórios transmitidos por carrapatos ixodídeos para mamíferos e aves. Nesta ordem de parasitos muitas características morfológicas e de desenvolvimento são compartilhadas, porém nas linhagens evolutivas reconhecidas são observadas características específicas únicas (Jalovecka *et al.*, 2018).

Os invertebrados ixodídeos, são os hospedeiros definitivos dos membros desta ordem, onde ocorre a reprodução sexuada do parasito através de gametogonia (singamia) e propagação assexuada por esporogonia, enquanto nos hospedeiros intermediários (vertebrados) ocorre a propagação assexuada por esquizogonia e/ou merogonia (Schnittger *et al.*, 2012, 2022; Uilenberg *et al.*, 2006).

2.3.1 Ciclo de vida dos Piroplasmas

Segundo Jalovecka e colaboradores (2018) o ciclo de vida dos piroplasmas é considerado parcialmente elucidado. O ciclo se inicia com os esporozoítos do parasito sendo transmitidos para os hospedeiros vertebrados através da saliva dos carrapatos ixodídeos durante o repasto sanguíneo. Há uma diferenciação de célula sanguínea inicialmente infectada que varia de acordo com a espécie de piroplasmas (Jalovecka *et al.*, 2018).

Nos gêneros *Theileria* Bettencourt, Franca e Borges, 1907 e *Cytauxzoon* Neitz e Thomas, 1848 os esporozoítos do parasito invadem inicialmente as células nucleadas: macrófagos, monócitos e linfócitos, se multiplicam por divisão binária longitudinal, em um processo chamado esquizogonia ou merogonia, produzindo os merozoítos, que, posteriormente, invadem os eritrócitos (Shaw, 2003). Nas espécies de *Theileria* transformadoras, as células de defesa infectadas sofrem divisão contínua, como células cancerígenas, e invadem diversos tecidos do hospedeiro, propagando a infecção. Já nas espécies não transformadoras de *Theileria* ou *Cytauxzoon*, os esquizontes se desenvolvem nos leucócitos, mas não induzem transformação neoplásica. Por fim, os esquizontes invadem os eritrócitos e se desenvolvem em merozoítos que se dividem uma vez ou duas vezes (cruz de Malta) durante a merogonia (Schnittger *et al.*, 2022). O processo de invasão dos esporozoítos nas células nucleadas do sangue é complexo, e como os esporozoítos são imóveis, o contato do parasito com a membrana da célula hospedeira ocorre ao acaso, sendo todo o processo concluído em cerca de três minutos, o que é considerado um processo lento em comparação com outros apicomplexos (Jalovecka *et al.*, 2018; Shaw, 2003). Os merozoítos intraeritrocitários se desenvolvem em gametócitos e são ingeridos por outro carrapato durante o repasto sanguíneo (Schnittger *et al.*, 2022).

Nos parasitos do gênero *Babesia* a multiplicação assexuada ocorre exclusivamente no interior dos eritrócitos, sendo denominada merogonia. O contato do parasito com as células do hospedeiro também ocorre ao acaso, sendo a orientação e penetração do parasito mediada por proteínas secretadas pelo complexo apical (Schreeg *et al.*, 2016; Soldati *et al.*, 2004). Os esporozoítos de *Babesia* internalizam nos eritrócitos, se transformam em trofozoítos e se

dividem assexuadamente por merogonia para produzirem os merozoítos. Os merozoítos maduros rompem as células invadidas e invadem outras células sadias. Em determinado momento se diferenciam em gametócitos dentro do carrapato, se fundem através da singamia (fusão dos gametas) e se transformam em oocineto (zigoto móvel), um estágio diplóide, e posteriormente, invadem a matrix peritrófica e o epitélio intestinal do invertebrado (Jalovecka *et al.*, 2019). Consequentemente, ocorre a meiose e replicação assexuada intracelular com formação de cinetos primários. Estes cinetos invadem as glândulas salivares dos carrapatos nas infecções por *Theileria* onde sofrem esporogonia. No caso das infecções por *Babesia*, além da glândula salivar, invadem outros tecidos do carrapato e por replicação assexuada, produzem os esporozoítos (Schnittger *et al.*, 2022).

2.3.2 Reconstruções filogenéticas dos Piroplasmas (18S rDNA)

Utilizando para análise filogenética sequências de *18S rDNA* quase completas, foi proposta a divisão das linhagens de piroplasmas em seis grupos filogenéticos (Anexo I): Clado I, com piroplasmas que infectam roedores (*Babesia microti* e *B. rodhaini*) e felídeos (*Babesia leo* e *Babesia felis*), Clado II, infectam carnívoros, cervos, ovelhas e humanos, como hospedeiros acidentais (*B. conradae* e *B. duncani*), Clado III, contem *Theileria youngi*, *Theileria bicornis* e *Babesia* sp. isolada de capivara e *Cytauxzoon* spp., Clado IV, contém *B. bicornis* e *Theileria equi*, Clado V, contendo *Theileria s.s.* que infectam exclusivamente ungulados, como *Theileria annulata*, *Theileria parva*, *Theileria lestoquardi* (sendo leucócito proliferativas) e *Theileria buffeli* (não leucócito proliferativa) e Clado VI, contendo *Babesia s.s.*, como *Babesia gibsoni*, *Babesia canis*, *Babesia rossi*, *Babesia vogeli*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia caballi* e *Babesia ovis* (Schnittger *et al.*, 2012).

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa observou que o estudo anterior teve uma abordagem antropocêntrica, ao ignorar os parasitos que não tinham relações diretas (zoonoses) ou indiretas (animais domésticos como hospedeiros) com os humanos, o que limitava o conhecimento biológico real da ordem (Schnittger *et al.*, 2022). Assim uma nova proposta utilizando sequências longas de *18S rDNA* (>1600 pb), foi sugerida com a reconstrução de 10 grupos/clados (Anexo II): Clado I, formado pelo grupo *Babesia microti*-like composto por *B. microti*, *B. vulpes*, *B. rodhaini* e *B. felis*; Clado II, grupo Monotremata, com *Theileria ornithorhynchi*; Clado III, ou Western (*Babesia l.s.*) composto por *B. duncani*, *B. lengau* e *B. conradae*; Clado IV grupo Marsupialia (*Theileria l.s.*); Clado V, grupo Percei (*Babesia l.s.*) que infectam aves, composto por *B. percei*, *B. poelea* e *B. ugwiensis*; Clado VI grupo Rhinocerotidae (*Theileria l.s.*), composto por *T. bicornis*; Clado VII composto por *Cytauxzoon* spp.; Clado VIII (*Theileria l.s.*) grupo *Equus*, composto por *T. equi* e *Theileria haneyi*; Clado IX (*Theileria s.s.*) composto por *T. annulata*, *T. parva*, *T. lestoquardi* e *T. orientalis* e Clado X (*Babesia s.s.*) composto por *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. canis* e *B. ovis* (Jalovecka *et al.*, 2019). Porém, novas descrições de infecção natural por piroplasmas em mamíferos silvestres da América do Sul tem sugerido possíveis novos clados filogenéticos (Gonçalves *et al.*, 2021; Ikeda *et al.*, 2021; Krawczak *et al.*, 2023; Mongruel *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2023; Pacheco *et al.*, 2025; Santodomingo *et al.*, 2022).

Segundo Schnittger e colaboradores (2022) a análise filogenética baseada no gene *18S rDNA* revela que *Babesia*, *Cytauxzoon* e *Theileria* representam um agrupamento polifilético que requer revisão taxonômica.

2.3.3 O gênero *Babesia*

Babesia é um parasito apicomplexo transmitido por carrapatos ixodídeos, e que tem estratégias únicas para completar seu ciclo de vida e transmissão, objetivando perpetuar sua propagação e garantir sua transmissão através de estágios infectivos específicos (Jalovecka *et al.*, 2019). No passado, os membros do gênero eram divididos pelo tamanho e forma dos trofozoítos e pelo hospedeiro de origem, sendo classificados em dois grupos: pequena e grande *Babesias*. Porém esta divisão não foi sustentada pelas análises moleculares, pois não estão relacionadas ao parentesco genético (Schreeg *et al.*, 2016; Yabsley e Shock, 2013).

A atual classificação dos piroplasmas, baseada em análises filogenéticas, revela que *Babesia* e *Theileria* representam um grupo polifilético, cujas linhagens estão associadas aos táxons dos seus respectivos hospedeiros vertebrados, sugerindo coespeciação com táxons de mamíferos e aves. Porém, *Babesia stricto sensu* é uma exceção, já que parasita múltiplos e diversos hospedeiros entre aves e mamíferos. Desta forma as espécies de *Babesia* têm sido divididas em *Babesia stricto sensu* (*Babesia s.s.*) e *Babesia lato sensu* (*Babesia l.s.*) (Jalovecka *et al.*, 2019; Schreeg *et al.*, 2016).

Na *Babesia s.s.*, os cinetos podem invadir os ovários e ovos do carrapato e se propagar para a próxima geração através da transmissão transovariana. Enquanto nos gêneros *Theileria* e *Babesia lato sensu* (*Theileria l.s.* e *Babesia l.s.*) ocorre transmissão transestadial, o que garante a perpetuação do parasito para o próximo estágio de desenvolvimento do carrapato (Schnittger *et al.*, 2022). Enquanto na *Babesia l.s.* não ocorre a esquizogonia e nem a transmissão transovariana (Jalovecka *et al.*, 2019).

Babesia l.s. se distingue claramente de *Babesia s.s.* e é representada por três diferentes linhagens evolutivas: grupo Percei (*Babesia percei*, *Babesia poelea* e *Babesia ugwidensis*) que infectam aves, grupo Western (*Babesia duncani*, *Babesia lengau* e *Babesia conradae*) que infectam herbívoros, carnívoros e humanos (hospedeiro acidental) e o grupo *Babesia microti-like* (*Babesia microti*, *Babesia vulpes*, *Babesia rodhaini* e *Babesia felis*) que infectam humanos, canídeos, mustelídeos, roedores e felídeos, com assinaturas moleculares e hospedeiros definitivos (Jalovecka *et al.*, 2019).

A esporogonia dos parasitos do gênero *Babesia* ocorre dentro das glândulas salivares do carrapato. Para garantir sua sobrevivência durante as mudas do carrapato, os cinetos se transformam em sincício polimorfo, um esporoblasto dormente que é ativado quando o carrapato infectado se liga a outro hospedeiro vertebrado, o que ocorre uma vez a cada estágio da vida dos carrapatos ixodídeos (Jalovecka *et al.*, 2019).

Além da transmissão biológica através do vetor, já foi descrita a transmissão de *Babesia* spp. através de transfusão sanguínea em cães (Stegeman *et al.*, 2003) e humanos (Young *et al.*, 2012), de transmissão vertical em cães (Fukumoto *et al.*, 2005) e humanos (Joseph *et al.*, 2012) e de transplante de órgãos em humanos (Waked e Krause, 2022).

2.3.4 Posição taxonômica de *Babesia* spp.

A classificação taxonômica de protozoários do gênero *Babesia* foi apresentada de acordo com as revisões da Sociedade Internacional de Protozoologia (Adl *et al.*, 2012, 2019) e todos os táxons foram consultados como válidos no banco de dados do GenBank – (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

Domínio: Eukaryota Chatton, 1925

Supergrupo: SAR (Stramenopiles – Alveolata – Rhizaria)

Subgrupo: Alveolata Cavalier-Smith, 1991

Filo: Apicomplexa Levine, 1980, *emend.* Adl *et al.*, 2005

Classe: Aconoidasida Mehlhorn *et al.*, 1980 (= Hematozoa Vivier, 1982)

Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1926

Família: Babesiidae Poche, 1913

Gênero: *Babesia* Starcovici, 1893

2.3.5 *Babesia* spp. em animais domésticos no mundo

Babesia é considerado o protozoário intracelular mais comum entre os transmitidos por carrapatos para mamíferos e por terem seus vetores invertebrados, os carrapatos ixodídeos, distribuídos mundialmente, é o parasito mais comum entre os animais de vida livre (Jalovecka *et al.*, 2018; Schnittger *et al.*, 2012). Historicamente estes parasitos eram classificados pelo tamanho relativo em pequena (1 a 2.5 μm) e grande *Babesia* (3 a 5 μm), pela forma dos trofozoítos e número de merozoítos nos eritrócitos e pelo hospedeiro de origem (Yabsley e Shock, 2013).

Posteriormente, observou-se que a divisão pelo tamanho não refletia as relações evolutivas (Schreeg *et al.*, 2016; Yabsley e Shock, 2013). São descritas mais de 100 espécies infectando mamíferos e aves, mas provavelmente muitas ainda permanecem desconhecidas (Chauvin *et al.*, 2009). Estes protozoários causam doença em animais domésticos, silvestres e, acidentalmente, em humanos (Hunfeld *et al.*, 2008). Os piroplasmas que acometem os animais de companhia, de criação e os humanos estão agrupados em seis clados, tendo o seu ciclo de vida e hospedeiros definitivos conhecidos, em sua maioria (Schnittger *et al.*, 2012).

Entre os bovinos, *Babesia bovis* Babes, 1888, *Babesia bigemina* Smith e Kilborne, 1893, *Babesia divergens* M'fadyean e Stockman, 1911 são responsáveis por maior impacto na saúde animal e produtividade, em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Bock *et al.*, 2004; Schnittger *et al.*, 2022). Pertencem ao gênero *Rhipicephalus* Koch, 1844 e subgênero *Boophilus* Curtice, 1891 os carrapatos que transmitem *B. bovis* e *B. bigemina*. Enquanto os carrapatos do gênero *Ixodes* são responsáveis pela transmissão da *B. divergens*, que é mais restrita geograficamente e com importância zoonótica (Schnittger *et al.*, 2022). Outras espécies que afetam bovinos como *Babesia ovata* Minami e Ishihara, 1980 (Ásia) e *Babesia major* (Ásia e Europa) tem distribuição geográfica mais limitada e são transmitidas por carrapatos do gênero *Haemaphysalis* sp. Cooley, 1946. *Babesia orientalis* Zhao *et al.*, 1997 tem baixa virulência entre bovinos, mas os bubalinos são mais susceptíveis, sendo transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus haemaphysaloides* Supino, 1897 e reportada na Ásia (Schnittger *et al.*, 2022). Os búfalos também podem ser infectados por *B. bigemina* e *B. bovis* (Uilenberg *et al.*, 2006).

Entre os ovinos e caprinos, a *Babesia ovis* Babes, 1888 é transmitida por carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, ocorrendo na Europa, África, Ásia e Oriente Médio (Schnittger *et al.*, 2022; Uilenberg *et al.*, 2006). Outras espécies são associadas com infecções em pequenos ruminantes como *B. crassa* e *B. motasi*, a primeira com vetor desconhecido e a segunda transmitida por carrapatos do gênero *Haemaphysalis* Neumann, 1901 (Schnittger *et al.*, 2022; Uilenberg *et al.*, 2006).

Os equinos, bem como as zebras e asininos, podem ser infectados por *Babesia caballi* Nuttall e Strickland, 1912 que é transmitida por carrapatos dos gêneros *Dermacentor* Koch, 1844, *Hyalomma* Koch, 1844 e *Rhipicephalus* e ocorre nas regiões tropicais do mundo (Uilenberg *et al.*, 2006). Este piroplasma tem importância mundial por afetar a população de equídeos onde há ocorrência do vetor competente, causando doença crônica e afetando o trânsito de seus hospedeiros (Schnittger *et al.*, 2022).

As espécies de *Babesia* que infectam os cães domésticos incluem *B. vogeli* Zahler *et al.*, 1999 (distribuição mundial), *B. canis* (Europa), *B. rossi* Nuttall, 1910 (África do Sul, Nigéria e Sudão), *B. gibsoni* Patton, 1910 (Sudeste da Ásia, EUA, Austrália e Europa), *B. vulpes* Baneth *et al.*, 2015 (Europa e Norte da África), *B. conradae* Kjemtrup *et al.*, 2006 (USA e China), *B. negevi* Baneth *et al.*, 2020 (Israel) e *Babesia* sp. Coco Birkenheuer *et al.*, 2020 (EUA), sendo transmitidas por carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus* (Schnittger *et al.*, 2022; Uilenberg *et al.*, 2006).

Existem poucos relatos de babesiose felina, mas algumas espécies foram descritas infectando os felinos domésticos, como *Babesia panickeri* Panicker *et al.*, 2020, *Babesia hongkongensis* Wong *et al.*, 2012, *Babesia canis* subespécie *presentii* Baneth *et al.*, 2004, *Babesia* sp. Cabo Ocidental Irwin *et al.*, 2004, *Babesia lengau* Bosman *et al.*, 2010, *Babesia felis* Davis, 1929 e *Babesia leo* Penzhorn *et al.*, 2001 (Schnittger *et al.*, 2022).

2.3.6 Piroplasmas detectados em pequenos mamíferos

Roedores silvestres foram descritos infectados por piroplasmas do grupo *Babesia microti* em países da América do Norte, Ásia e Europa (Goethert *et al.*, 2006; Saito-Ito *et al.*, 2004; Tolkacz *et al.*, 2017; Tsuji *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2024). Na Austrália algumas espécies de *Babesia* foram descritas através de análise morfológica em monotremados, como *Babesia tachyglossi* Backhouse e Bolliger, 1959 e em marsupiais, como *Babesia thylacis* Mackerras, 1959. Utilizando uma abordagem de taxonomia integrativa, com análise filogenética multi-gênica (*18S rDNA*, *cox3* e *cytb*) e microscopia ótica, em amostras de marsupiais nativos da Austrália, foram descritas espécies de *Theileria* spp. que diferiam das conhecidas naquele país, formando novos subclados (Barbosa *et al.*, 2019). Também utilizando uma abordagem semelhante foi detectada infecção por *Babesia* sp. em roedor da espécie *Phyllotis darwini* Waterhouse, 1837 no Chile, sendo observado que as sequências obtidas se agruparam próximas às sequências do grupo *Babesia microti* na análise filogenética (Santodomingo *et al.*, 2022). Outras sequências de *Babesia* sp. também obtidas neste estudo, em roedores das espécies *Phyllotis darwini* Waterhouse, 1837 e *Abrothrix jelskii* Thomas, 1894 se aproximaram do clado com as sequências obtidas em morcegos da espécie *Phyllostomus discolor* Wagner, 1843 do Brasil (Ikeda *et al.*, 2021; Santodomingo *et al.*, 2022).

No Brasil a primeira descrição morfológica de infecção por *Babesia* spp. em marsupial ocorreu em *Metachirus quica*, atual *Philander quica* Temminck, 1824, capturado em Petrópolis, no estado do Rio de Janeiro, sendo o parasito denominado como *Nuttalia brasiliensis* (Regendanz e Kikuth, 1928). Posteriormente, piroplasmas observados em esfregaços sanguíneos de *Didelphis paraguayensis* (atual *Didelphis pernigra* Allen, 1900) foram descritos como *Nuttalia equi* Laveran, 1901, na Colômbia (Garcia, 1945). Em seguida, infecção por piroplasma foi descrita em *Didelphis marsupialis* Lund, 1758, no Pará, sendo relacionada pelos autores à *N. brasiliensis* descrita anteriormente (Deane e Deane, 1961). No município de Itaguaí (atual Seropédica), no estado do Rio de Janeiro, foi descrita infecção natural por *N. brasiliensis* em marsupiais da espécie *Philander opossum quica* (atual *Philander quica*) com observação de estruturas polimórficas em eritrócitos, incluindo a forma em cruz de Malta (Lopes *et al.*, 1973). Na Venezuela, espécimes de *D. marsupialis* foram detectados infectados por *Babesia brasiliensis* (Herrera e Urdaneta-Morales, 1991). Posteriormente, uma revisão taxonômica propôs a transferência deste parasito para o gênero *Babesia*, já que o gênero *Nuttalia* era utilizado em moluscos, destacando que seria sinônimo de *Theileria brasiliensis*, apesar de esquizontes não terem sido observados em leucócitos sanguíneos (Sampaio e Massard, 2004).

Também através de análise morfológica, foi detectada a primoinfecção por *Babesia* sp. em eritrócitos de roedores das espécies *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769 e *Oligoryzomys nigripes* Olfers, 1818 no estado do Rio de Janeiro (Gazeta *et al.*, 2004) e, posteriormente, em roedores das espécies *Akodon montensis*, *Delomys sublineatus* Thomas, 1903 e *Nectomys squamipes* Brants, 1827 e de *Theileria* sp. em *Akodon montensis* capturados nas regiões serranas dos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Silva *et al.*, 2007).

Com o uso das técnicas moleculares utilizando o gene *18S rDNA*, outros relatos de infecção por piroplasmas foram reportados no Brasil, com a primeira detecção, através deste método, reportada em capivara, *Hydrochoeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766, um roedor de grande porte, demonstrando o hemoparasito 90% de similaridade com *T. equi* Laveran, 1901

(Criado-Fornelio *et al.*, 2009). Posteriormente, *Babesia* sp., foi detectada em pequenos mamíferos capturados no Pantanal de Mato Grosso, no município de Poconé, em marsupial da espécie *Monodelphis domestica* Wagner, 1842 e roedores da espécie *Thrichomys pachyurus* Wagner, 1845 (Wolf *et al.*, 2016). Em um estudo no bioma Amazônia, piroplasmas foram detectados em roedor da espécie *Dasyprocta* sp. Illiger, 1811, capturado em Mato Grosso, além de *Cuniculus paca* Linnaeus, 1766 e marsupiais das espécies *Didelphis marsupialis* e *Metachirus nudicaudatus* Geoffroy, 1803, capturados no Pará (Soares *et al.*, 2017). Posteriormente, infecção por *Babesia* sp. foi detectada em roedores da espécie *Thrichomys fosteri* Trouessart, 1880, capturados no Pantanal de Mato Grosso do Sul (Sousa *et al.*, 2018). Em seguida, foi reportada infecção por *Babesia* sp. em marsupiais da espécie *D. marsupialis*, no estado de Mato Grosso (Colle *et al.*, 2019).

Aliada à observação microscópica de merozoítos em esfregaços sanguíneos, foi utilizada uma abordagem multigênica (*18S rDNA*, *cox1* e *hsp70*) para reportar infecção por *Babesia* sp. em marsupiais da espécie *Didelphis albiventris* capturados nos estados de Mato Grosso do Sul e Brasília, que formavam um clado distinto de outras espécies de *Babesia* (Gonçalves *et al.*, 2021). Um estudo em capivaras capturadas em Goiás utilizou abordagem microscópica e análise molecular (gene *18S rDNA*) para reportar infecção por *Babesia* sp. (Neves *et al.*, 2023). Posteriormente, utilizando uma abordagem microscópica e de multigenes (*18S rDNA*, *hsp70*, *cox3*), este piroplasma detectado em capivaras foi caracterizado como uma nova espécie, *Babesia goianiaensis*, ao demonstrar uma alta divergência genética de outros piroplasmas e se posicionar em um clado separado na análise filogenética (Krawczak *et al.*, 2023). Espécimes de *Didelphis aurita* recolhidos em centros de reabilitação de animais silvestres no Rio de Janeiro (CETAS-RJ/Seropédica e CRAS) demonstraram positividade nas amostras de sangue analisadas com microscopia e amplificação dos genes *18S rDNA* e *cox3* na PCR, demonstrando na análise filogenética uma proximidade com outras sequências obtidas em marsupiais de estudo prévio no Brasil, sendo sugerido nomear este clado como Grupo Marsupialia da América do Sul (Oliveira *et al.*, 2023). Recentemente, corroborando esta hipótese, sequências do gene *18S rDNA* de *Babesia* sp., recuperadas de *Didelphis albiventris* capturados na Província de Formosa, Argentina, agruparam-se com as sequências obtidas em marsupiais e carrapato associado a marsupial didelídeo do Brasil (Sebastian *et al.*, 2025). Em oposição, sequências dos genes *18S rDNA*, *cox-1* e *cytb*, obtidas de infecção natural por *Babesia* sp. em marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis* capturados na Guatemala, agruparam-se junto ao clado do grupo Western onde estão incluídas *B. duncani* e *B. conradae*, conhecidas por seu potencial zoonótico (Thomas *et al.*, 2023).

Recentemente, um novo grupo de piroplasmas foi sugerido e denominado de Grupo Rodentia da América do Sul, utilizando análise filogenética de sequências de *18S rDNA* e de *cytb* obtidas de roedores equimídeos da espécie *Thrichomys pachyurus*, capturados no estado de Mato Grosso, e que formaram um clado separado dos demais piroplasmas na análise filogenética, sendo clado irmão de piroplasmas detectados em morcegos da espécie *Phyllostomus discolor* (MT, Brasil) (Pacheco *et al.*, 2025).

2.3.7 Diagnóstico de infecção por *Babesia* spp. em mamíferos

O diagnóstico de infecção por *Babesia* spp. pode ser obtido através da microscopia ótica com observação do parasito no interior dos eritrócitos, porém como a morfologia dos parasitos do gênero *Babesia* pode variar, principalmente em se tratando de um hospedeiro aberrante, outro método de detecção do parasito deve ser utilizado (Yabsley e Shock, 2013). Assim, dados moleculares de sequências devem ser acrescentados ao diagnóstico, com genes nucleares, sendo o gene *18S rDNA* o mais utilizado, e mitocondriais, principalmente o citocromo oxidase subunidade I (Scheereg *et al.*, 2016). Segundo Hrazdilová e colaboradores (2020) o gene *cox1*

é o melhor alvo para diferenciação de espécies intimamente relacionadas por possuir maior diversidade de sequência interespecífica do que intraespecífica.

2.3.8 Sinais clínicos de babesiose em mamíferos

As manifestações clínicas irão depender da espécie e do hospedeiro, mas em animais de criação e de companhia a babesiose está associada à anemia, hepato e esplenomegalia, taquicardia, febre, inapetência, hemoglobinúria, podendo ser fatal (Schnittger *et al.*, 2022). Como afeta gravemente a saúde, tem impacto na produtividade de animais de criação, causando abortos, perdas na produção de leite e carne (Bock *et al.*, 2004).

Na primeira descrição de *N. brasiliensis* (atual *B. brasiliensis*) os autores observaram anemia e fraqueza nos dois marsupiais infectados, após o procedimento de esplenectomia (Regendanz e Kikuth, 1928). Garcia (1945) descreveu sinais clínicos em *D. paraguayensis* (atual *Didelphis pernigra*) inoculados experimentalmente com *N. equi* como perda de apetite, palidez das mucosas, perda de peso, icterícia e febre. Enquanto alta temperatura corpórea foi relacionada à elevação da parasitemia em didelfídeos das espécies *D. albiventris*, *D. marsupialis* e *Philander opossum* (atual *P. quica*) naturalmente infectados por *Babesia ernestoi* (atual *Babesia brasiliensis*) (Serra-Freire *et al.*, 1979). Neste estudo, espécimes de *D. marsupialis* submetidos à infecção experimental por este parasito, e induzidos à imunossupressão e esplenectomia, demonstraram sinais clínicos como febre, apatia e anorexia, com desfecho fatal (Serra-Freire *et al.*, 1979). Sinais clínicos semelhantes foram observados em um *D. aurita* naturalmente infectado por *Babesia* sp., mantido em cativeiro, como letargia, perda de peso, febre, membranas pálidas e ictéricas (Oliveira *et al.*, 2023).

Roedores das espécies *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus* utilizados como modelo para infecção experimental de *Babesia canis*, através da via oral (gavagem), não demonstraram alterações em seu estado de saúde durante o experimento, porém o exame histológico realizado 30 dias após a gavagem, apresentou alterações histopatológicas, como congestão hepática e renal (Corduneanu *et al.*, 2020).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo e manipulação de pequenos mamíferos

Para capturar os pequenos mamíferos deste estudo, foram montadas armadilhas dos modelos Sherman® e Tomahawk®, durante quatro a seis noites seguidas nos municípios de Ponta Grossa – PG (25°11'58.82"S, 49°57'10.33"W), Cruz Machado - CM (26°4'25.7"S, 51°25'0.5"W) e Lidianópolis - LD (24°8'15.02"S, 51°38'25.60"W) no estado do Paraná, e de Nova Friburgo – NF (22°13'23"S, 42°38'16"W) e Iguaba Grande - IG (22°50' 21.01"S, 42°13'44.00"W) no estado do Rio de Janeiro, localizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, respectivamente (Figura 2).

As áreas de estudo na região sul (Estado do Paraná) estão inseridas no bioma Mata Atlântica com presença de pinheiros da espécie *Araucaria angustifolia* (Floresta ombrófila mista) em CM (Figura 3) e apresentando a presença de *A. angustifolia* e de Campos Naturais em PG (Figura 4) (Kottek *et al.*, 2006). O município de LI está localizado na região da floresta Semidecídica Sazonal e todas as três áreas de estudo apresentam clima temperado subtropical (Figura 5). Nova Friburgo está inserida na região serrana da Mata Atlântica do Rio de Janeiro, caracterizada pelo clima tropical de altitude (Figura 6) (Peel *et al.*, 2007). Em contraste, IG está localizada na “Região dos Lagos”, onde a captura de roedores ocorreu em vegetação característica do ecossistema de restinga, situado ao longo da área costal do bioma Mata Atlântica (Figura 7).

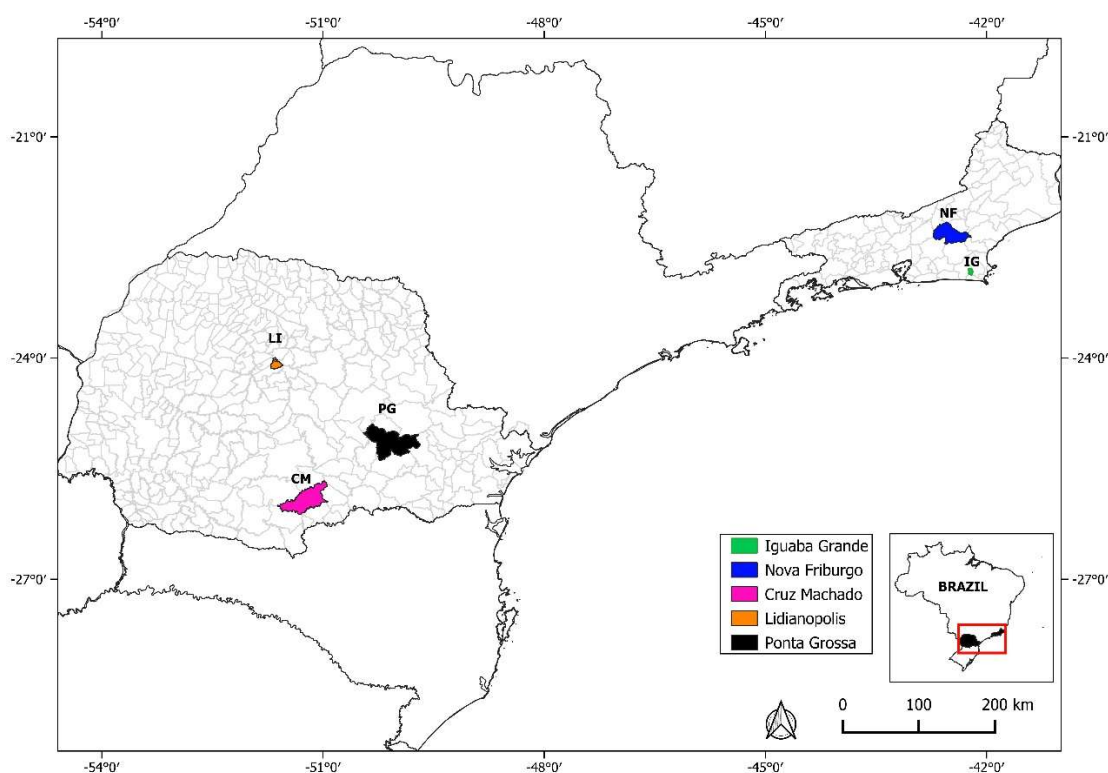


Figura 2. Mapa demonstrando os municípios com captura de pequenos mamíferos no Estado do Rio de Janeiro: Nova Friburgo e Iguaba Grande e Estado do Paraná: Cruz Machado, Lidianópolis e Ponta Grossa no período de 2019 a 2021.

As expedições para captura de pequenos mamíferos ocorreram entre 2019 e 2022. Em NF ocorreram quatro expedições, enquanto nos demais municípios apenas uma. As armadilhas

foram vistoriadas e iscadas diariamente pela manhã com mistura de banana, aveia, amendoim e bacon. Os espécimes capturados foram removidos para um laboratório de campo com nível de biossegurança 3 (D'Andrea *et al.*, 2021; Lemos *et al.*, 2014). Os animais receberam anestesia geral (Cloridrato de Quetamina 200mg/kg associada com Cloridrato de Xilazina 20mg/kg), por via intramuscular ou intraperitoneal, seguindo protocolo de ética da Fiocruz (L-036/2018). Após anestesiados, foi coletado sangue por cardiopunção para elaboração de esfregaços e a morte induzida por inoculação de Tiopental Sódico 5% (120 mg/kg), também por via intracardiaca. Após constatada a morte do animal, foram coletadas amostras de fígado em solução de estabilização RNA Later® para realização de análises moleculares. Posteriormente, os roedores foram taxidermizados, identificados através de análises morfológicas, citogenéticas e moleculares, e depositados na Coleção de Mamíferos Silvestres Reservatórios (COLMASTO) do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ / RJ) (D'Andrea *et al.*, 2021). A coleta de pequenos mamíferos foi autorizada pelas licenças SIBIO-ICMBIO 13373 e 63846.

3.2 Elaboração de esfregaços sanguíneos para pesquisa e análises de hemoparasitos

Foram preparados dois esfregaços sanguíneos por animal, e após secos, fixados em metanol absoluto por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram coradas com corante Giemsa (Merck®) na diluição de 1:10 por 45 minutos. Após completa secagem ao ar, as lâminas preparadas foram submetidas à microscopia ótica em aumento de 1000x (imersão) utilizando o microscópio Olympus BX-51. Para o estudo morfométrico foi utilizado o software CellSens Versão Standard 2.1. Foi registrado no caso de *Hepatozoon* sp. o comprimento e a largura total dos gametócitos e de seus núcleos para obtenção da média individual, média geral e desvio padrão para cada parâmetro. No caso de *Babesia* sp. foram registrados o comprimento e a largura dos merozoítos, para obtenção da média geral e desvio padrão para cada parâmetro.



Figura 3. Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Cruz Machado, no estado do Paraná.



Figura 4. Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Ponta Grossa, no estado do Paraná.



Figura 5. Áreas de coleta de pequenos mamíferos no município de Lidianópolis, no estado do Paraná.



Figura 6. Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Nova Friburgo, no estado do Rio de Janeiro.



Figura 7. Área de coleta de pequenos mamíferos no município de Iguaba Grande, no estado do Rio de Janeiro.

3.3 Análises estatísticas

O comprimento e a largura de dez gametócitos de *Hepatozoon* spp. e de seus núcleos foram medidos para cada hospedeiro. Os dados gerados foram tabelados para obter as médias e o desvio padrão. A normalidade dos dados foi acessada usando o teste de Liliefors. Para avaliar potenciais diferenças morfológicas dos gametócitos entre grupos pré-definidos (espécies de roedores, localidades e haplótipos) foram aplicados os testes estatísticos de Tukey e Kruskal-Wallis, através do programa BioEstat 5.3 (Ayres *et al.*, 2007).

3.4 Extração de DNA

As amostras de fígado foram conservadas em RNA Later® e, posteriormente, estocadas à -80°C. O DNA genômico foi extraído de 25 mg de fígado dos pequenos mamíferos, em volume final de 200µL, utilizando o DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Anexo III). Posteriormente, as amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, USA) e padronizadas na concentração de 60 ng/µL.

3.5 Análises moleculares

Para verificar a presença de DNA de *Hepatozoon* spp. foi utilizado o protocolo modificado de Ujvari e colaboradores. (2004) que amplifica fragmentos do *18S rDNA* (~600 pb) através de PCR convencional. O volume total da PCR foi de 25 µL contendo 1U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,5 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer (Hep300 e Hep900) e 0,4 mM de dNTPs. Em cada PCR foram utilizados 90 ng de DNA. Em cada reação foram incluídos controles negativos (água ultrapura) e controles positivos de *Hepatozoon canis* de sangue de cão que continha gametócitos em esfregaço sanguíneo corado (este DNA de sangue de cão faz parte do banco de DNA do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores/DPA/IV/UFRRJ).

Posteriormente, para obtenção de fragmentos maiores do gene *18S rDNA* (~1600pb), amostras de DNA positivas na reação anterior, representativas de cada espécie de roedor e marsupial por localidade, foram submetidas a nova reação de nested PCR (nPCR) utilizando para a primeira reação (PCR) os *primers* HAM 1F e HPF 2R (Criado-Fornelio *et al.*, 2006) e para a segunda reação (nPCR), EF-M (Kvicerová *et al.*, 2008) e Hep1615R (Quilfeldt *et al.*, 2018), utilizando o MasterMix Promega®. Em cada reação foram utilizados 1x Master Mix (Taq DNA polymerase 50 units/mL, dNTP 400 µM, MgCl₂ 3 mM), 10 mM de cada primer, 90 ng de DNA (PCR) ou 1 µL do produto amplificado da primeira reação (nPCR) e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

As amostras positivas foram submetidas a uma nPCR para amplificação do gene Citocromo oxidase subunidade 1 (*cox1*), utilizando para a PCR os *primers* Hep_COI_F1 e Hep_COI_R1 (Hrazdilová *et al.*, 2021) e para a nPCR os *primers* Api_LSUG_R (Léveillé *et al.*, 2019) e Hep_COI_R2 (Hrazdilová *et al.*, 2021). O volume total da PCR foi de 25 µL contendo 1U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer e 0,4 mM de dNTPs. Para as reações convencionais foram utilizados 90 ng de DNA (PCR) ou 1 µL do produto amplificado nas reações de nested PCR (nPCR) e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

Os parâmetros de ciclagem e as sequências dos *primers* utilizados para amplificar sequências de *Hepatozoon* spp. neste estudo estão na tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação de parasitos do gênero *Hepatozoon*, nomes dos *primers*, tipo de reação, sequência dos *primers*, tamanho da banda, condições termais e referência.

<i>Primers</i>	Reação	Sequência do primer	Tamanho (pb)	Condições termais	Referência
Hep300 Hep900	PCR	GTCTCTGACCTATCAGCTTTCGACG CAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC	600	94°C por 4 m; 35 ciclos: 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 1 m; 72°C por 7 m	Ujvari <i>et al.</i> , 2004
HAM 1F HPF 2R	PCR	GCCAGTAGTCATATGCTTGTC GACTTCTCCTTCGTCTAAG	1800	95°C por 5 m; 40 ciclos: 95°C por 45s, 52°C por 45s e 72°C por 1 m; 72°C por 7 m	Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2006
EF-M Hep1615	nPCR	AAACTGCAAATGGCTCATT AAAGGGCAGGGACGTAATC	1600	95°C por 5 m; 40 ciclos: 95°C por 45s, 55°C por 45s e 72°C por 1 m; 72°C por 7 m	Kvicerová <i>et al.</i> , 2008 Quilfeldt <i>et al.</i> , 2018
4558 2733	PCR	GCTAATACATGAGCAAAATCTCAA CGGAATTAACCAGACAAAT	1120	94°C por 3 m; 40 ciclos: 94°C por 1 m, 55°C por 2 m e 72°C por 2 m; 72°C por 7 m	Mathew <i>et al.</i> , 2000 Wozniak <i>et al.</i> , 1994
Hep_COI_F1 Hep_COI_R1	PCR	TAGTAACTACTGAAGGAGCAAGC GTGTTAYTTCTAGCCCGTATAGG	1900	95°C por 5 m; 40 ciclos: 95°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	Hrazdilová <i>et al.</i> , 2021
Api_LSUG-R Hep_COI_R2	nPCR	AGATAGGGAACAACTGYCTCAA TATCAGGACTCTAATTGCGACAG	1800	95°C por 5 m; 40 ciclos: 95°C por 30s, 62°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	Levéillé <i>et al.</i> , 2019 Hrazdilová <i>et al.</i> , 2021

Abreviaturas: pb, pares de base; PCRc, PCR convencional; nPCR, nested PCR, °C. graus centígrados; m, minuto(s); s, segundo(s).

Para verificar a presença de DNA de piroplasmas inicialmente foi realizado o protocolo modificado de Jefferies e colaboradores (2007) para amplificar uma região parcial (~800 pb) de *18S rDNA*, utilizando uma reação de nested PCR (nPCR). O volume total das reações foi de 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer BTF1 e BTR1 e 0,4 mM de dNTPs. Na primeira reação foram utilizados 90 ng de DNA (PCR), enquanto na segunda reação foi utilizado 1 µL do produto da primeira reação (nPCR). Para a segunda reação (nPCR) foram utilizados os *primers* BTF2 e BTR2. Em todas as reações foram incluídos controles negativos (água ultrapura) e controles positivos de *Babesia canis* de sangue de cão (pertencente ao banco de DNA do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores /DPA/IV/UFRRJ).

Posteriormente, para obtenção de fragmentos maiores de gene *18S rDNA* (~1600pb) as amostras positivas na reação anterior foram submetidas a uma nova reação de PCR convencional utilizando os *primers* NBabesia1F (Oosthuizen *et al.*, 2008; Bhoora *et al.*, 2009) e 18SRev-TB (Matijla *et al.*, 2008; Bhoora *et al.*, 2009). O volume total da reação foi de 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,5 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer e 0,4 mM de dNTPs. Para o sequenciamento dos produtos amplificados desta reação foram utilizados, além dos *primers* citados acima, os *primers* internos BT18S2F (Oosthuizen *et al.*, 2008), BT18S2R (Oosthuizen *et al.*, 2008), BT18S3F (Matijla *et al.*, 2008) e BT18S3R (Bhoora *et al.*, 2009).

Objetivando amplificar cerca de 600 pb do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade III (*cox3*), dos gêneros *Babesia* e *Theileria*, foi realizado o protocolo modificado de Schreeg e colaboradores (2016) em todas as amostras deste estudo. Para tal, foi realizada uma reação de PCR convencional utilizando os *primers* Cox3F e Cox3R. O volume total da reação foi de 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,0 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer e 0,4 mM de dNTPs.

Posteriormente, as amostras positivas foram submetidas a novas reações objetivando amplificar os genes: Citocromo Oxidase subunidade I (*cox1*), Citocromo B (*cytb*), *hsp70* e *ITS-1*. Para amplificar o gene mitocondrial *cox1* (~1250 pb), as amostras foram submetidas a uma reação de nPCR, utilizando o protocolo modificado de Hrazdilová e colaboradores (2020), utilizando os *primers* descritos por Gou e colaboradores (2012), sendo utilizados para a primeira reação (PCR) os *primers* BaFor1 e BaRev1. Em seguida, para a nPCR foram utilizados os *primers* BaFor2 e BaRev2. O volume total da reação foi de 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,0 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer e 0,4 mM de dNTPs. Para a primeira reação (PCR) foram utilizados 90 ng de DNA, enquanto para a segunda reação (nPCR) foi utilizado 1 µL do produto da primeira reação.

Para amplificar cerca de 1200 pb do gene mitocondrial Citocromo B (*cytb*) das amostras que amplificaram os genes *18S rDNA* e *cox3*, foi utilizado o protocolo modificado de Schreeg e colaboradores (2016), realizando uma PCR convencional com os *primers* *cytb* forward e reverse, utilizando 90 ng de DNA. O volume total da reação foi de 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,0 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer e 0,4 mM de dNTPs.

Para amplificar cerca de 740 pb do gene *hsp70* foi utilizado o protocolo modificado de Mongruel e colaboradores (2022) utilizando os *primers* hsp70F1 e hsp70R2 (Soares *et al.*, 2011). A PCR convencional teve como volume total da reação 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,0 mM MgCl₂, 1x de Buffer, 10 pmol de cada primer, 0,4 mM de dNTPs e 90 ng de DNA.

Para amplificar cerca de 450 pb do gene *ITS-1* foram utilizados os *primers* descritos por Shock e colaboradores (2012) sendo para a reação de PCR utilizados os *primers* ITS-15C e ITS-13B e para a nPCR os *primers* ITS-15D e ITS-13C. O volume total da reação foi de 25 µL contendo 1,5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1,0 mM MgCl₂, 1x de Buffer,

10 pmol de cada primer e 0,4 mM de dNTPs. Para a primeira reação (PCR) foram utilizados 90 ng de DNA, enquanto para a segunda reação (nPCR) foi utilizado 1 µL do produto da primeira reação.

Os parâmetros de ciclagem e as sequências dos *primers* utilizados neste estudo para amplificar sequências de piroplasmas estão descritos na tabela 2.

3.6 Eletroforese das reações, purificação dos produtos amplificados e sequenciamento

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% por uma hora, corados em GelRed Nucleic Acid Stain, 10.000X (Biotium, Hayward, California, USA) e observados em transiluminador sob luz ultravioleta. Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit Illustra GFX (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e as amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento pelo método Sanger (SANGER *et al.*, 1977) utilizando o Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1 (Applied Biosystems, EUA), no equipamento ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems™) por eletroforese capilar (SANGER) na Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz RPT01A (Rio de Janeiro).

Tabela 2. *Primers* utilizados para amplificação de piroplasmas dos gêneros *Babesia* e *Theileria*, nomes dos *primers*, tipo de reação, sequência dos *primers*, tamanho da banda, condições termais e referência.

Gene/Reação	<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho (pb)	Condições termais	Referência
<i>18S rDNA</i>					
PCR	BTF1 BTR1	GGCTCATTACAACAGTTATAG CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC	930	94°C por 5 m; 40 ciclos: 94°C por 30s, 58°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	Jefferies <i>et al.</i> , 2007
nPCR	BTF2 BTR2	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC GGACTACGACGGTATCTGATCG	800	94°C por 5 m; 40 ciclos: 94°C por 30s, 62°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	
PCR	NBabesia 1F 18SRev-TB	AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT GAATAATTCACCGGATCACTCG	1600	94°C por 5 m; 40 ciclos: 94°C por 30s, 60°C por 30s e 72°C por 1 m; 72°C por 7 m	Oosthuizen <i>et al.</i> , 2008 Matjila <i>et al.</i> , 2008
<i>cox3</i>					
PCR	COX3F COX3R	ACTGTCAGCTAAAACGTATC ACAGGATTAGATACCCTGG	600	94°C por 5 m; 40 ciclos: 94°C por 20s, 56°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	Schreeg <i>et al.</i> , 2016
<i>cox1</i>					
PCR	BaFor1 BaRev1	ATWGGATTYTATATGAGTAT ATAATCWGGWATYCTCCTTGG	1250	95°C por 5 m; 35 ciclos: 95°C por 15s, 45°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	Gou <i>et al.</i> , 2012
nPCR	BaFor2 BaRev2	TCTCTWCATGGWTTAATTATGATAT TAGCTCCAATTGAHARWACAAAGTG	975	95°C por 5 m; 35 ciclos: 95°C por 15s, 57°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 7 m	Gou <i>et al.</i> , 2012
<i>cytb</i>					
PCR	CytbF CytbR	TTAGTGAAGGAACTTGACAGGT CGGTAAATCTTTCCTATTCCTTACG	1298	94°C por 5 m; 50 ciclos: 94°C por 20s, 56°C por 30s e 68°C por 1m; 72°C por 7 m	Schreeg <i>et al.</i> , 2016

Abreviaturas: pb, pares de base; PCRc, PCR convencional; nPCR, nested PCR, °C. graus centígrados; m, minuto(s); s, segundo(s).

Tabela 2 (continuação). *Primers* utilizados para amplificação de piroplasmas dos gêneros *Babesia* e *Theileria*, nome do primer, tipo de reação, sequência dos *primers*, tamanho da banda, condições termais e referência.

Gene/Reação	<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho (pb)	Condições termais	Referência
<i>hsp70</i>					
PCR	hsp70F1 hsp70R1	CATGAAGCACTGGCCHTTCAA GBAGGTTGTTGTCCTTVGTCAT	740	95°C por 5 m; 35 ciclos: 95°C por 15s, 60°C por 30s e 72°C por 30s; 72°C por 5 m	Soares <i>et al.</i> , 2021
<i>ITS-1</i>					
PCR	ITS-15C ITS-13B	CGATCGAGTGATCCGGTGAATTA GCTGCGTCCTTCATCGTTGTG	500-800	94°C por 1 m; 35 ciclos: 94°C por 30s, 52°C por 30s e 72°C por 1m; 72°C por 5 m	Shock <i>et al.</i> , 2012
nPCR	ITS-15D ITS-13C	AAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG TTGTGTGAGCCAAGACATCCA	450	94°C por 1 m; 35 ciclos: 94°C por 30s, 49°C por 30s e 72°C por 1m; 72°C por 5 m	

Abreviaturas: pb, pares de base; PCRc, PCR convencional; nPCR, nested PCR, °C. graus centígrados; m, minuto(s); s, segundo(s).

3.7 Análises filogenéticas

As sequências deste estudo foram editadas no programa Geneious Prime 2023.0.3 (<https://www.geneious.com>), a partir de comparação com sequências homólogas, através da ferramenta BLASTn (Benson *et al.*, 2002) e, após analisadas, foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências consenso geradas foram alinhadas pelo método Clustal W no programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) e suas extremidades removidas para obter sequências de mesmo tamanho para gerar duas árvores para a análise filogenética de *Hepatozoon* spp.: uma utilizando sequências curtas (>500 pb) e outra com sequências longas (~1600 pb). Para isso foi criado um banco de dados com sequências de *Hepatozoon* spp. selecionadas de acordo com os critérios: (a) sequências obtidas de vertebrados, (b) da mesma região do gene *18S rDNA* das sequências deste estudo e (c) com tamanho superior à 500 pb, e sequências de outros membros da subordem Adeleorina: *Hemogregarina* spp., *Karyolysus paradoxa* e *Dactylosoma* spp. (Anexo IV). Para o enraizamento das árvores na análise filogenética de *Hepatozoon* spp. foram escolhidas espécies do gênero *Dactylosoma* como grupo externo, por pertencerem a mesma subordem e terem sido utilizados com este propósito em outras publicações (Alabi *et al.*, 2021; André *et al.*, 2022; Pacheco *et al.*, 2025), demonstrando uma proximidade suficiente para ser utilizado como ponto comparativo com o gênero de interesse.

Para as análises filogenéticas de piroplasmas as sequências consenso geradas foram alinhadas pelo método Clustal W no programa MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) e suas extremidades removidas para obter sequências de mesmo tamanho para gerar duas árvores para a análise filogenética de *18S rDNA* de piroplasmas: uma utilizando sequências curtas (>500 pb) e outra com sequências longas (~1600 pb). O banco de dados foi criado com sequências de *Babesia* spp. selecionadas de acordo com os critérios: (a) sequências obtidas de vertebrados, (b) da região homóloga do gene *18S rDNA* das sequências deste estudo e (c) com tamanho correspondente às sequências geradas neste estudo, além de sequências de outros piroplasmas (*Cytauxzoon* spp., *Theileria* spp. e piroplasmas) e do grupo externo, *Cardiosporidium cionae*. Para o enraizamento das árvores dos outros genes, foram utilizadas sequências de piroplasmas seguindo o mesmo critério e como grupo externo a sequência de *Plasmodium falciparum* (AY283019). Estes táxons foram escolhidos como grupo externo por terem sido utilizado com este propósito em outras publicações (Barbosa *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2021; Jalovecka *et al.*, 2019; Mongruel *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2023; Pacheco *et al.*, 2025).

Para a inferência bayesiana, a partir do alinhamento, foi construído um arquivo nexus no software Mesquite 3.8.1 (Maddison e Maddison, 2023) para o Mr. Bayes 3.2.7 da plataforma CIPRES (Miller *et al.*, 2010), utilizando o método de Markov Chain Monte Carlo sob o modelo GTR + I + G por 10.000.000 gerações, sendo as árvores sumarizadas com descarte de 25% (“burn in”). Com o software Tracer 1.7.2 foi analisado o “effective sample size” (ESS) dos MCMCs (Rambaut *et al.*, 2018). As árvores consenso foram visualizadas no FigTree 1.4.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), exportadas como arquivo .svg e editadas no Inkscape 1.3 (<https://inkscape.org>).

Para a análise de máxima verossimilhança o arquivo alinhado em formato FASTA foi convertido para o formato Phylip no programa DnaSP 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017). O melhor modelo de substituição nucleotídica utilizado foi determinado pelo programa jModelTest2 (Guindon e Gascuel, 2003) na plataforma CIPRES (Miller *et al.*, 2010), sob o critério de Informação de Akaike (AIC). Para a análise de *Hepatozoon* spp. (*18S rDNA*) foi utilizado TN93 + G (gamma distribution, $gd = 0.2590$) e para a análise de piroplasmas: *18S rDNA* - HKY85 + G ($gd = 0.310$), *cox1* - GTR + I + G ($I = 0.293$, $gd = 0.579$), *cox3* - HKY85 + G ($gd = 2.306$) e *cytb* - GTR + G ($gd = 1.230$). O arquivo em formato Phylip foi submetido à plataforma PhyML

(Guindon *et al.*, 2010) para gerar uma árvore de máxima verossimilhança com 1.000 réplicas (bootstrap).

A divergência evolutiva geral, intergrupo (entre os diferentes clados) e intragrupo (dentro dos clados) foi estimada utilizando o alinhamento do gene *18S rDNA* através do método *p*-distance (distribuição gama =1) no software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Adicionalmente, análises de polimorfismo como número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π) e frequência de haplótipos entre as sequências deste estudo foram obtidas no programa DnaSP 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017). As análises excluíram gaps e consideraram os sítios invariáveis.

Posteriormente, para demonstrar a frequência de haplótipos de *Hepatozoon* spp. de roedores do Brasil e Chile foi construída uma rede de haplótipos utilizando o método de *median-joining* (MJ) através do software PopART v.1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>). Análises de variância molecular (AMOVA) e o índice de fixação (Fst) (Wright, 1978) foram calculados para as sequências do Brasil e Chile usando o software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier e Lischer, 2010). A AMOVA foi usada para testar a variabilidade genética entre e dentro dos grupos. O índice de fixação foi usado para medir os níveis de diferenciação genética entre haplótipos dos dois países (Brasil e Chile).

4 RESULTADOS

4.1 Distribuição dos pequenos mamíferos analisados

No total foram analisados 309 pequenos mamíferos, sendo 20 da ordem Didelphimorphia e 289 da ordem Rodentia (Tabela 1). Os marsupiais didelfídeos pertencem a três espécies: *Didelphis aurita*, *Monodelphis americana* Müller, 1776 e *Philander quica*, enquanto os roedores pertencem a 14 espécies de roedores silvestres da família Cricetidae: *Akodon cursor* Winge, 1887, *Akodon montensis* Thomas, 1913, *Akodon paranaenses* Christoff et al., 2000, *Delomys sublineatus* Thomas, 1903, *Euryoryzomys russatus* Wagner, 1848, *Juliomys ossitenuis* Costa et al., 2007, *Necomys lasiurus* Lund, 1841, *Oligoryzomys flavescens* Waterhouse, 1837, *Oligoryzomys nigripes* Olfers, 1818, *Oxymycterus nasutus* Waterhouse, 1837, *Oxymycterus quaestor* Thomas, 1903, *Sooretamys angouya* Fischer, 1814 e *Thaptomys nigrita* Lichtenstein, 1829 e duas espécies de sinantrópicos da família Muridae, *Mus musculus* Linnaeus, 1758 e *Rattus rattus* Linnaeus, 1758. No total foram coletados 149 espécimes no Estado do Rio de Janeiro, sendo 30 em Iguaba Grande - IG (25 roedores e 5 marsupiais) e 119 em Nova Friburgo - NF (109 roedores e 10 marsupiais), enquanto 160 espécimes foram capturados no Estado do Paraná, entre 52 roedores em Cruz Machado - CM, 48 roedores em Lidianópolis - LD e 60 espécimes em Ponta Grossa - PG (55 roedores e 5 marsupiais). Ponta Grossa apresentou a mais alta diversidade de pequenos mamíferos, com 11 diferentes espécies amostradas, enquanto Iguaba Grande a menor, com apenas duas espécies. Entre os pequenos mamíferos amostrados, *Akodon montensis* foi a espécie mais abundante (n = 106), seguida por *Oligoryzomys nigripes* (n = 40) e *Akodon cursor* (n = 29). Entre as espécies sinantrópicas, *Mus musculus* foi a mais abundante (n = 42) (Tabela 3).

Tabela 3. Pequenos mamíferos capturados de acordo com a ordem, espécie, área de estudo, número total por espécie e número total.

Ordem	Espécie	Áreas de estudo					total
		PG	CM	LD	IG	NF	
Rodentia	<i>Akodon cursor</i>					29	29
	<i>Akodon montensis</i>	5	26	30		45	106
	<i>Akodon paranaensis</i>	11					11
	<i>Delomys sublineatus</i>					1	1
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	5					5
	<i>Juliomys ossitenuis</i>	1					1
	<i>Mus musculus</i>		1	16	25		42
	<i>Necomys lasiurus</i>	2		1			3
	<i>Nectomys squamipes</i>	1					1
	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	4					4
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	18	12	1		9	40
	<i>Oxymycterus nasutus</i>	6					6
	<i>Oxymycterus quaestor</i>					16	16
	<i>Rattus rattus</i>		2			8	10
	<i>Sooretamys angouya</i>		11			1	12
	<i>Thaptomys nigrita</i>	2					2
	Total de roedores	55	52	48	25	109	289

Tabela 3 (continuação). Pequenos mamíferos capturados de acordo com a ordem, espécie, área de estudo, número total por espécie e número total.

Ordem	Espécie	Áreas de estudo					total
		PG	CM	LD	IG	NF	
Didelphimorphia							
	<i>Didelphis aurita</i>					8	8
	<i>Monodelphis americana</i>					2	2
	<i>Philander quica</i>	5			5		10
	Total de marsupiais	5			5	10	20
	Total por município	60	52	48	30	119	309

4.2 Análises morfométricas de gametócitos de *Hepatozoon* spp.

Foram detectados gametócitos de *Hepatozoon* spp. em esfregaços sanguíneos de 10% (31/309) dos pequenos mamíferos amostrados, que pertencem às espécies de roedores: *A. cursor* (n=2, NF), *A. montensis* (n=28: dois indivíduos em PG, nove em NF e 17 em CM) e *O. nigripes* (n=1, CM). O comprimento e largura médios dos gametócitos e de seus núcleos foram calculados por espécie e localidade de captura e são apresentados com medidas reportadas em outros estudos (Tabela 4). Não foram observados gametócitos de *Hepatozoon* sp. em esfregaços de sangue de marsupiais deste estudo. Os gametócitos apresentavam formato alongado e ovóide com coloração azul claro, localizados dentro de leucócitos ou livres na corrente sanguínea. Seus núcleos levemente condensados e de aspecto granular, localizados no centro ou em uma das extremidades (Figura 8). Um caso de dupla infecção dentro de um leucócito foi observado durante a análise morfológica de um espécime de *A. montensis* de Cruz Machado (Figura 8E, seta espessa).

Tabela 4. Dados morfométricos de cápsulas e núcleos de diferentes espécies de *Hepatozoon* detectados em roedores encontrados na literatura e neste estudo.

Espécie de parasito	Hospedeiro intermediário	País	Cápsula (µM)*	Núcleo (µM)*	Referência
<i>H. perniciosum</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	USA	12 x 6	-	Miller, 1908
<i>H. akodonti</i>	<i>Akodon fuliginosus</i>	Brasil	10 x 3,5	4 x 2,5	Carini e Maciel, 1915
	<i>Sigmodon hispidus</i> e				
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Peromyscus leucopus</i>	USA	9,6 x 3,6	7,5 x 3,0	Johnson <i>et al.</i> , 2007
<i>H. erhardovae</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i>	Polônia	9,4 x 3,4	4,8 x 2,5	Karbowiak <i>et al.</i> , 2005
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Microtus oeconomus</i>	Polônia	9,4 x 3,3	4,8 x 2,4	Karbowiak <i>et al.</i> , 2005
<i>H. milleri</i>	<i>Akodon montensis</i>	Brasil	10,9 x 4,9	5,6 x 3,8	Demoner <i>et al.</i> , 2019
<i>H. griseisciuri</i>	<i>Sciurus carolinensis</i>	Canadá	10,9 x 4,1	5,4 x 3,1	Léveillé <i>et al.</i> , 2020
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon montensis</i> - CM	Brasil	10,95 x 4,52	5,89 x 3,44	Este estudo
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon montensis</i> - NF	Brasil	10,65 x 4,69	5,92 x 3,64	Este estudo
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon montensis</i> - PG	Brasil	10,23 x 4,44	6,49 x 2,96	Este estudo
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon cursor</i> - NF	Brasil	10,49 x 4,77	5,83 x 3,59	Este estudo
<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Oligoryzomys nigripes</i> - CM	Brasil	10,13 x 4,40	6,54 x 3,22	Este estudo

*Comprimento x largura média.

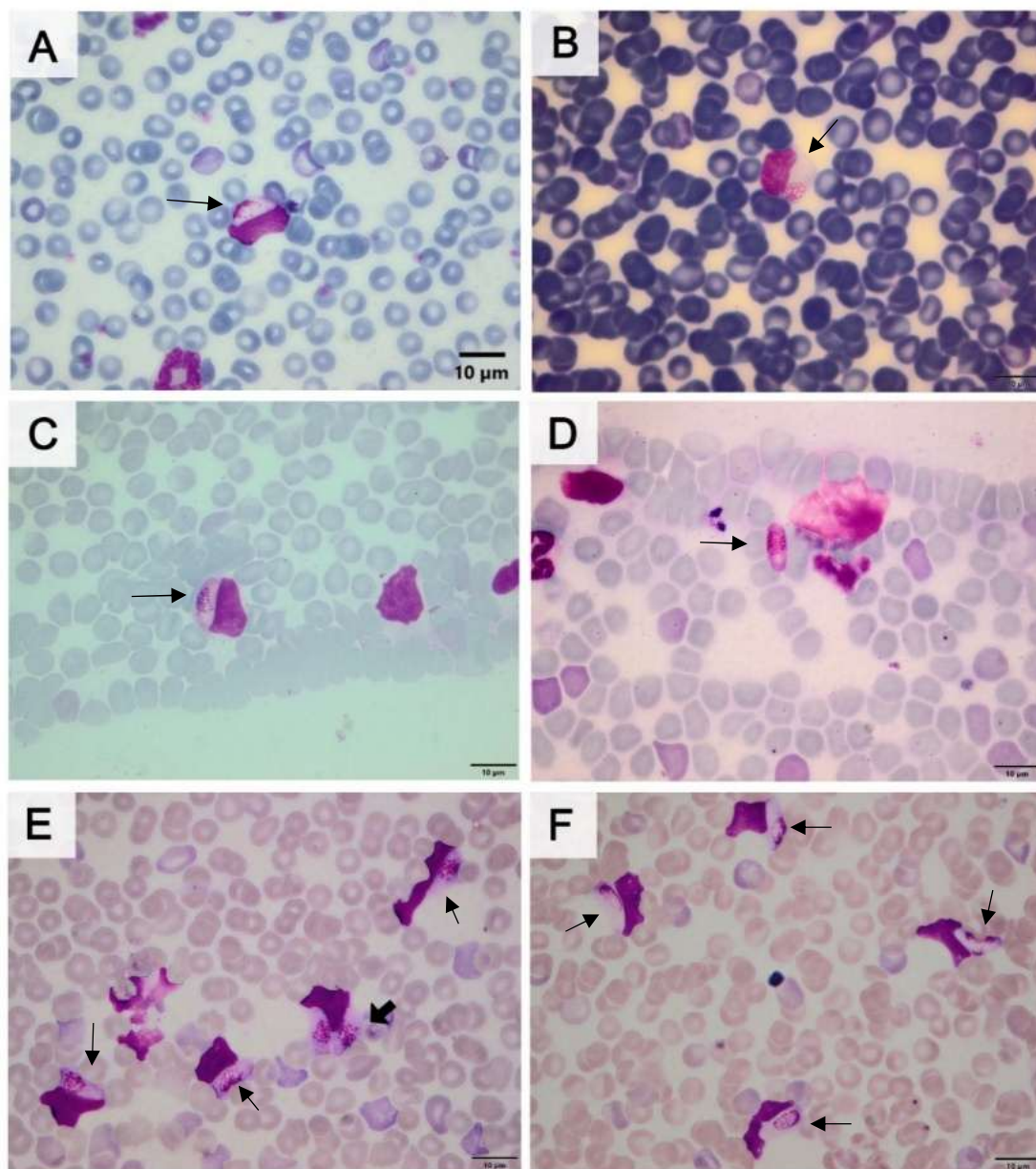


Figura 8. Gametócitos (setas) em sangue periférico de roedores. **A.** Gametócito observado em célula mononuclear de *Oligoryzomys nigripes* (PQ807554, CM). **B.** Gametócito observado em célula mononuclear de *Akodon cursor* (PQ807526, NF). **C.** Gametócito observado em célula mononuclear de *Akodon montensis* (PQ807563, PG). **D.** Gametócito livre observado em esfregaço sanguíneo de *A. montensis* (PQ807542, CM). **E.** Gametócito observado em célula mononuclear de *A. montensis* (PQ807538, CM). A seta preta espessa demonstra dois gametócitos parasitando a mesma célula. **F.** Quatro gametócitos observados em esfregaço sanguíneo de *A. montensis* (PQ807537, CM). Fonte: Freitas *et al.*, 2025. Escala: 10 µm.

A análise morfométrica de gametócitos de *A. montensis* revelou que os espécimes de CM eram significativamente maiores que os de NF ($p < 0.05$) e PG ($p < 0.01$). Os comprimentos dos núcleos de gametócitos de PG foram significativamente maiores que os de CM ($p < 0.05$) e NF ($p < 0.01$). Diferenças significativas também foram observadas nas larguras nucleares médias entre os gametócitos de CM e NF ($p < 0.05$), CM e PG ($p < 0.01$) e NF e PG ($p < 0.01$) (Tabela 5). Não foram observados gametócitos nos esfregaços sanguíneos dos marsupiais analisados ($n = 20$).

Tabela 5. Médias de comprimento e largura de gametócito de *Hepatozoon* spp. observados em roedores deste estudo, de acordo com a localidade.

Espécies	N	Média (μM)	DP (μM)	Valores limites		p-valor	
				Mínimo (μM)	Máximo (μM)		
Comprimento gametócito							
Cruz Machado	165	10,95	a	0,72	8,90	13,90	< 0.05
Nova Friburgo	45	10,65	b	0,71	8,69	12,05	< 0.01
Ponta Grossa	11	10,23	b	1,10	8,12	12,26	ns
Largura gametócito							
Cruz Machado	165	4,52	a	0,44	3,29	5,86	0,082
Nova Friburgo	45	4,69	a	0,53	3,33	5,64	
Ponta Grossa	11	4,44	a	0,59	3,56	5,55	
Comprimento núcleo							
Cruz Machado	165	5,89	a	0,91	3,16	8,38	ns
Nova Friburgo	45	5,92	a	1,12	3,76	8,72	< 0.01
Ponta Grossa	11	6,49	b	0,95	4,12	8,01	< 0.05
Largura núcleo							
Cruz Machado	165	3,44	a	0,44	2,41	4,72	< 0.05
Nova Friburgo	45	3,64	b	0,61	2,15	5,77	< 0.01
Ponta Grossa	11	2,96	c	0,72	1,92	4,29	< 0.01

Abreviações: N, número de gametócitos analisados; DP, desvio padrão; ns, não significativo. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey. Lidianópolis e Iguaba Grande não apresentaram o número mínimo de gametócitos necessários para a análise estatística.

4.3. Detecção e análise filogenética de *Hepatozoon* spp.

No ensaio de PCR para detecção de *Hepatozoon* spp., das 309 amostras analisadas, 75 amostras (23,3%) pertencentes a sete espécies de roedores (*A. cursor*, *A. montensis*, *M. musculus*, *O. nigripes*, *O. nasutus*, *O. quaestor* e *S. angouya*) amplificaram um fragmento (~600 pb) e duas espécies de marsupiais (*M. americana* e *P. quica*) amplificaram um fragmento com tamanho entre 300 e 400 pb do 18S rDNA de *Hepatozoon* sp. (Tabela 6). Estas amostras positivas pertenciam a pequenos mamíferos coletados em PG (*A. montensis* e *O. nasutus*, 4/60, 6,66%), NF (*A. montensis*, *A. cursor*, *M. domestica* e *O. quaestor* 38/119, 31,93%), CM (*A. montensis*, *M. musculus*, *O. nigripes* e *S. angouya*, 30/52, 57,69%), LI (*A. montensis* e *M. musculus*, 2/48, 4,16%) e IG (*P. quica*, 1/5, 20%) (Tabela 6). Não foram detectadas infecções por *Hepatozoon* spp. em roedores das espécies *A. paranaensis*, *D. sublineatus*, *J. ossitenuis*, *N. lasiurus*, *N. squamipes*, *O. flavescens*, *T. nigrita* e *R. rattus*, bem como em marsupiais da espécie *Didelphis aurita*. A mais alta prevalência entre as diferentes localidades foi detectada em CM (57,69%) e NF (31,09%), enquanto LI exibiu a mais baixa prevalência (4,16%). As espécies de roedores com mais elevada prevalência de infecção por este parasito foram *A. montensis* (45,28%, 48/106) e *S. angouya* (45,45%, 5/11) (Tabela 6). As sequências obtidas em marsupiais não foram inseridas na análise filogenética devido ao tamanho inferior a 500 pb, o que impossibilitou a separação dos haplótipos.

Todas as 72 amplificações foram submetidas ao sequenciamento objetivando confirmar a infecção por *Hepatozoon* spp.. Para a análise filogenética foram utilizadas 41 sequências obtidas de roedores, destas, 31 foram obtidas de animais com gametócitos observados em lâminas de esfregaço sanguíneo. As 41 sequências de roedores deste estudo utilizadas na análise filogenética foram depositadas no GenBank sob os números de acesso PQ807526-66. As demais 31 sequências obtidas em roedores foram depositadas no GenBank sob números de acesso PX667849-79.

As análises de BLASTn das sequências detectadas em roedores representativas dos haplótipos de *Hepatozoon* deste estudo demonstraram similaridade com sequências previamente obtidas de roedores do Brasil, com identidade 99,81% a 100% (Tabela 7). As análises bayesianas apresentaram valores de ESS superiores a 200, demonstrando a robustez da amostragem.

As análises de BLASTn das sequências obtidas em marsupiais demonstraram que a sequência obtida em *P. quica* (IG) demonstrou identidade de 99,32% com *Hepatozoon colubri* (MN723844) detectada em serpente *Zamenis longissimus* no Irã e as sequências obtidas em *M. americana* (NF) demonstraram 100 % de identidade com sequências de *Hepatozoon* sp. obtidas em roedores neste estudo nos municípios de NF e CM, respectivamente (PQ807530 e PQ807554). Estes resultados não foram incluídos na tabela 7.

Tabela 6. Prevalência de *Hepatozoon* spp. de acordo a espécie hospedeira por município estudado e prevalência total por espécie de hospedeiro.

Espécie	Áreas de estudo					n/total (prevalência)
	PG	CM	LD	NF	IG	
<i>Akodon cursor</i>				6/29 (20,68%)		6/29 (20,68%)
<i>Akodon montensis</i>	3/5 (60%)	18/26 (69,23%)	1/30 (3,33%)	26/45 (57,77%)		48/106 (45,28%)
<i>Monodelphis americana</i>				2/2 (100%)		2/2 (100%)
<i>Mus musculus</i>		1/1 (100%)	1/16 (6,25%)			2/42 (4,76%)
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	0/18	6/12 (50%)	0/1	0/9		6/40 (15%)
<i>Oxymycterus nasutus</i>	1/6 (16,66%)					1/6 (16,66%)
<i>Oxymycterus quaestor</i>				3/16 (18,57%)		3/16 (18,75%)
<i>Philander quica</i>					1/5 (20%)	1/5 (20%)
<i>Sooretamys angouya</i>		5/11 (45,45%)		0/1		5/12 (38,46%)

Abreviações: PG, Ponta Grossa; CM, Cruz Machado; LD, Lidianópolis; IG, Iguaba Grande; NF, Nova Friburgo; n, número de infectados.

Tabela 7. Resultados das análises de BLASTn das sequências de 18S rDNA representativas de haplótipos de *Hepatozoon* spp. detectados em roedores neste estudo, demonstrando o código de acesso ao GenBank das sequências deste estudo, a relativa espécie de hospedeiro e localidade de captura, código de acesso ao GenBank dos melhores resultados e dados da análise.

Haplótipos	GenBank ID	Hospedeiro / Localidade	Melhor resultado de Blast ID	Hospedeiro / Localidade	Identidade (%)	Query coverage (%)	E-value
Hap 1	PQ807534	<i>O. quaestor</i> / RJ	OM033660 e OM033663 OM033661 e OM033662	<i>Akodon</i> sp., SP <i>E. russatus</i> , SP	99,81	100	0.0
Hap 2	PQ807561, PQ807565	<i>M. musculus</i> , <i>O. nasutus</i> / PR	MH111420	<i>Calomys callidus</i> , MT	99,84	100	0.0
Hap 3	PQ807530	<i>A. cursor</i> / RJ	OM033663, <i>Akodon</i> sp., SP OM033660, <i>Akodon</i> sp., SP	<i>Akodon</i> sp., SP <i>Akodon</i> sp., SP	100	100	0.0
Hap 4	PQ807539	<i>A. montensis</i> / PR	OM033660 e OM033663 OM033661 e OM033662	<i>Akodon</i> sp., SP <i>E. russatus</i> , SP	99.94	100	0.0

Abreviações: ID, código GenBank; MT, estado de Mato Grosso; PR, estado do Paraná; RJ, estado do Rio de Janeiro; SP, estado de São Paulo.

Na análise filogenética construída com 114 sequências parciais de *18S rDNA* (BI1), as 108 sequências de *Hepatozoon* spp. se agruparam em cinco clados: Clado A – *Hepatozoon* spp. de roedores e répteis de diversas partes do mundo, bem como a de marsupial do Brasil (KX776354) (probabilidade posterior, pp = 0,92; bootstrap, bt = 31,7); Clado B - *Hepatozoon* spp. de anfíbios (pp = 1; bt = 99,7); Clado C – *Hepatozoon* spp. de serpentes (pp = 1; bt = 90,1); Clado D – *Hepatozoon* spp. de marsupiais do Chile (pp = 1; bt = 98,7) e Clado E – *Hepatozoon* spp. de carnívoros (pp = 1; bt = 100) (Figura 9).

As sequências obtidas neste estudo em roedores estão inseridas no clado A, formando um subclado com outras sequências previamente obtidas de roedores do Brasil (pp = 0,98; bt = 57,1), incluindo a sequência representativa da espécie *H. milleri* (KU667308), identificada em *A. montensis* do Estado de São Paulo, Brasil. A análise de polimorfismo das 41 sequências de *Hepatozoon* spp. (519 pb) obtidas em roedores neste estudo revelaram os seguintes valores: S = 3, Hd = 0.577, π = 0.00151 e quatro haplótipos: Hap 1 (n=1), Hap 2 (n=2), Hap 3 (n=17) e Hap 4 (n=21). Posteriormente, a análise das 31 sequências não incluídas na análise filogenética, acrescentou mais uma sequência obtida em *O. quæstor* ao haplótipo 1 (NF), 20 sequências ao haplótipo 3, obtidas em 17 *A. montensis*, dois *A. cursor* e um *O. nigripes* (NF) e cinco ao haplótipo 4, obtidas em um *A. montensis*, quatro *O. nigripes* e um *S. angouya* (CM). Infelizmente três sequências de *A. montensis* (NF) e uma sequência de *O. nigripes* (CM) não puderam ser incluídas nesta análise por serem curtas (< 500 pb).

As cores dadas a cada haplótipo são as mesmas usadas na Figura 10, indicando suas respectivas áreas de ocorrência. A frequência dos diferentes haplótipos deste estudo (PQ807526-66) também são apresentadas na Figura 10. A divergência evolutiva geral foi de 3%, enquanto a variabilidade genética entre o Clado A e os outros clados foi de 5% para os Clados B e E, de 6% para o clado C e de 3% para o clado D.



34

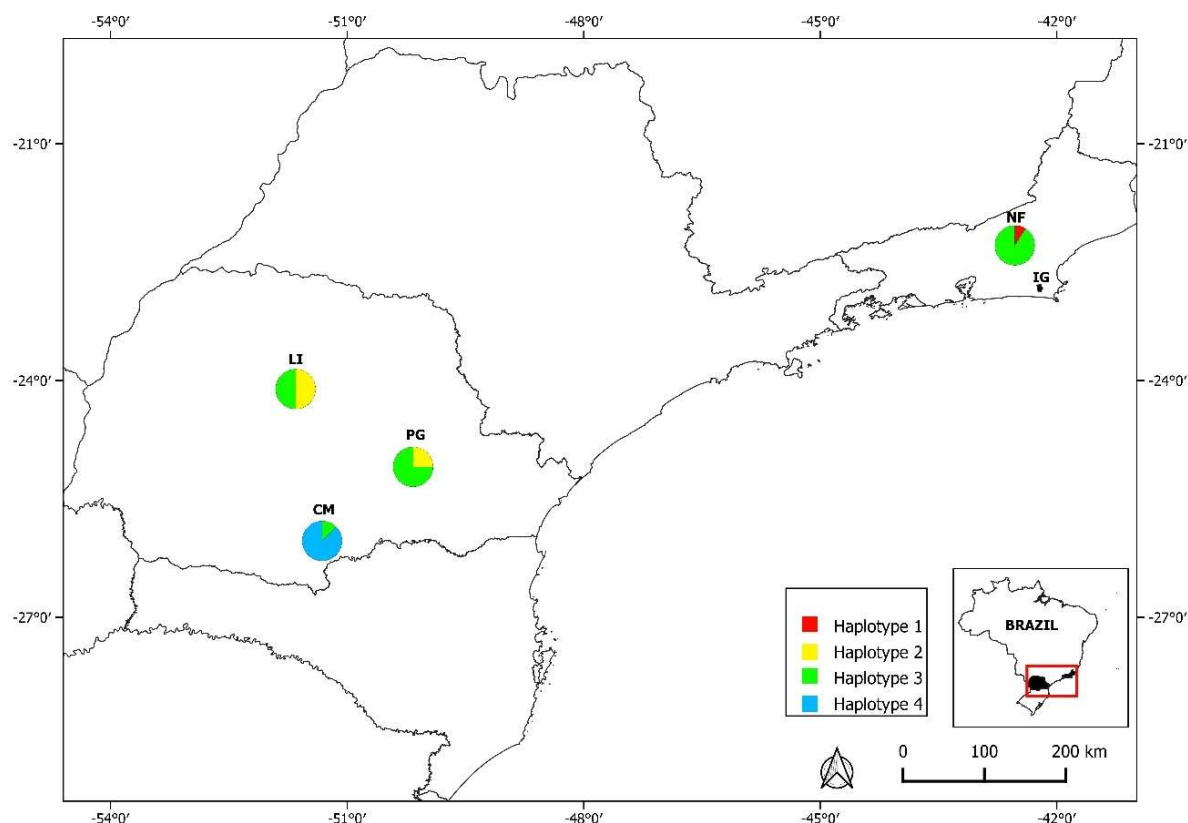


Figura 10: Mapa de parte das regiões Sul e Sudeste do Brasil demonstrando as áreas de estudo e a frequência dos haplótipos de *Hepatozoon* spp. detectados em roedores. Os gráficos de haplótipos foram colocados sobre as áreas estudadas nos Estados do Paraná (CM, LI e PG) e Rio de Janeiro (IG e NF). Fonte: Freitas *et al.*, 2025. Abreviações: CM, Cruz Machado; IG, Iguaba Grande; LI, Lidianópolis; NF, Nova Friburgo; PG, Ponta Grossa. Este mapa foi criado usando QGIS versão 3.42.0 [<https://qgis.org/> (acessado em 14 Março de 2025)].

A segunda análise de BI (2), com 37 fragmentos de 1605 pb, revelou uma topologia de árvores semelhante a análise prévia (BI 1). As sequências representativas dos haplótipos 1, 3 e 4 deste estudo se mantiveram próximas às sequências obtidas de roedores do Brasil (OM033660 - OM033663), com forte suporte estatístico ($pp = 1$; $bt = 0,98$) (Figura 11). Não foi possível obter uma sequência longa do haplótipo 2.

Para esta análise, a distância genética geral foi de 4%, enquanto as distâncias entre o Clado A e os outros clados foi de 6% para o Clado B, 5% para os Clados C e E e 3% para o Clado D.

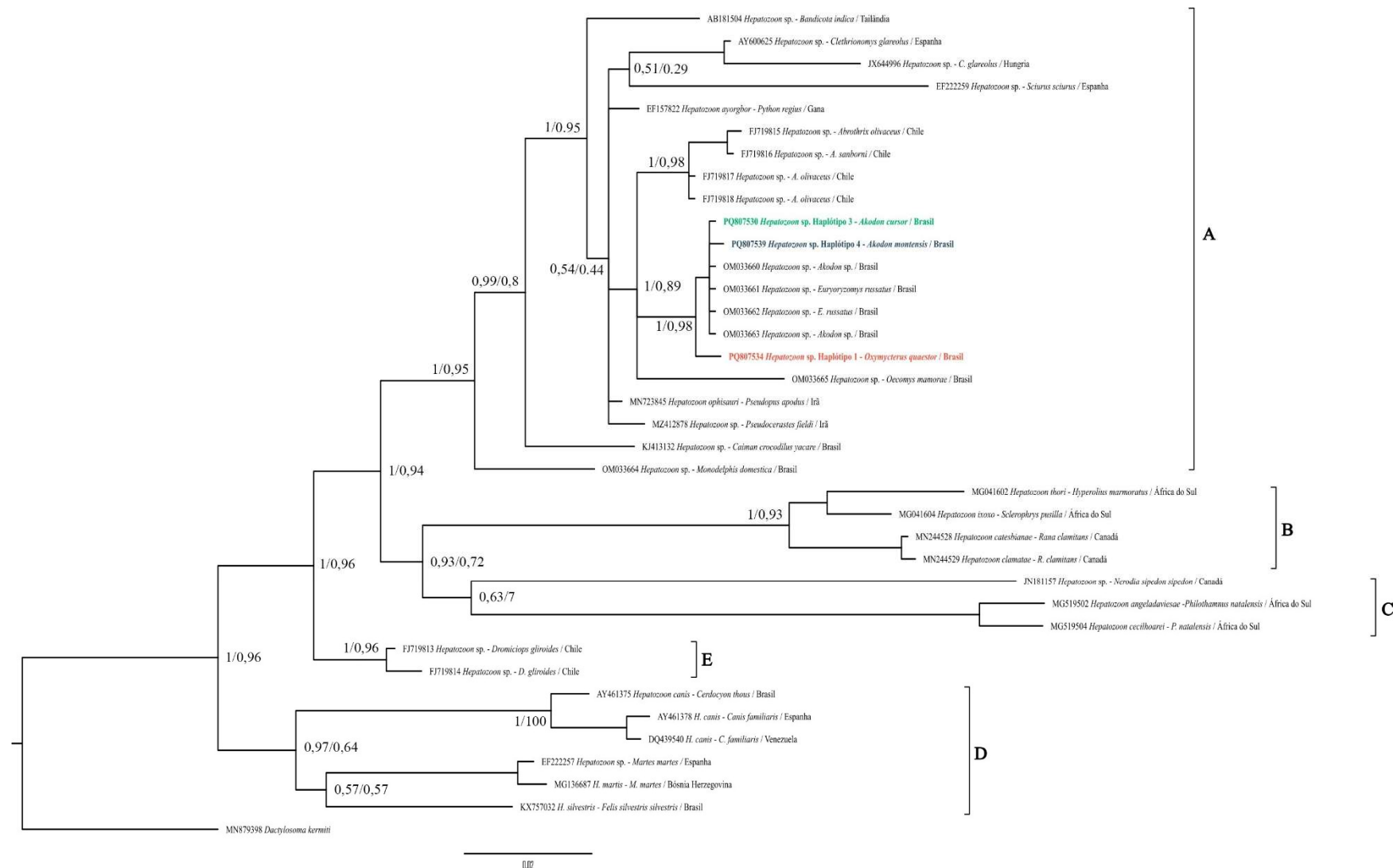


Figura 11. Relação filogenética de *Hepatozoon* spp. com base no 18S rDNA com um conjunto de dados final de 1605 pb e 37 sequências. A árvore filogenética foi inferida usando inferência bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências detectadas neste estudo estão destacadas nas cores verde, azul e vermelho. *Dactylosoma kermitti* (MN879398) foi usado como grupo externo. Suportes (IB/ML). Fonte: Freitas *et al.*, 2025.

A rede de haplótipos foi construída com as sequências deste estudo ($n = 41$) e com 20 sequências obtidas no GenBank de roedores do Brasil ($n = 15$) e Chile ($n = 5$) (Figura 12). A análise de diversidade genética destas 61 sequências resultou em $S = 32$, $H_d = 0.718$, $\pi = 0.00641$ e 11 haplótipos foram identificados. Os haplótipos analisados formaram quatro haplogrupos originados a partir de uma sequência ancestral (não amostrada) (Figura 12).

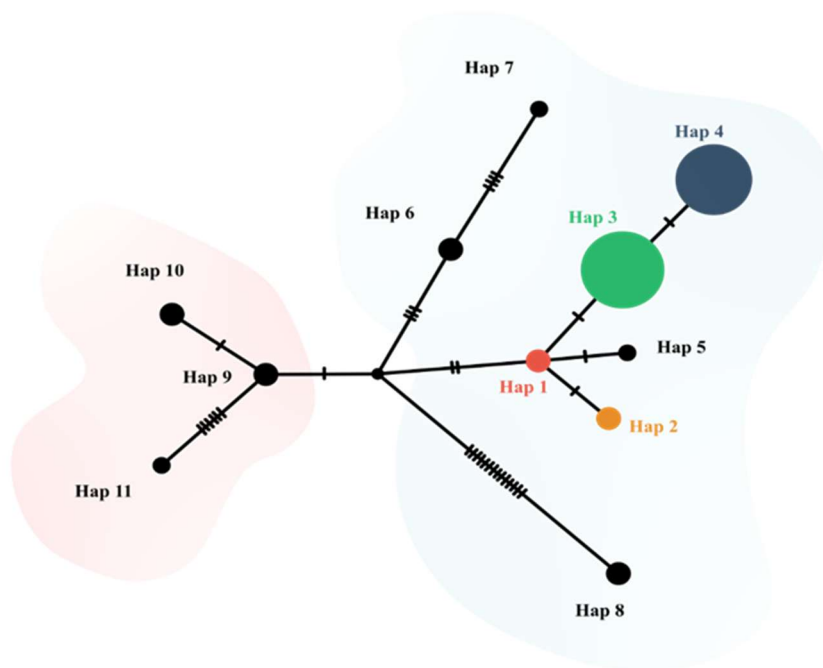


Figura 12. Rede de haplótipos formada a partir de sequências de *18S rDNA* (519 pb) de *Hepatozoon* spp. detectadas em pequenos roedores do Brasil (Haplótipos 1 a 8, fundo azul claro) e do Chile (Haplótipos 9 a 11, fundo rosa claro). O tamanho dos círculos varia de acordo com o número de sequências pertencentes a cada haplótipo. Eventos mutacionais são representados por traços verticais. Os haplótipos encontrados neste estudo (1 a 4) estão coloridos de acordo com as cores usadas nas sequências utilizadas nas árvores filogenéticas (Figuras 9 e 11). Fonte: Freitas *et al.*, 2025.

Com base na formação dos haplótipos, o comprimento dos gametócitos do haplótipo 4 ($n = 153$, média = 10,951, DP = 0,726) foi estatisticamente maior do que os do haplótipo 3 ($n = 96$, média = 10,682, DP = 0,817) ($p < 0.01$) (Tabela 8). Não foram detectados gametócitos nos esfregaços sanguíneos das amostras dos haplótipos 1 e 2.

A variação genética entre os países foi de 56,78% ($F_{st} = 0.567$; $p < 0.01$) e a variação genética dentro dos países foi de 43,22%. Os valores de F_{st} revelaram diferenças genéticas significativas entre os países ($F_{st} = 0.567$; $p < 0.01$).

Tabela 8. Médias do comprimento e largura dos gametócitos e do comprimento e largura do núcleo de *Hepatozoon* spp., de acordo com os haplótipos detectados neste estudo.

Espécies	N	Média (µM)	DP (µM)	Valores limites		p-valor
				Mínimo (µM)	Máximo (µM)	
Comprimento gametócito						
Haplótipo 3	96	10,68	a	0,82	8,12	12,26
Haplótipo 4	153	10,95	a	0,73	8,90	13,91
Largura gametócito						
Haplótipo 3	96	4,59	a	0,51	3,33	5,65
Haplótipo 4	153	4,55	a	0,46	3,29	5,86
Comprimento núcleo						
Haplótipo 3	96	6,05	a	1,14	3,76	8,72
Haplótipo 4	153	5,94	a	0,92	3,16	8,98
Largura núcleo						
Haplótipo 3	96	3,49	a	0,66	1,56	5,77
Haplótipo 4	153	3,37	b	0,51	2,19	4,72
						0,11

Abreviações: n, número de gametócitos analisados; dp, desvio padrão. Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey. Os haplótipos 1 e 2 não apresentaram o número mínimo de gametócitos necessários para a análise estatística.

Os resultados referentes à *Hepatozoon* spp. de roedores já foram publicados na revista Pathogens, 2025, volume 14, número 756, página 1 a 18 (Anexo VIII).

4.4 Análises morfométricas de merozoítos de *Babesia* sp.

Foram observados merozoítos de *Babesia* sp. dentro de eritrócitos nos esfregaços sanguíneos de marsupiais da espécie *P. quica* capturados em PG (2/5, 40%) e IG (2/5, 40%). Não foram observadas formas livres. Os merozoítos apresentavam formato de anel ou ovóide, com citoplasma pálido e presença de cromatina densa na periferia, sendo mais basofílica. Essas estruturas foram observadas em dois marsupiais de PG com observação de 33 merozoítos (média = 2,08 x 1,77 µm) e em dois marsupiais de IG com observação de 28 merozoítos (média = 2,34 x 2,15 µm) e a média geral foi de 2,15 a 2,34 µm (Figura 13). Não foram observadas diferenças morfológicas entre os merozoítos encontrados nas diferentes localidades.

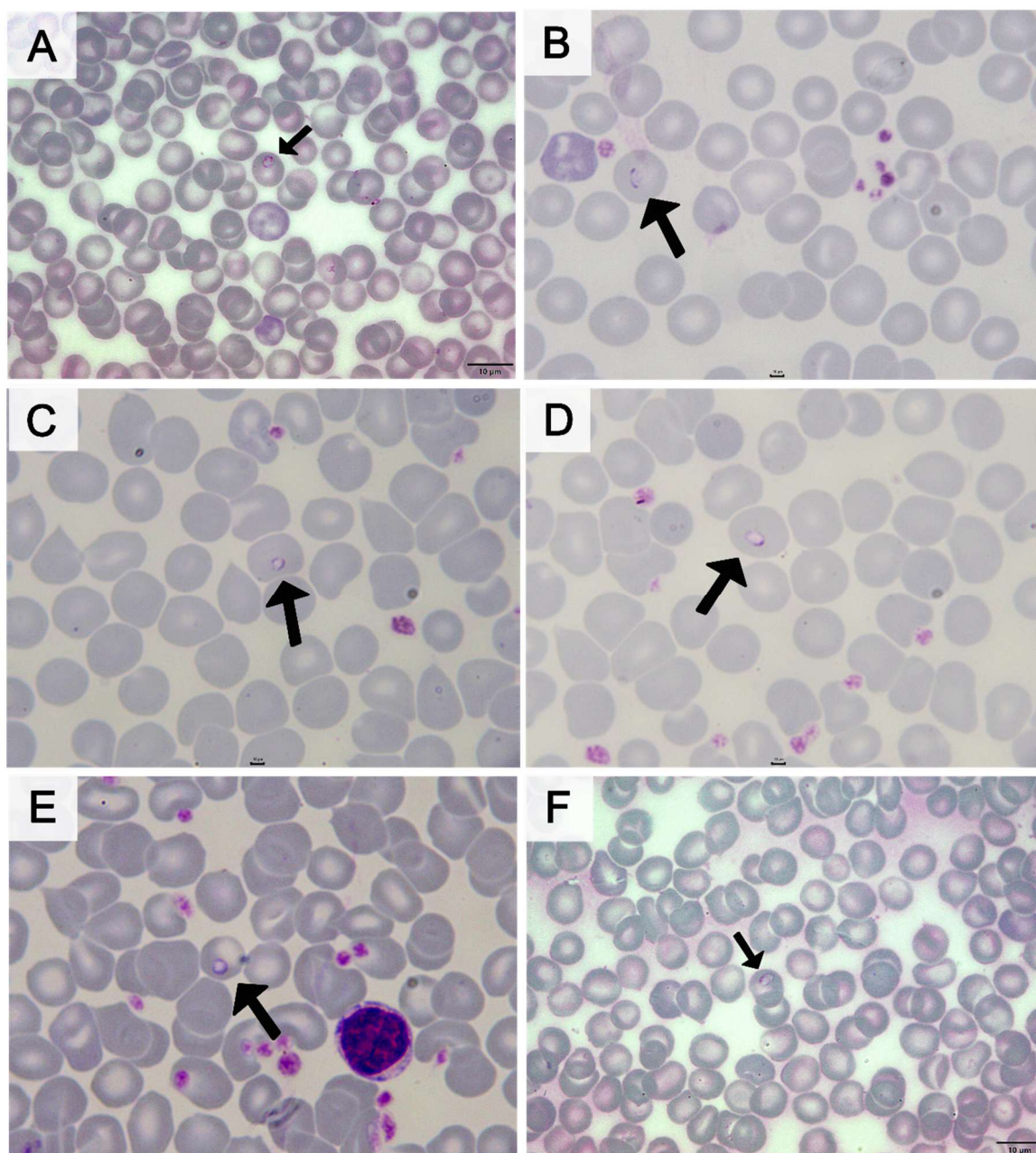


Figura 13. Merozoítos intraeritrocíticos de *Babesia* spp. (setas) observados em esfregaços de sangue de *Philander quica* de Ponta Grossa (A, C, F), no Paraná e Iguaba Grande (B, D, E), no Rio de Janeiro. Estruturas em forma de anel (A, C e E) e formas ovóides (B, D e F) (Escala: 10 μm).

4.5 Detecção e Análise filogenética de *Babesia* sp.

Baseado na PCR convencional para detecção de piroplasmas, das 309 amostras analisadas, sete (7/309, 2,26%) amplificaram uma sequência parcial do gene *18S rDNA* (~800 pb) e do gene *cox3* (~600 pb), sendo cinco de marsupiais da espécie *P. quica*: dois espécimes capturados em IG (2/5, 40%) e três em PG (3/5, 60%) e dois roedores; um *M. musculus* capturado em IG (1/25, 4%) e um *O. nasutus* capturado em PG (1/6, 16,6%). Posteriormente, sequências longas do gene *18S rDNA* (~1600 pb) foram obtidas com sucesso apenas das amostras positivas dos marsupiais *P. quica* (n = 5). Em seguida, amplificações do gene *cox1* (~1000 pb) foram obtidas das amostras dos cinco marsupiais e do roedor *O. nasutus*, além de amplificações do gene *cytb* (~1300 pb) de quatro amostras de marsupiais, duas de IG e duas de PG. Não foram obtidas amplificações utilizando os genes *hsp70* e *ITS-1*.

As análises de BLASTn foram feitas com as cinco sequências longas (~1500 pb) do gene *18S rDNA* obtidas dos marsupiais da espécie *P. quica* capturados em IG (n=2) no Rio de Janeiro e PG (n=3) no Paraná, e demonstraram maior similaridade com as sequências obtidas de marsupiais da espécie *D. aurita* recolhidos em centros de recolhimento de animais silvestres no Rio de Janeiro. As sequências de *cox3* e *cox1* obtidas em *P. quica* do RJ demonstraram uma baixa similaridade (81,49%) com *Cytauxzoon paradoxurus* (PV402287) recuperada de *Paradoxurus hermaphroditus* em Singapura e as sequências obtidas em PG demonstraram baixa similaridade (80,51 a 80,59%) com *B. vogeli* (PV565254) recuperada de cão no Uruguai. A análise de BLASTn das sequências de *cox1* obtidas em *P. quica* do RJ e PG demonstraram similaridade de 100% e 97%, respectivamente, com a sequência de *Babesia* sp. obtida em *D. albiventris* (MW308131) em Brasília (Tabela 9).

Na árvore filogenética construída com 94 sequências parciais (511 pb) de *18S rDNA* de piroplasmas, as sequências obtidas neste estudo agruparam-se isoladas em um clado com sequências detectadas em marsupiais e tatus (xenartras) do Brasil obtidas em outros estudos com suporte considerável (pp = 0,99; bt = 68,1), estando próxima ao clado irmão do grupo “*Babesia* Western” com baixo suporte (pp = 0,56, bt = 21,9) (Figura 14). Os cladogramas se dividiram em dez, como descrito por Jalovecka e colaboradores (2019), com acréscimo de novos cladogramas de piroplasmas obtidos em animais silvestres (Gonçalves *et al.*, 2021, Ikeda *et al.*, 2021, Mongruel *et al.*, 2022, Krawczak *et al.*, 2023 e Oliveira *et al.*, 2023).

Tabela 9. Resultados de BLASTn das sequências dos genes *18S rDNA* (~1500 pb), *cox3*, *cox1* e *cytb* obtidas em pequenos mamíferos neste estudo.

Ident.	Gene	Hosp / Localização	Melhor resultado Blastn	Hosp / Localização	ID %	QC %	E-value
IG1	18S	<i>Philander quica</i> / RJ	OP7511797, OP751800	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	98,12	100	0.0
IG2	18S	<i>Philander quica</i> / RJ	OP7511797, OP751800	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	98,16	100	0.0
PG1	18S	<i>Philander quica</i> / PR	OP7511797, OP751800	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	99,68	100	0.0
PG2	18S	<i>Philander quica</i> / PR	OP7511797, OP751800	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	99,67	100	0.0
PG3	18S	<i>Philander quica</i> / PR	OP7511797, OP751800	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	99,67	100	0.0
IG1	<i>cox3</i>	<i>Philander quica</i> / RJ	PV402287	<i>Cytauxzoon paradoxurus</i> / SGP	81,49	88	3e-161
IG2	<i>cox3</i>	<i>Philander quica</i> / RJ	PV402287	<i>Cytauxzoon paradoxurus</i> / SGP	81,49	88	3e-161
PG1	<i>cox3</i>	<i>Philander quica</i> / PR	OQ190472, OQ190473	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	97,38	100	0.0
PG2	<i>cox3</i>	<i>Philander quica</i> / PR	OQ190472, OQ190473	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	97,38	100	0.0
PG3	<i>cox3</i>	<i>Philander quica</i> / PR	OQ190472, OQ190473	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	97,38	100	0.0
PG4	<i>cox3</i>	<i>Oxymycterus nasutus</i> / PR	OQ190472, OQ190473	<i>Didelphis aurita</i> / RJ	97,38	100	0.0
IG1	<i>cox1</i>	<i>Philander quica</i> / RJ	MW308130, MW308131	<i>Didelphis albiventris</i> / DF	99,27	100	0.0
IG2	<i>cox1</i>	<i>Philander quica</i> / RJ	MW308130, MW308131	<i>Didelphis albiventris</i> / DF	99,27	100	0.0
PG2	<i>cox1</i>	<i>Philander quica</i> / PR	MW308130, MW308131	<i>Didelphis albiventris</i> / DF	85,61	97	4e-153
PG3	<i>cox1</i>	<i>Philander quica</i> / PR	MW308130, MW308131	<i>Didelphis albiventris</i> / DF	85,61	97	4e-153
PG4	<i>cox1</i>	<i>Oxymycterus nasutus</i> / PR	MW308130, MW308131	<i>Didelphis albiventris</i> / DF	85,61	97	4e-153
IG1	<i>cytb</i>	<i>Philander quica</i> / RJ	PV402287	<i>Cytauxzoon paradoxurus</i> / SGP	81,49	88	3e-161
IG2	<i>cytb</i>	<i>Philander quica</i> / RJ	PV402287	<i>Cytauxzoon paradoxurus</i> / SGP	81,49	88	3e-161
PG2	<i>cytb</i>	<i>Philander quica</i> / PR	PV565254	<i>Canis familiaris</i> / URY	81,51	97	1e-164
PG3	<i>cytb</i>	<i>Philander quica</i> / PR	PV402287	<i>Canis familiaris</i> / URY	81,51	97	1e-164

Abreviaturas: Hosp, espécie de hospedeiro; SGP, Singapura; URY, Uruguai; ID, identidade; QC, query cover.

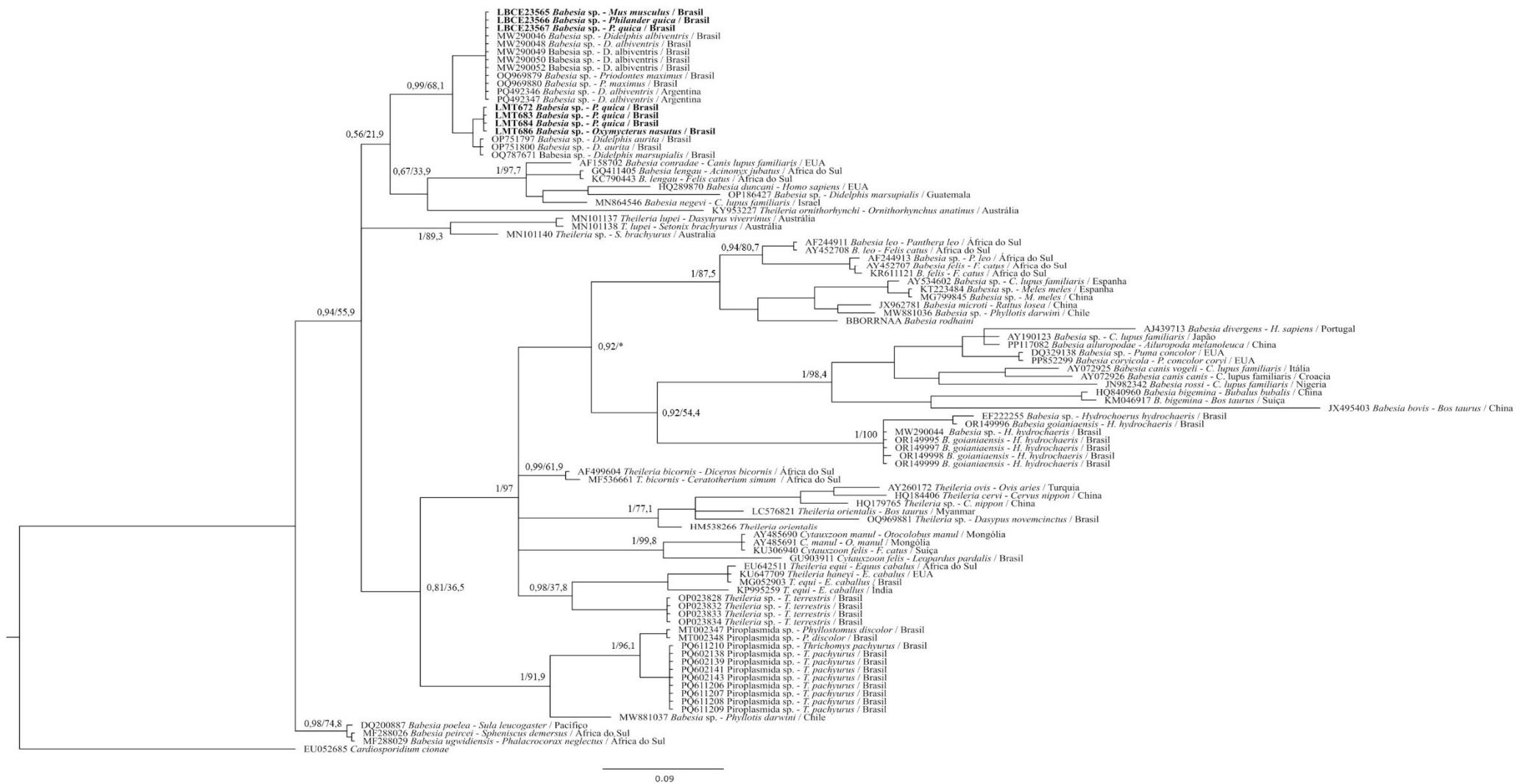


Figura 14. Relação filogenética de *Babesia* spp. com base no 18S rDNA com um conjunto de dados final de 511 pb e 94 sequências. A árvore filogenética foi inferida usando inferência bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências detectadas neste estudo estão destacadas em negrito. *Cardiosporidium cionae* (EU052685) foi usado como grupo externo. Suportes (IB/ML). *suporte não observado na árvore.

O clado com as sequências deste estudo se dividiu em três subclados: subclado 1 com as sequências obtidas em *P. quica* e *M. musculus* em IG (RJ) deste estudo, além de sequências obtidas em estudos prévios em *D. albiventris* (DF, MS e Argentina) e xenartras (MS), subclado 2 com as sequências obtidas em *P. quica* e *O. nasutus* em PG deste estudo e subclado 3 com sequências obtidas em marsupiais das espécies *D. aurita* (RJ) e *D. marsupialis* (MA) do Brasil obtidas em estudos prévios (Figura 15).

A rede de haplótipos foi construída com as sequências de *18S rDNA* (511 pb) de *Babesia* spp. que se agruparam no clado com as sete sequências deste estudo e 12 sequências obtidas no GenBank, sendo marsupiais (n = 8) e xenartras (n = 2) do Brasil e duas sequências de marsupiais da Argentina, anteriormente denominado clado Marsupialia da América do Sul. Os haplótipos analisados derivaram de uma sequência ancestral (não amostrada ou extinta) (Figura 15). A análise de diversidade genética destas 19 sequências resultou em $S = 14$, $H_d = 0.561$, $\pi = 0.01353$ e três haplótipos foram identificados. Os valores de divergência genética par a par foram de 2,75% entre as sequências dos subclados 1 e 2, de 2,54% entre as sequências dos subclados 1 e 3 e de 0,58% entre as sequências dos subclados 2 e 3.

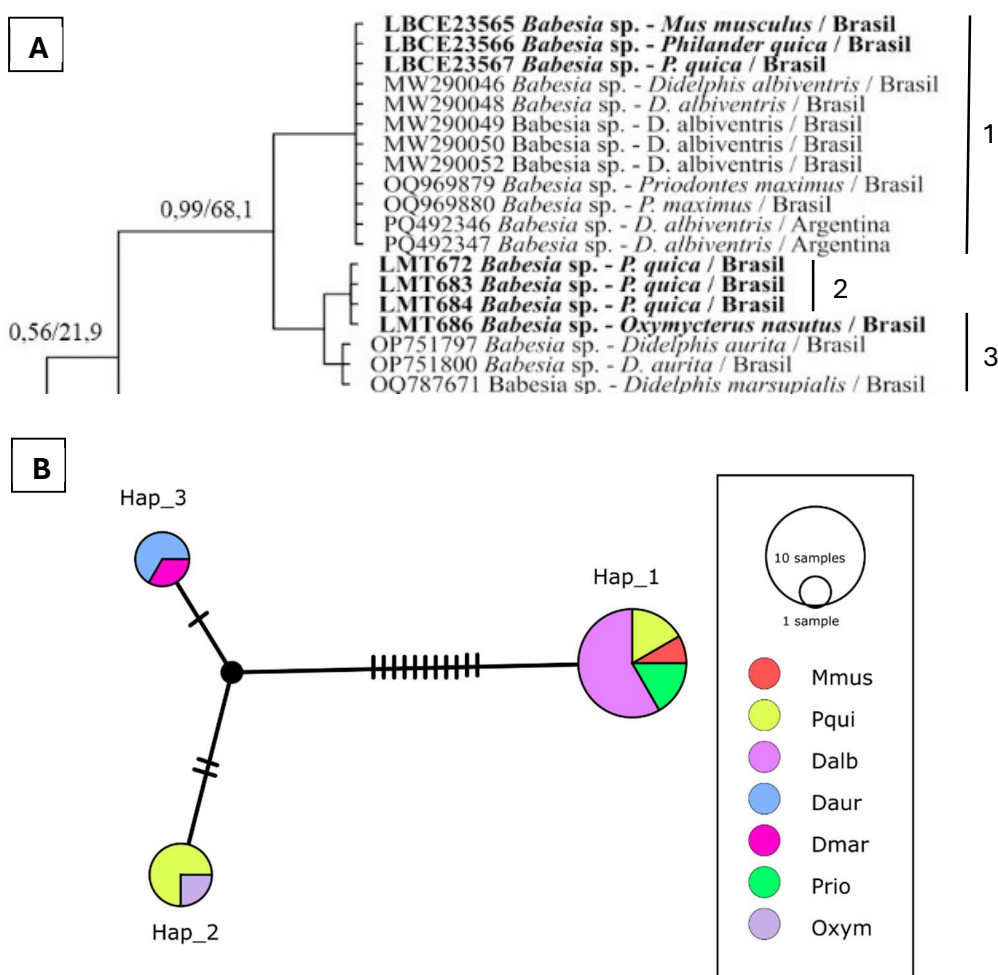


Figura 15. Em A, o clado Marsupialia da América do Sul, dividido em três subclados (1, 2 e 3). As sequências deste estudo estão em negrito. Em B, a rede de haplótipos formada a partir de sequências de *18S rDNA* (511 pb) que compõem o clado supracitado e seus subclados. Abreviações: Mmus, *Mus musculus*; Pqui, *Philander quica*; Dalb, *Didelphis albiventris*; Daur, *Didelphis aurita*; Dmar, *Didelphis marsupialis*; Prio, *Priodontes maximus* e Oxym, *Oxymycterus nasutus*.

A divergência evolutiva geral das 94 sequências (511pb) foi de 12%, enquanto a variabilidade genética entre o clado com as sequências deste estudo e sequências de estudos prévios variou de 9% para *Babesia l.s.* do grupo Percei (aves) e *Theileria l.s.* de marsupiais da Austrália a 15% para o clado *Babesia goianianensis* - capivaras.

Para as análises de polimorfismo foi utilizado o alinhamento de *18S rDNA* (511 pb) das sete sequências de *Babesia* spp. obtidas neste estudo e que revelaram os seguintes valores: $S = 13$, $Hd = 0.5714$, $\pi = 0.01574$ e dois haplótipos: IG ($n = 3$) e PG ($n = 4$).

A árvore filogenética construída com 57 sequências longas (~1600 pb) de *18S rDNA* de piroplasmas, demonstrou a mesma topologia observada na análise anterior com altos valores de suporte ($pp = 1$; $bt = 93,9$) para o clado com as sequências deste estudo (Figura 16). A divisão em três subclados e a aproximação com o clado irmão do grupo “*Babesia* Western” se mantiveram, porém com valores de suporte mais elevados ($pp = 0,79$; $bt = 36,8$) do que os observados na análise anterior.

Na análise filogenética construída com 37 sequências do gene *cox3* de piroplasmas (506 pb) a topologia de árvore foi semelhante às análises anteriores (gene nuclear e genes mitocondriais), ficando as sequências deste estudo separadas em um clado com alto suporte ($pp = 1$; $bt = 86,2$). A divisão em subclados foi mantida: o subclado com sequências obtidas de marsupiais da espécie *P. quica* e de roedor da espécie *O. nasutus* (PR) deste estudo ficou próximo a outro subclado com sequências obtidas em marsupiais *D. aurita* (RJ) de estudo prévio, com alto suporte ($pp = 1$; $bt = 85$) e um terceiro subclado separado com as sequências obtidas de marsupiais da espécie *P. quica* (RJ) deste estudo, com alto suporte ($pp = 1$; $bt = 92,5$) (Figura 17).

Na árvore filogenética construída com 39 sequências do gene *cox1* de piroplasmas (~520 pb), as sequências deste estudo se mantiveram isoladas demonstrando uma topologia semelhante à observada com o gene nuclear com médio suporte ($pp = 0,78$; $bt = 39,2$) (Figura 18). As sequências obtidas em marsupiais da espécie *P. quica* (RJ), deste estudo, agruparam-se às sequências obtidas em espécimes de *D. albiventris* (DF) do Brasil obtidas em estudo prévio, com elevado valor apresentado na análise bayesiana ($pp = 1$; $bt = 25,6$).

A análise filogenética construída com 32 sequências do gene *cytb* de piroplasmas (~800 pb) apresentou a mesma topologia das análises anteriores, ficando o clado com sequências obtidas em *P. quica* isolado dos demais e apresentando alto suporte ($pp = 1$; $bt = 0,98$) (Figura 19).

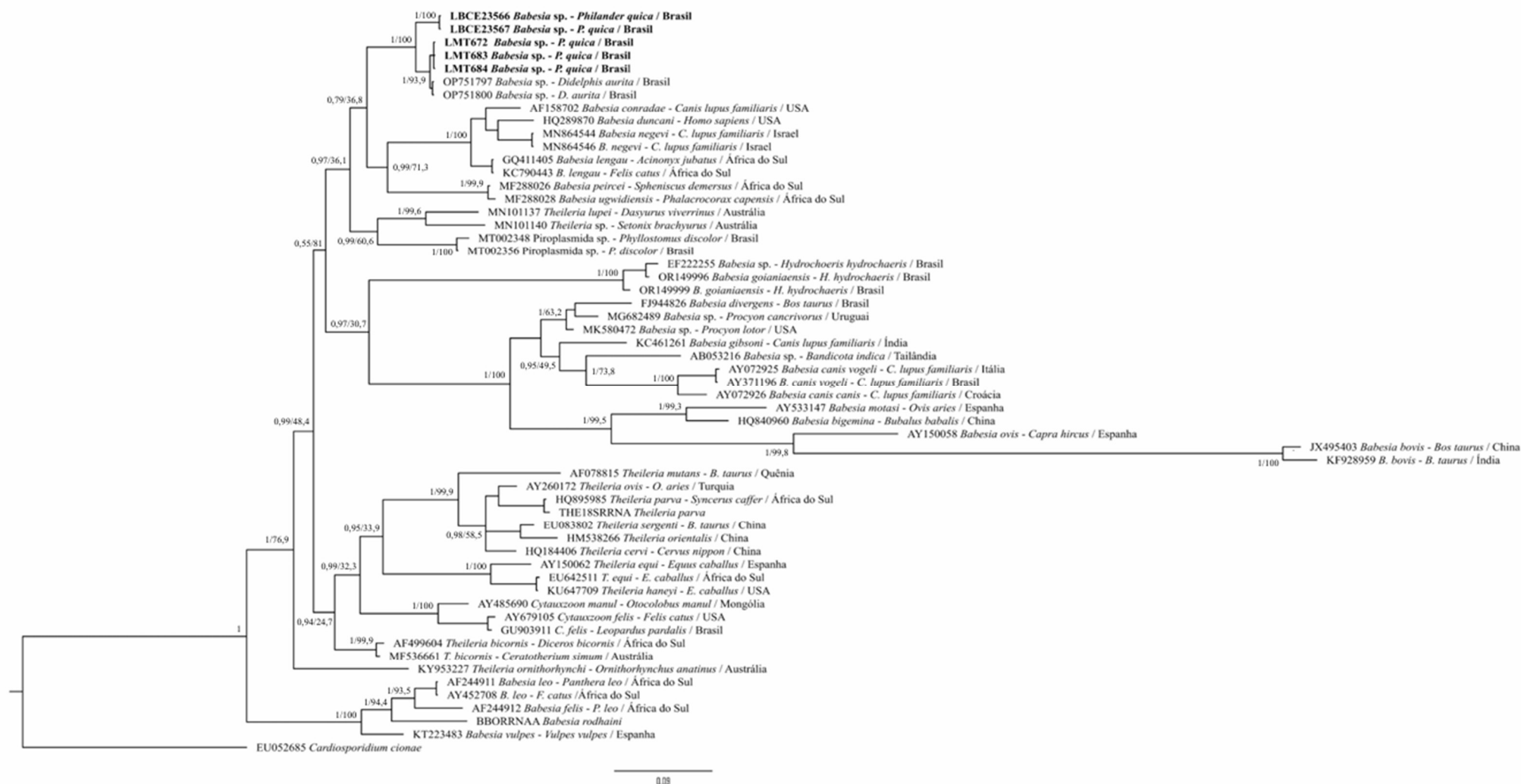


Figura 16. Relação filogenética de *Babesia* sp. com base no gene *18S rDNA* com um conjunto de dados final de 1633 pb e 57 sequências. A árvore filogenética foi inferida usando inferência bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências detectadas neste estudo estão destacadas em negrito. *Cardiosporidium cionae* (EU052685) foi usado como grupo externo. Suportes (IB/ML).

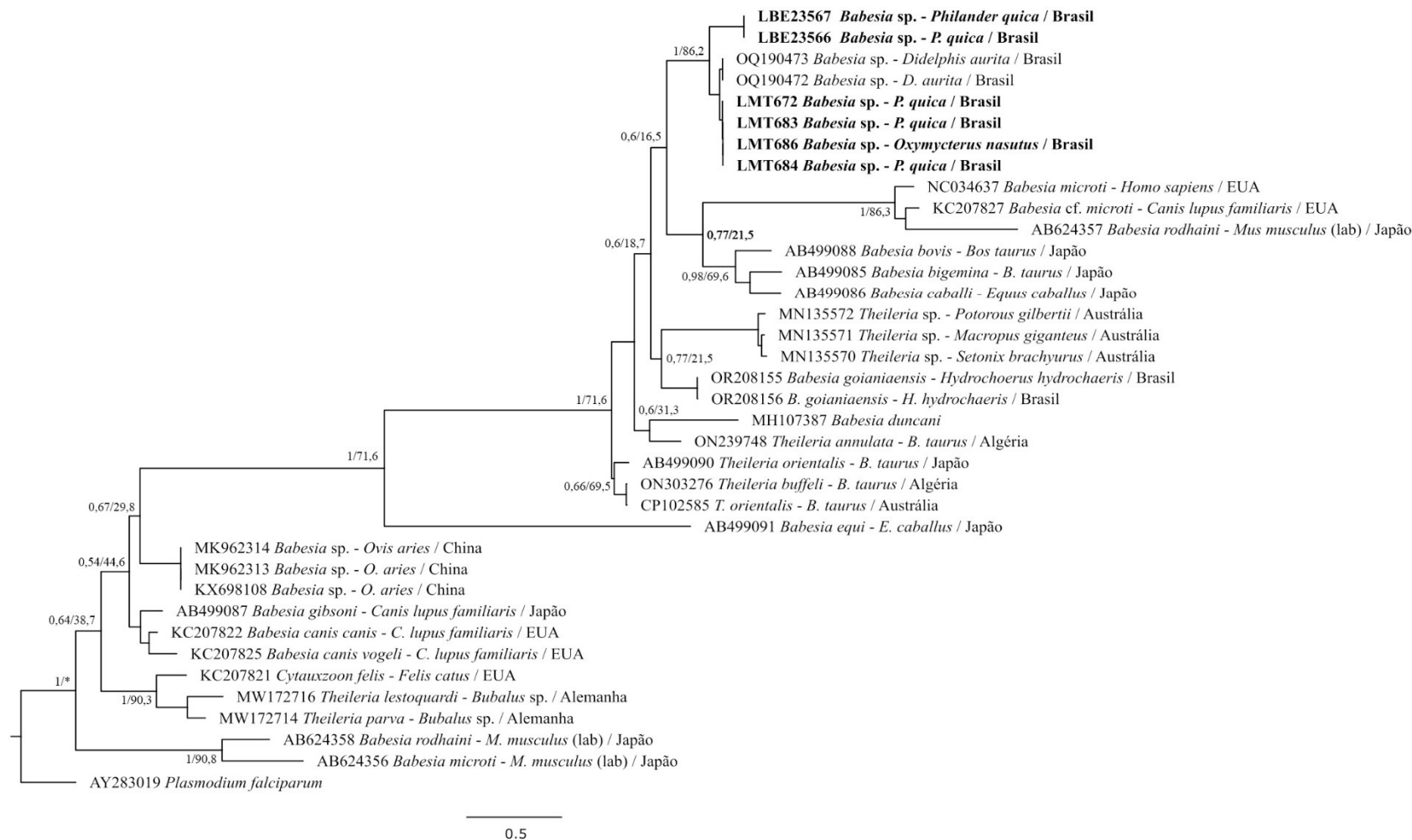


Figura 17. Relação filogenética de *Babesia* sp. com base no gene *cox3* com um conjunto de dados final de 506 pb com 37 sequências. A árvore filogenética foi inferida usando análise bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências deste estudo estão destacadas em negrito. *Plasmodium falciparum* (AY283019) foi usado como grupo externo. Suportes (IB/ML). *suporte não observado na árvore.

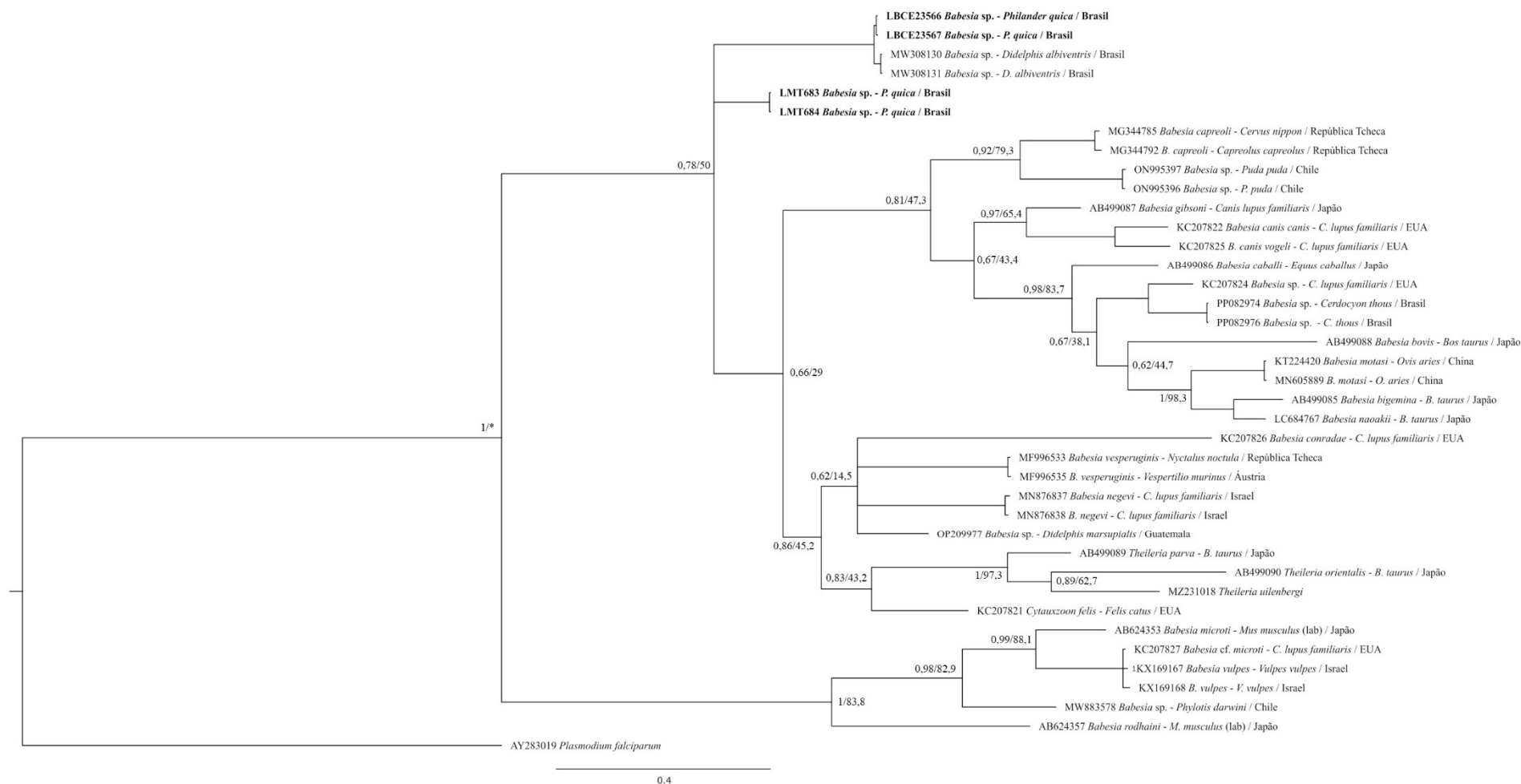


Figura 18. Relação filogenética de *Babesia* sp. com base no gene *cox1* com um conjunto de dados final de 521 pb e 39 sequências. A árvore filogenética foi inferida usando inferência bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências detectadas neste estudo estão destacadas em negrito. *Plasmodium falciparum* (AY283019) foi usado como grupo externo. Suportes (IB/ML). *suporte não observado na árvore.

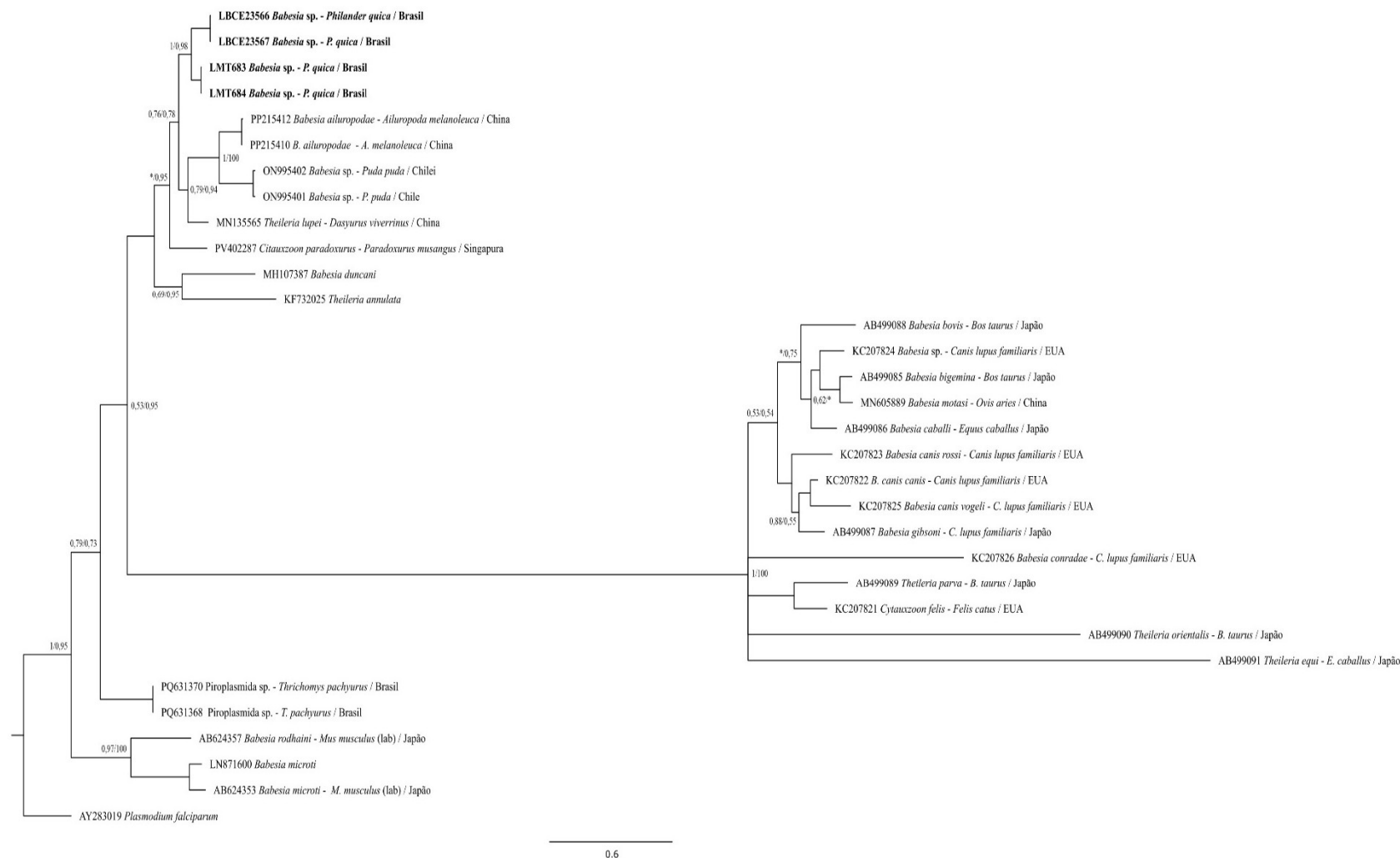


Figura 19. Relação filogenética de *Babesia* sp. com base no gene *cytb* com um conjunto de dados final de 803 pb e 32 sequências. A árvore filogenética foi inferida usando inferência bayesiana e máxima verossimilhança. As sequências deste estudo estão destacadas em negrito. *Plasmodium falciparum* (AY283019) foi usado como grupo externo. Suportes (IB/ML). *suporte não observado na árvore.

5 DISCUSSÃO

Atualmente poucos estudos empregam análises morfológicas em esfregaços de sangue como uma ferramenta diagnóstica para *Hepatozoon* spp. e para caracterização dos seus gametócitos em animais (Demoner *et al.*, 2019; Johnson *et al.*, 2007; Karbowiak *et al.*, 2005; Léveillé *et al.*, 2020). Quando comparamos medidas médias de gametócitos de *Hepatozoon* sp. (cápsula e núcleo) obtidas neste estudo com aquelas reportadas na literatura, encontramos similaridades morfométricas com *Hepatozoon milleri* descrita por Demoner e colaboradores (2019) em *Akodon montensis* e com *Hepatozoon griseisciuri* descrito por Léveillé e colaboradores (2020) em esquilo *Sciurus carolinensis* que não ocorre no Brasil (Tabela 4). Na análise morfológica não foram observadas características que possam diferenciar os gametócitos analisados neste estudo, como por exemplo, as demonstradas em *Hepatozoon ursi* detectados em ursos na Turquia que apresentavam uma protusão característica em sua cápsula (Akyuz *et al.*, 2020).

Dois gametócitos foram observados dentro do mesmo leucócito em um espécime de *A. montensis* de CM (Figura 8), sendo este o primeiro registro de dupla infecção por *Hepatozoon* sp. em um mesmo leucócito em roedores. Este achado é comumente detectado em répteis altamente parasitados por *Hepatozoon* spp., mais especificamente em serpentes (Sloboda *et al.*, 2007; Smith, 1996), sugerindo que um fenômeno semelhante possa ter ocorrido em *A. montensis* no presente estudo.

As análises morfométricas deste estudo revelam diferenças significativas na comparação dos gametócitos de *Akodon montensis* capturados em CM, NF e PG, em relação ao comprimento do gametócito e ao comprimento e largura do núcleo (Tabela 5). Achados similares não foram previamente reportados na literatura. Entretanto, com base nesses resultados e na detecção de haplótipos, nós comparamos as medidas médias de gametócitos dos dois haplótipos que apresentaram o maior número de gametócitos e observamos que o comprimento médio dos gametócitos do haplótipo 4 ($n = 153$ gametócitos), provenientes de CM, foi significativamente maior que os do haplótipo 3 ($n = 96$ gametócitos) ($p < 0.01$).

Os resultados da PCR demonstraram uma prevalência geral de infecção por *Hepatozoon* spp. de 24,27% (75/309) nas amostras de fígado analisadas, com *A. montensis* sendo a espécie de roedor com maior prevalência (45,28%, 48/106), bem como a mais abundante deste estudo. Esta espécie de roedor foi previamente reportada como infectada por *Hepatozoon* spp. (Perles *et al.*, 2019; Weck *et al.*, 2022) e identificada como hospedeira de *H. milleri* (Demoner *et al.*, 2019) em estudos anteriores conduzidos no Brasil. A segunda espécie mais prevalente foi *Sooretamys angouya* 45,45% (5/11) em CM. Esta espécie de roedor foi previamente reportada infectada por *Hepatozoon* sp. em São Paulo, no município de Botucatu (Demoner *et al.*, 2016). Pode-se inferir que *A. montensis* tenha sido a espécie que apresentou maior prevalência de infecção por ser a mais abundante, todavia a mesma analogia não pode ser atribuída às infecções em *S. angouya*. Outros dados biológicos devem ser considerados, como comportamento (grooming), suscetibilidade, imunidade do hospedeiro e coevolução parasito-hospedeiro.

A prevalência detectada em CM (*A. montensis*, *M. musculus*, *O. nigripes* e *S. angouya*) foi similar a taxa de testes positivos para *Hepatozoon* spp. reportados na região de Botucatu, no Estado de São Paulo (55,2% em *Akodon* sp., *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys flavescens*, *O. nigripes* e *S. angouya*) (Demoner *et al.*, 2016). Sendo mais alta que os testes positivos (21,8% em *Thrichomys fosteri* e *Oecomys mamorae*) detectados na região do Pantanal, no Estado de Mato Grosso do Sul (Sousa *et al.*, 2017) e os testes positivos em roedores *Calomys callosus* no Estado de Mato Grosso (7,1%) (Wolf *et al.*, 2016). Entretanto, a mais alta prevalência encontrada neste estudo foi inferior a reportada em Valdivia, Chile, onde 82,43% dos roedores

(*Abrothrix longipilis*, *A. olivaceus*, *M. musculus*, *Oligoryzomys longicaudatus*, *Rattus norvegicus*, e *R. rattus*) estavam infectados por *Hepatozoon* spp. (Alabi *et al.*, 2021).

Uma baixa prevalência de infecção entre roedores (6,66%, 4/60) foi detectada no município de PG, onde a maior diversidade (11 espécies) de pequenos mamíferos foi detectada. Isto pode ser atribuído ao fato de ser uma área com menor impacto antrópico, diferindo dos achados de Weck e colaboradores (2022), que detectou infecção por *Hepatozoon* spp. em áreas com alta diversidade de pequenos mamíferos e carrapatos. Estes resultados sugerem que o ciclo de vida deste parasito ocorre através de uma interação complexa entre vertebrados e invertebrados.

Roedores da espécie *A. montensis* apresentaram a maior prevalência geral de infecção em comparação com outras espécies de roedores e foram encontrados infectados com *Hepatozoon* spp. em todas as áreas onde estavam presentes, com valores de prevalência expressivos. Isto sugere que *A. montensis* pode servir como um hospedeiro intermediário comum de *Hepatozoon* spp. na Mata Atlântica Brasileira.

As análises de BLASTn revelaram alta similaridade (99,8% a 100%) entre as sequências de *Hepatozoon* spp. obtidas em roedores neste estudo e sequências obtidas de roedores *Akodon* sp. e *Euryoryzomys russatus* Wagner, 1848 da Mata Atlântica do município de São Paulo, no Estado de São Paulo (Weck *et al.*, 2022). Infelizmente, a falta de identificação ao nível de espécie de alguns roedores impede comparações diretas, principalmente devido à ocorrência de simpatria entre espécies de *Akodon* naquela área (Pardiñas *et al.*, 2015). A análise BLASTn com menor similaridade foi observada para as sequências que representam o haplótipo 1, que apresentaram 99,81% de similaridade com a melhor sequência de BLAST hit obtida de *Hepatozoon* sp. infectando *Akodon* sp. e *Euryoryzomys russatus* (OM033660-OM033663) do Estado de São Paulo (Weck *et al.*, 2022).

As sequências de roedores deste estudo estão incluídas no Clado A de *Hepatozoon* spp., que compreende sequências obtidas de roedores e répteis de diferentes partes do mundo, assim como de marsupiais das Américas. Este clado permanece distinto do Clado E, o qual inclui sequências obtidas de carnívoros, um padrão também observado em estudos prévios (Maia *et al.*, 2014; Perles *et al.*, 2019; Weck *et al.*, 2022). A divergência genética de 5% foi observada entre as sequências destes clados.

Nossas análises apoiam a associação do parasitismo de *Hepatozoon* spp. entre pequenos mamíferos não voadores e répteis, confirmando a existência de um ciclo enzoótico no qual os primeiros atuam como hospedeiros intermediários ou paratênicos, sendo predados por répteis dentro da rede trófica. Esta hipótese foi experimentalmente demonstrada por Sloboda e colaboradores (2008), que obtiveram sucesso na infecção da serpente *Python regius* com *Hepatozoon ayorgbour* através da ingestão de tecidos infectados de roedores. Entretanto, algumas espécies recuperadas de serpentes permanecem isoladas no Clado C, com uma distância genética de 6% (BI 1) a 5% (BI 2), sugerindo que nem todas as espécies deste parasito participam do ciclo enzoótico roedores-répteis. Outra possível via para a transmissão deste parasitismo poderia ser a ingestão acidental do hospedeiro definitivo pelo réptil, como inferido para a serpente *Xenodon matogrossensis*, que foi encontrada infectada por *Hepatozoon cepavii* (ON237359) apesar de não se alimentar de roedores (Ungari *et al.*, 2022). Futuros estudos deste parasitismo envolvendo estas ordens de vertebrados são necessários para expandir o conhecimento sobre estas relações tróficas que influenciam na dinâmica de transmissão de *Hepatozoon* spp..

As sequências de *Hepatozoon* spp. detectadas neste estudo correspondem a quatro haplótipos. O haplótipo 1 foi identificado na região montanhosa da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro em um espécime de *Oxymycterus quaestor* (PQ807534), entretanto, já havia sido descrito em roedores *Calomys callidus* (MH111420) do Estado do Mato Grosso. A circulação do mesmo haplótipo de *Hepatozoon* sp. entre roedores das regiões Centro-Oeste e

costeira do Brasil foi reportada em estudo prévio (Perles *et al.*, 2019). Embora estas duas ecorregiões tenham paisagens altamente diversas, um recente estudo descreve o potencial fluxo gênico de outra espécie de roedor, *Necomys lasiurus*, ocorrendo entre a Mata Atlântica do Rio de Janeiro e a região onde está incluído o Estado de Mato Grosso desde o Holoceno (Santos *et al.*, 2024). Considerando que à medida que os hospedeiros migram, seus parasitos associados circulam com eles, este pode ser o caso dos nossos resultados em relação ao haplótipo 1. É válido ressaltar que a infecção por *Hepatozoon* sp. já foi também reportada em um espécime de *N. lasiurus* do Mato Grosso, cuja sequência (MH111419) é a representante do haplótipo 5 (Perles *et al.*, 2019), circulando entre roedores do Brasil (Figura 12).

O haplótipo 3 foi previamente descrito em roedores da Mata Atlântica do Estado de São Paulo, incluindo *Akodon* sp., *A. montensis* e *Euryoryzomys russatus* (Demoner *et al.*, 2019; Weck *et al.*, 2022), bem como em *Galea spixii* do Estado da Bahia (Perles *et al.*, 2019). Neste estudo ele foi detectado em *A. cursor* e *A. montensis* na região montanhosa do Rio de Janeiro (NF), bem como em *A. montensis* e *Mus musculus* nos três municípios amostrados no Estado do Paraná (CM, LD e PG). Este foi o haplótipo mais bem distribuído geograficamente, sendo detectado em todas as áreas onde o parasito esteve presente. Na árvore filogenética reconstruída usando as sequências curtas de *18S rDNA*, o haplótipo 3 demonstrou uma relação próxima com a sequência representativa de *Hepatozoon milleri* (KU667308), obtida de *A. montensis* no Estado de São Paulo (Demoner *et al.*, 2019). Entretanto, os haplótipos 2 e 4 foram agrupados separadamente, representando possivelmente novos haplótipos de *Hepatozoon* spp. detectados em roedores da Mata Atlântica do Paraná. O haplótipo 2 foi detectado em *Oxymycterus nasutus* e *M. musculus* dos municípios de PG e LD, respectivamente, enquanto o haplótipo 4 foi encontrado em *A. montensis*, *O. nigripes* e *Sooretamys angouya* em CM. Finalmente, este estudo detectou dois distintos haplótipos de *Hepatozoon* spp. infectando roedores, com proporções variáveis entre os municípios analisados (Figura 10). A descoberta de novos haplótipos é de grande valor para preencher lacunas e suportar a hipótese de alta diversidade genética de *Hepatozoon* spp. entre populações de roedores silvestres no Brasil (Perles *et al.*, 2019; Thomas *et al.*, 2024).

Neste estudo, dois haplótipos distintos foram detectados em roedores das espécies *A. montensis* (Haplótipo 3 e 4) e *M. musculus* (Haplótipos 2 e 3). A detecção de diferentes haplótipos em uma mesma espécie de roedor foi previamente reportada no Brasil (Perles *et al.*, 2019) e Chile (Alabi *et al.*, 2021), mas não foi possível detectar nenhuma associação entre um haplótipo específico e um grupo de roedores em particular (silvestres ou sinantrópicos), como foi observado no Chile (Alabi *et al.*, 2021).

A distância genética baseada no *18S rDNA* entre as sequências dentro do Clado A (intragrupo), no qual estão incluídas as sequências deste estudo, foi muito baixa (1%) e insuficiente para inferir possíveis distinções entre espécies de parasito. Isto foi observado apesar da inclusão de duas das três regiões hipervariáveis (V2 e V4) do gene *18S rDNA* de *Hepatozoon* spp. nas sequências de 1600 pb analisadas. Logo, a utilização de outros genes na análise filogenética deste parasito, como os mitocondriais, se torna imprescindível, porém não obtivemos sucesso com a amplificação do gene *cox1*, o que limitou a caracterização de *Hepatozoon* spp. neste estudo.

As análises de polimorfismo de nucleotídeos das sequências de *Hepatozoon* spp. deste estudo revelaram uma moderada diversidade haplotípica ($H_d = 0,577$), mais elevada que a reportada em um estudo usando sequências obtidas de roedores de vários biomas brasileiros ($H_d = 0,426$) (Perles *et al.*, 2019). Entretanto, foi menor que a diversidade detectada em roedores do Chile ($H_d = 0,933$) (Alabi *et al.*, 2021). Ao analisar as sequências do Brasil e do Chile incluídas na rede de haplótipos ($n = 61$), observamos uma alta diversidade de haplótipos ($H_d = 0,701$), tendo estas se agrupado em quatro haplogrupos, todos originários de um haplótipo ancestral que ainda não foi descrito ou está extinto (representado pelo círculo preto no centro =

median vector) (Bandelt *et al.*, 1999). Os haplogrupos não foram compartilhados entre os dois países, sendo os haplótipos 1 a 8 detectados no Brasil e os haplótipos 9 a 11 detectados no Chile, sugerindo uma estruturação geográfica (Ferrerri *et al.*, 2011). Estes achados foram corroborados por resultados significativos de AMOVA e Fst, que revelaram diferenças genéticas entre as sequências dos dois países. No entanto, há uma lacuna de informações entre essas regiões amostradas. De acordo com Ferrerri e colaboradores (2011), a frequência, distribuição e arranjo dos haplótipos pode revelar uma história de eventos filogeográficos relativos à teoria da coalescência. Sem dúvida, existem haplótipos adicionais de *Hepatozoon* spp. nesses países, no entanto, algumas sequências disponíveis no GenBank não foram incluídas em nossa análise por não atenderem ao critério de tamanho (> 500 pb) ou por corresponderem a diferentes regiões do fragmento *18S rDNA*.

As sequências obtidas em marsupiais das espécies *M. americana* e *P. quica* neste estudo apresentaram um tamanho inferior ao necessário para a separação dos haplótipos e por isso não puderam ser inseridas na análise filogenética. Este é o achado de primo-infecção por *Hepatozoon* sp. em *M. americana* e a primeiro registro molecular deste parasito em *P. quica* que foi descrita infectada por *Haemogregarina metachiri* (análise morfológica de gametócitos) por Regendanz e Kikuth, em 1928. Futuramente estas amostras de DNA positivas serão submetidas a diferentes pares de *primers* objetivando aumentar o tamanho das sequências e, então, serão submetidas à análise filogenética.

Vale ressaltar que a maior prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. foi detectada em *M. americana* (100%), mas este resultado deve ser observado com cautela devido a baixa captura de marsupiais desta espécie neste estudo (n = 2) o que pode ter influenciado o resultado final.

Neste estudo detectamos *Babesia* sp. em pequenos mamíferos capturados no Paraná (*O. nasutus* e *P. quica*) e Rio de Janeiro (*M. musculus* e *P. quica*). O melhor resultado de similaridade na análise de BLASTn das sequências de *18S rDNA* foi de 98,12% a 99,67% com sequências obtidas em marsupiais *D. aurita* (OP751797 e OP751800) no Rio de Janeiro, porém não observamos sinais clínicos relacionados à babesiose nos animais analisados, como relatados em algumas publicações (Lopes *et al.*, 1973; Oliveira *et al.*, 2023; Serra-Freire *et al.*, 1979).

Foram observadas estruturas em forma de anel ou ovóides em esfregaços sanguíneos de marsupiais das duas áreas com positividade nas análises moleculares, sendo similares aos reportados em estudos prévios (Gonçalves *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2023). Os merozoítos foram detectados em quatro exemplares de *P. quica*, sendo dois em IG (2/5, 40%) e dois em PG (2/5, 40%). Entretanto, como na descrição de *B. brasiliensis* em *P. quica* (Regendanz e Kikuth, 1928) não foram observadas formas intraeritrocíticas em cruz de Malta, como em outros estudos com marsupiais das espécies *P. quica* (Lopes *et al.*, 1973) e *D. aurita*, ambos no estado do Rio de Janeiro (Oliveira *et al.*, 2023; Serra-Freire, 1979). A primodescrição morfológica de *B. brasiliensis* é semelhante às formas encontradas neste estudo, porém as médias do estudo prévio (média = 1 a 1,25 µm) são inferiores às encontradas neste estudo (média = 2,15 a 2,34 µm) que são mais próximas às médias de outros estudos (Oliveira *et al.*, 2023; Serra-Freire, 1979). Não foram observados merozoítos nos esfregaços de sangue dos roedores positivos em nosso estudo.

A prevalência total de infecção por *Babesia* sp. em pequenos mamíferos neste estudo foi de 2,26% (7/309). Considerando a prevalência por localidade, foi detectada infecção por *Babesia* sp. em 6,66% (4/60, um *O. nasutus* e três *P. quica*) e 10% (3/30, um *M. musculus* e dois *P. quica*) dos pequenos mamíferos analisados em PG e IG, respectivamente. Estes resultados foram inferiores aos 48,5% de infecção por *Babesia* sp. em *D. albiventris* em Brasília e 25,5% de infecção por *Babesia* sp., na mesma espécie de hospedeiro, em Mato Grosso do Sul (Gonçalves *et al.*, 2021), aos 39,3% de infecção por *B. goianiaensis* em capivaras em Goiás (Krawczak *et al.*, 2023), aos 33,3% de infecção por *Babesia* sp. em *D. aurita* mantidos em

centros de reabilitação no Rio de Janeiro (Oliveira *et al.*, 2023) e aos 11,7% de infecção por piroplasmas detectados em *T. pachyurus* em Mato Grosso (Pacheco *et al.*, 2025). Porém, nosso resultado foi semelhante em PG e superior em IG, aos resultados das prevalências de infecção por *Babesia* sp. em *T. fosteri* (6%) no Pantanal de Mato Grosso do Sul (Sousa *et al.*, 2018) e em *D. marsupialis* (6,46%) em Mato Grosso (Colle *et al.*, 2019). Quando se avalia a prevalência por espécie de hospedeiro, detectamos prevalências elevadas em PG (60%) e IG (40%) em *P. quica*, sendo o resultado encontrado no Paraná apenas inferior aos 70% detectados na Guatemala em *D. marsupialis* (Thomas *et al.*, 2023).

Além da recente descrição de *B. goianiaensis* em capivaras (Krawczak *et al.*, 2023), estudos prévios reportaram detecção molecular de piroplasmas em pequenos roedores no Brasil, em *T. pachyurus* em Mato Grosso (Wolf *et al.*, 2016) e *Thrichomys fosteri* no Pantanal de Mato Grosso do Sul (Sousa *et al.*, 2018). Pelo nosso atual conhecimento esta é a primeira detecção molecular de *Babesia* sp. em roedor silvestre da espécie *O. nasutus* e em roedor sinantrópico, *M. musculus*, neste país. Possivelmente estes são hospedeiros acidentais que podem ter sido infectados ao coabitarem o ecossistema comum com os marsupiais/vetores infectados ou terem adquirido o parasito por via oral, através do comportamento de *grooming*, com a ingestão dos ectoparasitos infectados. Esta segunda hipótese foi experimental comprovada por Corduneanu e colaboradores (2020) que detectaram DNA de *B. canis* em órgãos de roedores de laboratório infectados por via oral, até 30 dias após o início do experimento, explicando a presença do DNA do parasito nos órgãos analisados naquele estudo.

Nos *P. quica* analisados (n = 10) neste estudo, obtivemos uma elevada positividade em amostras de fígado, 40% (2/5) em IG e 60% (3/5) em PG, além da considerável parasitemia (40%) observada nos marsupiais analisados nas duas localidades. O que nos leva a inferir que a transmissão ocorreu através da inoculação dos parasitos durante o repasto sanguíneo dos ixodídeos infectados. Como, neste caso, os vetores ixodídeos ainda são desconhecidos, futuras pesquisas com este objetivo devem ser incentivadas. Estes resultados de positividade foram superiores aos detectados na análise de amostras de sangue de *D. albiventris* (25,5%) em Mato Grosso do Sul (Gonçalves *et al.*, 2021) e de amostras de sangue e medula óssea de *D. aurita* (20%) no Rio de Janeiro, (Oliveira *et al.*, 2023). Porém, foram inferiores aos 70% de positividade detectada em amostras de fígado, baço e sangue de *D. marsupialis* na Guatemala (Thomas *et al.*, 2023).

As análises “par a par” das sequências de *18S rDNA* deste estudo demonstraram uma divergência genética de 2,7% entre as duas localidades (IG e PG), de 2,5% entre as sequências detectadas neste estudo no RJ e as sequências detectadas em *D. aurita* do mesmo estado em outro estudo, porém as sequências obtidas em *D. albiventris* (DF, MS e Argentina) e xenartras não apresentaram divergência. Enquanto as sequências obtidas neste estudo, em PG, demonstraram divergência genética de 2,7% das sequências obtidas em *D. albiventris* (DF, MS e Argentina) e xenartras. Ao compararmos as distâncias par a par de piroplasmas de um mesmo grupo, como por exemplo, *Babesia pernei* e *Babesia poeala* pertencentes ao grupo Pernei, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis canis*, grupo *Babesia s.s.*, e *Theileria equi* e *Theileria haneyi*, grupo Equus, obtemos os resultados de 0,21%, 4,18% e 4,32%, respectivamente, o que nos permite sugerir que as sequências divididas em subclados no clado Marsupialia da América do Sul, podem representar diferentes espécies do gênero *Babesia*. Esta hipótese também foi sugerida por Oliveira e colaboradores (2023) ao comparar as sequências de *18S rDNA* de *Babesia* spp. obtidas em didelfídeos do Rio de Janeiro e Brasília. Porém, mais dados são necessários para confirmar esta hipótese.

As sequências obtidas em roedores deste estudo demonstraram elevados resultados de divergência genética em relação aos outros estudos em animais desta ordem, sendo de 15,9 a 16,4% em relação à *B. goianiaensis* (capivaras) e de cerca de 10% para *Babesia* sp. detectada em *T. pachyurus*, reforçando a hipótese de que sejam resultado de infecções acidentais.

Nas análises filogenéticas de sequências de *18S rDNA* (511 pb e de 1633 pb) as sequências deste estudo se agruparam em um clado com sequência de outros marsupiais (Brasil e Argentina) e xenartras do Brasil, divididas em subclados, tendo como clado irmão o composto por sequências de *Babesia l.s.* dos grupos Western e Percei. Este resultado foi demonstrado em estudos anteriores (Calchi *et al.*, 2023; Gonçalves *et al.*, 2021), mas diferiu de outra análise filogenética, com o mesmo gene (Oliveira *et al.*, 2023). Na análise filogenética com o gene *cox1*, o clado com as sequências deste estudo e sequências obtidas de *D. albiventris* do Brasil se manteve isolado, o que diferiu de outra publicação com este gene, onde as sequências obtidas de marsupiais ficou como clado irmão de uma sequência de *B. conradae* (grupo Western) (Gonçalves *et al.*, 2021). Um clado isolado com as sequências de *cytb* deste estudo, teve como clado irmão o composto por *Babesia ailuropodae* obtido em pandas (China) e *Babesia* sp. obtido em cervídeos *Pudu puda* (Chile) e se aproximou do clado com sequência de *B. duncani* (grupo Western), possivelmente por não terem sequências homólogas de marsupiais latino-americanos depositadas no GenBank. Na análise filogenética de *cox3*, foi observada a mesma topologia das demais, ficando as sequências deste estudo e sequências obtidas em *D. aurita*, obtidas em outro estudo, isoladas em um único clado, subdividido em três subclados.

A rede de haplótipos foi construída com as sequências de *18S rDNA* (511 pb) do clado denominado Marsupialia da América do Sul e que demonstrou uma média diversidade genética ($Hd = 0,561$), inferior a obtida em estudo prévio com didelfídeos do Rio de Janeiro ($Hd = 0,972$) (Oliveira *et al.*, 2023), e três haplótipos, resultado inferior ao estudo supracitado. Porém pudemos observar que o haplótipo do subclado 1 que continha as sequências de *Babesia* sp. obtidas em *P. quica* do Rio de Janeiro deste estudo, além de sequências de *D. albiventris* do Brasil e Argentina, apresentou vários eventos mutacionais que o distanciavam do haplótipo não contemplado na análise (*median vector*), demonstrando um elevado distanciamento genético dos demais haplótipos amostrados (Figura 15). Enquanto o haplótipo do subclado 2, com as sequências de *P. quica* do Paraná deste estudo, apresentou-se mais próximo, com apenas dois passos mutacionais, porém, permaneceu isolado de outras sequências, sugerindo ser um novo haplótipo de *Babesia* sp. de marsupiais da América do Sul.

Ressaltamos a importância da obtenção neste estudo dos dados moleculares multigenes (*18S rDNA*, *cox3*, *cox1* e *cytb*) em marsupiais da espécie *Philander quica* do estado do Rio de Janeiro, além de análises morfológicas de merozoítos compatíveis com a primodescrição, o que possivelmente resgatou os dados faltantes de *Babesia brasiliensis*, descrita por Regendanz e Kikuth em 1928, permitindo sua inclusão no recém nomeado clado Marsupialia da América do Sul.

6 CONCLUSÕES

- A maior prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. em roedores foi detectada em *Akodon montensis* (45,28%), a espécie mais abundante, sugerindo uma co-evolução parasito/hospedeiro;
- A maior prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. foi detectada em marsupiais da espécie *Monodelphis americana* (100%);
- Novos hospedeiros de *Hepatozoon* sp. são descritos entre roedores brasileiros: *Oxymycterus nasutus* e *Oxymycterus quaestor* e em marsupial da espécie *Monodelphis americana*;
- Este foi o primeiro registro de infecção por *Hepatozoon* sp. em roedores no estado do Paraná;
- Este foi o primeiro registro de infecção por *Hepatozoon* sp. detectada através de análise molecular em marsupial da espécie *Philander quica*;
- Há diferenças significativas nos tamanhos médios de gametócitos de *Hepatozoon* sp. pertencentes a diferentes haplótipos observados em roedores ($p < 0.01$);
- Dois novos haplótipos de *Hepatozoon* spp. são descritos entre roedores brasileiros do estado do Paraná: haplótipo 2 (*O. nasutus* e *M. musculus*) e haplótipo 4 (*A. montensis*, *O. nigripes* e *S. angouya*);
- Com base na análise da rede de haplótipos, sugerimos que há uma estruturação geográfica de haplogrupos de *Hepatozoon* associados a roedores do Brasil e do Chile ($F_{st} = 0.567$; $p < 0.01$);
- Há elevada prevalência de infecção por *Babesia* spp. entre marsupiais *Philander quica* nos estados do Paraná (60%) e Rio de Janeiro (40%) quando comparados aos registros em animais desta ordem na América Latina;
- Dois novos hospedeiros de *Babesia* spp. são descritos entre roedores brasileiros da espécie: *Oxymycterus nasutus*, no estado do Paraná, e *Mus musculus*, no estado do Rio de Janeiro;
- Este é o primeiro registro de infecção por *Babesia* sp. em pequenos mamíferos no estado do Paraná;
- Esta é a primeira detecção molecular de *Babesia* spp. em marsupiais *Philander quica* no Brasil;
- As sequências de *Babesia* spp. obtidas neste estudo no Paraná (*Oxymycterus nasutus* e *Philander quica*) e no Rio de Janeiro (*Mus musculus* e *Philander quica*) pertencem a dois diferentes haplótipos;
- Há um possível novo haplótipo de *Babesia* sp. em pequenos mamíferos (*Oxymycterus nasutus* e *Philander quica*) no estado do Paraná;
- Nosso estudo confirma a posição filogenética (*18S rDNA*, *cox3*, *cox1* e *cytb*) única do clado Marsupialia da América do Sul de *Babesia* spp., onde estão incluídas as sequências obtidas em pequenos mamíferos neste estudo;
- Estes são os dados moleculares (multigenes) faltantes de *Babesia brasiliensis* de marsupiais da espécie *Philander quica*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de marcadores moleculares adicionais, incluindo genes mitocondriais e nucleares no estudo de *Hepatozoon* spp. em pequenos mamíferos, pode contribuir para uma caracterização mais precisa das espécies e uma compreensão mais profunda da diversidade e evolução do parasitismo dentro da ordem Rodentia.

A análise multigênica de *Babesia* spp. (*18S rDNA*, *cox3*, *cox3* e *cytb*) e microscópica de merozoítos corroborou com o recém nomeado clado Marsupialia da América do Sul de *Babesia* l.s. que, apesar de não exclusivo, é predominantemente composto por hospedeiros da ordem Didelphimorphia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, E.F. *et al.*, Lista de Mamíferos do Brasil (2024-1) [Data set]. **Zenodo**. DOI:10.5281/zenodo.14536925. Disponível em: <https://zenodo.org/records/14536925>. Acesso em: 29 out. 2025.
- ADL, S.M. *et al.*, The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16248873>. Acesso em 31 jul. 2021.
- ADL, S.M. *et al.*, The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429-493, Sep. 2012. DOI:10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23020233>. Acesso em: 31 jul. 2021.
- ADL, S.M. *et al.*, Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 4-119, Jan. 2019. DOI:10.1111/jeu.12691. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30257078/>. Acesso em: 5 ago. 2025.
- ALABI, A.S. *et al.*, Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Chile. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 30, e012721, 8 Nov. 2021. DOI: 10.1590/S1984-29612021082. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34755807/>. Acesso em: 11 dez. 2021.
- ALLSOPP, M.T.E.P.; ALLSOPP, B.A. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1081, p. 509-517, Oct. 2006. DOI: 10.1196/annals.1373.076. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17135560/>. Acesso em: 6 jul. 2021.
- ANDRÉ, M.R. *et al.*, Novel *Ehlichia* and *Hepatozoon* genotypes in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) and associated ticks from Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 6: 102022, Nov. 2022. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2022.102022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35973262/>. Acesso em: 12 jan. 2023.
- AYLA, S.C. *et al.*, Hemoparasite Infections in 830 wild animals from the Eastern Llanos of Colombia. **The Journal of Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 52-59, Feb. 1973. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/463157/>. Acesso em: 5 mai. 2025.
- AYRES, M. *et al.*, **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Instituto Mamirauá: Belém, Brazil, v. 364, 2007.
- AKYUZ, M.; KIRMAN, R.; GUVEN, E. Morphological and molecular data of *Hepatozoon ursi* in two brown Bears (*Ursus arctos*) in Turkey. **Folia Parasitologica**, v. 67: 032, Nov. 2020. DOI: 10.14411/fp.2020.032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33245293/>. Acesso em: 4 ago. 2022.
- BANDELT, H.J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 1, p. 37-48, Jan. 1999.

DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331250>. Acesso em: 29 out. 2025.

BALTRÜNAITĖ, L.; KITRYTĖ; KRIZANAUSKIENE, A. Blood parasites (*Babesia*, *Hepatozoon* and *Trypanosoma*) of rodents, Lithuania: part I. Molecular and traditional microscopy approach. **Parasitology Research**, v. 119, p. 687-694, Feb. 2020. DOI: 10.1007/s00436-019-06577-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31897793/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the Tick *Rhipicephalus sanguineus* and Domestic Dog (*Canis familiaris*). **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 283-299, Apr. 2007. DOI: 10.1645/GE-494R.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17539411/>. Acesso em: 11 ago. 2021.

BANETH, G. Perspectives on Canine and Feline Hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 2-11, Sep. 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.04.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21620568/>. Acesso em: 9 jun. 2025.

BARBOSA, A.D. *et al.*, Sequence analyses at mitochondrial and nuclear loci reveal a novel *Theileria* sp. and aid in the phylogenetic resolution of piroplasms from australian marsupials and ticks. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, e0225822, Dec. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0225822. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31851687/>. Acesso em: 1 jul. 2021.

BARTA, J.R. *et al.*, Phylogenetic position of the Adeleorinid Coccidia (Myxozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorina, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 171-180, Mar-Apr. 2012. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2011.00607.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22313415>. Acesso em: 2 nov. 2023.

BENSON, D.A. *et al.*, GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 15-18, 1 Jan. 2000. DOI: 10.1093/nar/28.1.15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592170/> Acesso em: 29 out. 2025.

BHOORA, R. *et al.*, Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 112-120. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19019541/>. Acesso em: 28 mai 2025.

BOCK, R.; JACKSON, A.V.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v.129. Suppl.S247-269. DOI: 10.1017/s0031182004005190. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15938514/>. Acesso em: 30 nov. 2022.

BOULLIANNE, B.; EVANS, R.C.; SMITH, T.G. Phylogenetic analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by *ITS-1* sequences. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 6, p. 1435-1441, Dec. 2007. DOI: 10.1645/GE-1041.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18314691/>. Acesso em: 9 abr. 2025.

BRANDS, S.J. (ed.), 2025. Domain *Eukaryota* Chatton, 1925. In *Systema Naturae* 2000. **The Taxonomicon**, 1 Feb 2024. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. Disponível em: <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=673&src=0>. Acesso em: 30 mai. 2025.

BRESHEARS, M.A.; KOCAN, K.M.; JOHNSON, E.M.; PANCIERA, R.J. Light and transmission electron microscopic characteristics of a novel *Hepatozoon* spp. in naturally infected cotton rats (*Sigmodon hispidus*). **Parasitology Research** v. 105, n. 5, p. 1327-1332, Oct. 2009. DOI:10.1007/s00436-009-1562-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19629526/>. Acesso em: 08 ago. 2022.

CALCHI, A.C. *et al.*, Molecular detection of piroplasmids in mammals from the Superorder Xenarthra in Brazil. **Parasitology Research**, v. 122, n. 12, p. 3169-3180, Dec. 2023. DOI: 10.1007/s00436-023-08008-w. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37848747/>. Acesso em: 22 out. 2024.

CARINI, A.; MACIEL, J. Sur une hémogrégarine et um trypanosome d'un Muridé (*Akodon fuliginosus*). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 8, p. 165-169, 1915.

CHAUVIN, A. *et al.*, *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, Mar-Apr. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19379662/>. Acesso em: 23 ago. 2023.

CHINCHILLA-CARMONA, M. *et al.*, Parásitos intestinales y sanguíneos de 4 especies de roedores y 5 ejemplares de *Philander opossum* (Didelphimorphia: Didelphidae) capturados en la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB) de Costa Rica. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología**, v. 72, n. 2, p. 176-184, 2013. Disponível em: https://www.academia.edu/32160045/CONTINUACIÓN_DE_PARASITOLOGÍA_Y_REVISTA_IBÉRICA_DE_PARASITOLOGÍA. Acesso em: 11 dez. 2021.

COLLE, A.C. *et al.*, Molecular survey of tick-borne pathogens in small mammals from Brazilian Amazonia. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 592-604, Oct-Dec. 2019. DOI: 10.1590/S1984-29612019086. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31800885/>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CRIADO-FORNELIO, A. *et al.*, New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 93-99, Feb, 2006. DOI: 10.1645/GE-464R.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16629322/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

CRIADO-FORNELIO, A. *et al.*, Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 352-356, 25 Dec. 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.09.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17983705/>. Acesso em: 17 jul. 2024.

CRIADO-FORNELIO, A. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**, v. 54, p. 187-193, 7 Jul. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2478/s11686-009-0031-5>. Acesso em: 13 ago. 2021.

DAMANA, H. *et al.*, Rodents as hosts of pathogens and related zoonotic disease risk. **Pathogens**, v. 9, n. 202, Mar. 2020. DOI: 10.3390/pathogens9030202. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32164206/>. Acesso em: 29 abr. 2023.

D'ANDREA, P.S. *et al.*, The Mammal Collection of the Laboratory of Biology and Parasitology of Reservoir Wild Mammals – Oswaldo Cruz Foundation. **Brazilian Journal of Mammalogy**, 90, e90202119, 2021. Disponível em: <https://bjm.emnuvens.com.br/bjm/article/view/19>. Acesso em: 29 out. 2025.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Sobre dois hemocitozoários encontrados em mamíferos silvestres da Região Amazônica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 3, n. 3, p. 107-110, Mai-Jun, 1961. Disponível em: <https://patua.iec.gov.br/items/26a64c1c-5437-45fa-b4da-17416c63afb4>. Acesso em: 18 ago. 2021.

DEMONER, L.C. *et al.*, *Hepatozoon* spp. infections in wild rodents in an area of endemic canine hepatozoonosis in southeastern Brazil. **Tick and Tick-Borne Disease**, v. 7, p. 859-864, 2016. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.04.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27091081/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

DEMONER, L.C. *et al.*, *Hepatozoon milleri* sp. nov. (Adeleorina: Hepatozoidae) in *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from southeastern Brazil. **Parasitology**, v. 146, p. 662-669, Apr. 2019. DOI: 10.1017/S0031182018001956. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30486906/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

EGAN, L.S. *et al.*, Blood parasites in endangered wildlife-Trypanosomes discovered during a survey of Haemoprotozoa from the Tasmanian devil. **Pathogens**, v. 9, n. 873, Oct. 2020. DOI: 10.3390/pathogens9110873. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33114071/>. Acesso em: 14 jul. 2021.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, P.E. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p. 479-491, Jun. 1992. DOI: [10.1093/genetics/131.2.479](https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644282/>. Acesso em: 20 out. 2025.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 1 Mar. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21565059/>. Acesso em: 20 out. 2025.

FERRERI, M.; QU, W.; HAN, B. Phylogenetic networks: A tool to display character conflict and demographic history. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 60, p.12799-12803, 2011. DOI: 10.5897/AJB11.010. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/2FAB78F34985>. Acesso em: 20 jan. 2025.

FREITAS, T.P.T. *et al.*, Morphometric and molecular insights into *Hepatozoon* spp. in wild and synanthropic rodents from Southern and Southeastern Brazil. **Pathogens**, v. 14, n. 8,: 756, 31 Jul. 2025. DOI: 10.3390/pathogens14080756. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40872265/>. Acesso em: 9 ago. 2025.

FUKUMOTO *et al.*, **International Journal of Parasitology**, v. 35, p. 1031-1035, Aug. 2005. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.03.018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979628/>. Acesso em: 28 out. 2025.

GARCIA, M.R. Um piroplasmas del tipo “*Nuttallia equi*”, parasito de “*Didelphis paraguayensis*” em Colombia. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 14, n.89, 1945. Disponível em: <https://revistas.unal.edu.co>. Acesso em: 11 ago. 2021.

GAZETA, G.S. *et al.*, Ocorrência de *Babesia* sp em pequenos roedores no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 741-744, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/GW7HGrZRYgzbNWSydL8H8CS/?lang=pt>. Acesso em: 23 jul. 2021.

GOETHERT, H. *et al.*, Fay and Rausch 1826 Revisited: *Babesia microti* in Alaskan small mammals. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 826-831, Aug. 2006. DOI: 10.1645/GE-584R.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16995402/>. Acesso em: 23 nov. 2023.

GOETHERT, H.K. What *Babesia microti* is now. **Pathogens**, v. 10, n. 9, Sep. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10091168. Acesso em: 28 fev. 2023.

GOMES, L.A. *et al.*, Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu* from eastern Amazon. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, p. 314-318, Feb. 2018. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.11.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29174447/>. Acesso em: 1 jul. 2021.

GONÇALVES, L.G. *et al.*, Molecular detection of piroplasmids in synanthropic rodents marsupials, and associated tick from Brazil, with phylogenetic inference of a putative novel *Babesia* sp. from white-eared opossum (*Didelphis albiventris*). **Parasitology Research**, v.120, p. 3537-3546, Aug. 2021. DOI: 10.1007/s00436-021-07284-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34448058/>. Acesso em: 29 dez. 2021.

GRILLINI *et al.*, Molecular survey of *Cytauxzoon* spp. and *Hepatozoon* spp. in felids using a novel real-time PCR approach. **Frontiers in Veterinary Science**, Jun. 2023, 10:1113681. DOI: 10.3389/fvets.2023.1113681. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37377952/>. Acesso em: 28 out. 2025.

GOU, H. *et al.*, A DNA barcode for Piroplasma. **Acta Tropica**, v. 124, n. 1, Oct. 2012. DOI: 10.1016/j.actatropica.2012.07.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22796448/>. Acesso em: 26 nov. 2024.

GUINDON, S. e GASCUEL, O. PhyML: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, n. 5, p. 696-704, Oct. 2003. DOI: 10.1093/sysbio/syq010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14530136/> Acesso em: 29 out. 2025.

GUINDON, S. *et al.*, New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v.59, n. 3, Mar. 2010. ATGC: www.atgc-montpellier.fr/phyml/

HAMSIKOVÁ, Z. *et al.*, Molecular detection and phylogenetic analysis of *Hepatozoon* sp. in questing *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. **Parasitology Research**, v. 115, p. 3897-3904, Oct. 2016. DOI: 10.1007/s00436-016-5156-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27245074/>. Acesso em: 1 feb. 2025.

HARRIS, D.J. *et al.*, Screening for *Hepatozoon* parasites in gerbils and potential predators in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 8, n. 88, Feb. 2017. DOI: 10.4102/jsava.v88i0.1339. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28235289/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. *Didelphis marsupialis*: Reservoir of *Babesia brasiliensis* in the Valley of Caracas (Venezuela). **Acta Científica Venezolana**, v. 42, p. 45-46, 1991. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/21311542>. Acesso em: 20 jan. 2022.

HRAZDILOVÁ, K. *et al.*, Diversity of *Babesia* spp. in cervid ungulates based on the 18S rDNA cytochrome c oxidase subunit I phylogenies. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 77:104060, Jan. 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104060. Disponível em: 30 jan. 2025.

HRAZDILOVÁ, K. *et al.*, Quest for the type species of the genus *Hepatozoon* – phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. **Systematics and Biodiversity**, v. 19, n. 6, p. 622-631, 26 Apr. 2021. DOI: /10.1080/14772000.2021.1903616. Disponível em: [tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14772000.2021.1903616](https://doi.org/10.1080/14772000.2021.1903616). Acesso em: 29 out. 2021.

HUNFELD, K.P.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J.S. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. **International Journal of Parasitology**, v. 38, n. 11, Sep. 2008. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.03.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18440005/>. Acesso em: 15 out. 2025.

IKEDA, P. *et al.*, First molecular detection of piroplasmids in non-hematophagous bats from Brazil, with evidence of putative novel species. **Parasitology Research**, v. 120, n.1, p. 301–310, Jan. 2021. DOI: 10.1007/s00436-020-06985-w. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33244622/>. Adesso em: 1 jul.. 2021.

JALOVECKA, M. *et al.*, Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n.1: 439, Aug. 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1731-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27502772/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

JALOVECKA, M. *et al.*, The Complexity of Piroplasms Life Cycles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 23, n. 8:248, Jul. 2018. DOI: 10.2289/fcimb.2018.00248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30083518/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

JALOVECKA, M. *et al.*, *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 5, p. 356-368, May. 2019. DOI: 10.1016/j.pt.2019.01.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30733093/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary**

Parasitology, v. 144, n. 1-2, p. 20-27, Mar 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.09.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17127005/>. Acesso em: 22 abr 2022.

JOHNSON, E.M. *et al.*, Field survey of rodents for *Hepatozoon* infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis, **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 27-32, Nov. 2007. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.08.050. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942230/>. Acesso em: 18 dez. 2021.

JOHNSON, E.M. *et al.*, Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 164-169, 4 Nov. 2008. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.10.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18055118/>. Acesso em: 16 jul. 2021.

JOHNSON, E.M. *et al.*, Alternative pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 1315-1318, 2009. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0375.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19709355/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

JOSEPH, J.T. *et al.* Vertical transmission of *Babesia microti*, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 1318-1321, Aug. 2012. DOI: 10.3201/eid1808.110988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22840424/>. Acesso em: 30 nov. 2015.

KAMANI, J. *et al.*, Prevalence of *Hepatozoon* and *Sarcocystis* spp. in rodents and their ectoparasites in Nigeria. **Acta Tropica**, v. 187, p. 124-128, Nov. 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.07.028. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30071191/>. Acesso em: 19 ago. 2021.

KARBOWIAK, G. *et al.*, Natural infections of small mammals with blood parasites on the borderland of boreal and temperate forest zones. **Acta Theriologica**, v. 50, n. 1, p. 31-42, 2005. Disponível em: <https://www.ibs.bialowieza.pl/g2/pdf/1496.pdf>. Acesso em: 2 mai. 2023.

KOTTEK, M. *et al.*, World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. **Metereologische Zeitschrift**, v. 15, n. 3, p. 259-263, 2006. DOI: 10.1127/0941-2948/2006/0130. Disponível em: <https://koeppen-geiger.vu-wien.ac.at>. Acesso em: 29 set. 2024.

KRAWCZAK *et al.*, Phylogenetic inferences based on distinct molecular markers confirm a novel *Babesia* species (*Babesia goianiaensis* nov. sp.) in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and associated ticks. **Microorganisms**, v. 11, n. 8:2022. DOI: 10.3390/microorganisms11082022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37630582>. Acesso em: 7 nov. 2024.

KVICEROVÁ, J.; PAKANDL, M.; HYPŠA, V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. **Parasitology**, v. 135, p. 443-452, Apr. 2008. DOI: 10.1017/S0031182007004106. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18248685>. Acesso em: 31 out. 2022.

LEMOS, E.R.S.; D'ANDREA, P.S. Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança, 1st ed.; **Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil, 2014; 180p.

LJAZ, M. *et al.*, First report of Hepatozoon and Lankesterella spp. Infections in wild rodents from Pakistan, and their potential impact on blood parameters and oxidative stress markers in vital organs. **Veterinary Research Communications**, v. 49, n. 1, Nov. 2024. DOI: 10.1007/s11259-024-10611-w. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39612014>. Acesso em: 20 jun. 2025.

LOPES, C.W.G.*et al.*, *Nuttallia brasiliensis* Regendanz e Kikuth, 1928: Morfologia das formas eritrocitárias em *Philander opossum quica* Temminck (Piroplasmorida: Babesidae). **Arquivo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 3, n. 2, p. 79-82.

LÉVEILLÉ, S.N. *et al.*, The complete mitochondrial genome of *Hepatozoon catesianae* (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina), a blood parasite of the green frog, *Lithobates* (formerly *Rana*) *clamitans*. **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 5, p. 651-656, 2014. DOI: 10.1645/13-449.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/131912276>. Acesso em: 5 set. 2022.

LÉVEILLÉ, A.N.; SKHAWY, N.E.; BARTA, J.R. Multilocus sequencing of *Hepatozoon* cf. *griseisciuri* infections in Ontario Eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) uncovers two genotypically distinct sympatric parasite species. **Parasitology Research**, v. 119, p. 713-724, Feb. 2020. DOI: 10.1007/s00436-019-06583-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31912276/>. Acesso em: 5 set. 2022.

LEVINE, N.D. Progress in taxonomy of the Apicomplexa Protozoa. **Journal of Parasitology**, v. 33, n. 4, p. 518-520, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3143826/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Version 3.81. 2023, Disponível em: <http://www.mesquiteproject.org>. Acesso em: 29 out. 2025.

MAIA, J.P. *et al.*, Molecular assessment of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) infections in wild canids and rodents from North Africa, with implications for transmission dynamics across taxonomic groups. **Journal of Wildlife Disease**, v. 50, p. 837-848, Oct. 2014. DOI: 10.7589/2013-10-280. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25050803/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

MAIA, J.P.; CARRANZA, S.; HARRIS, D.J. Comments on the Systematic Revision of Adeleid Haemogregarines: Are More Data Needed? **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 5, p. 549-552, Oct. 2016. DOI: 10.1645/15-930. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27385057/>. Acesso em: 23 ago. 2023.

MATHEW, J.S. *et al.*, Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina), based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 366-372, Apr. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10780559/>. Acesso em: 8 jun. 2022.

MATJILA, P.T. *et al.*, Detection of a *Theileria* species in dogs in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 157, n. 1-2, p. 34-40, Oct. 2008. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.06.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18687528/>. Acesso em: 30 jun 2025.

MERINO, S. *et al.*, Molecular characterization of an ancient *Hepatozoon* species parasitizing the “living fossil” marsupial “Monito del Monte” *Dromiciops gliroides* from Chile. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, p. 568-576, Nov. 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolinnean/article-abstract/98/3/568/2532226>. Acesso em: 9 ago. 2021.

MILLER, W.W. *Hepatozoon perniciosum* (n. g., n. sp.); a haemogregarine pathogenic for white rats: with a description of the sexual cycle in the intermediate host, a mite (*Lelaps echidninus*). **Hygienic Laboratory**, Washington, Bulletin n. 46, p. 51-123, 1908. Disponível em: <https://ia801204.us.archive.org/3/items/b22419949/b22419949.pdf>. Acesso em: 12 mai. 2024.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop** (GCE), 14 Nov. New Orleans, LA, USA, p. 1 – 8, 2010. Disponível em: <https://www.phylo.org>.

MILLS, J.N. *et al.*, Methods for trapping and sampling small mammals for Virologic testing. Department of Health & Human Services, **Centers for Disease Control and Prevention**: Georgia, U.S.; p. 1-61, 1 Jan. 1995.

MODRÝ, D. *et al.*, A review of methods for detection of *Hepatozoon* infection in carnivores and arthropod vectors. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 66-72, Jan. 2017. DOI: 10.1089/vbz.2016.1963. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28055571/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

MONGRUEL, A.C.B. *et al.*, *Theileria terrestris* nov. sp.: A Novel *Theileria* in Lowland Tapirs (*Tapirus terrestris*) from Two Different Biomes in Brazil. **Microorganisms**, v. 10, n. 12:2319. DOI: 10.3390/microorganisms10122319. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36557572/>. Acesso em: 22 out. 2024.

MORAIS, R.A.P.B. *et al.*, Description of an intramonocytic haemoparasite, *Hepatozoon lainsoni* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae), infecting *Ameiva ameiva* lizard (Reptilia: Squamata: Teiidae) in northern Brazil. **Parasitology**, v. 151, p. 468-477, 2024. DOI: 10.1017/S0031182024000180. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38629122/>. Acesso em: 19 out. 2025.

MURATA, T. *et al.*, Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 5, p. 867-868, Oct. 1993. DOI: 10.1292/jvms.55.867. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8286548/>. Acesso em: 29 abr. 2023.

NEVES, L.C. *et al.*, Detection of an undescribed *Babesia* sp. in capybaras and *Amblyomma* Ticks in Central-Western Brazil. **Animals**, v. 13, n. 94, Dec, 2022. DOI: 10.3390/ani13010094. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36611703/>. Acesso em: 26 jan. 2023.

OLIVEIRA, A.F.X. *et al.*, Expanding the universe of Piroplasmids: morphological detection and phylogenetic positioning of putative novel piroplasmids in black-eared opossums (*Didelphis aurita*) from southeastern Brazil, with description of “South American Marsupialia Group” of Piroplasmida. **Parasitology Research**, v. 122, n. 7, p. 1519-1530, Jul. 2023. DOI: 10.1007/s00436-023-07852-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37195507/>. Acesso em: 21 nov. 2024.

OOSTHEUIZEN, M.C. *et al.*, Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, Jul. 2008. DOI: 10.1128/JCM.00167-08. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18508943>. Acesso em: 30 nov. 2024.

OROZCO, A.M.O. *et al.*, “*Candidatus* Mycoplasma Haemoalbiventris” and tick-borne pathogens in black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Southeastern Brazil. **Microorganisms**, v. 10, n. 10: 1955, Sep. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10101955. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36296231/>. Acesso em: 8 abr. 2023.

OTRANTO, D. *et al.*, Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. **Parasites & Vectors**, v. 4, Apr. 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-55. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21489247/>. Acesso em: 28 out. 2025.

PACHECO *et al.*, Molecular survey of *Hepatozoon* spp. and piroplasmids in rodents and marsupials from midwestern Brazil, with evidence of a novel Piroplasmida clade (“South American Rodentia”) in the echimyid rodent *Thrichomys pachyurus*. **Parasitology Research**, v. 124, n. 19, Feb. 2025. DOI: 10.1007/s00436-025-08460-w. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/839903325/>. Acesso em: 13 fev. 2025.

PARDIÑAS, U.F.J. *et al.*, **Mammals of South America**. 1 ed., V. 2, The University of Chicago Press: Chicago, U.S., p. 144-203, 2015.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. Update world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 1633-1644, 2007. DOI: 10.5194/hess-11-1633-2007. Disponível em: hess.copernicus.org/articles/11/1633/2007/. Acesso em: 25 jul 2025.

PERLES, L. *et al.*, Genetic diversity of *Hepatozoon* spp. in rodents from Brazil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1: 10122, 12 Jul. 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-46662-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31300712/>. Acesso em: 19 jun. 2021.

PERKINS, F.O. *et al.*, 2000. Phylum Apicomplexa Levine, 1970. In Lee, J.J., Leedale, G.F. & Bradbury, P., **An Illustrated Guide to the Protozoa**, Second Edition, vol. 1. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, U.S.A.: 190-200. Disponível em: <https://protistologists.org/publications/illustrated-guide-to-the-protozoa/>. Acesso em: 29 out. 2025.

QUILFELDT, P. *et al.*, Molecular survey of coccidian infections of the side-blotched lizard *Uta stansburiana* on San Benito Oeste Island, Mexico. **Parasite**, v. 25, n. 43, Aug. 2018. DOI: 10.1051/parasite/2018043. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3010981/>. Acesso em: 31 out. 2022.

RAMBAUT, A. *et al.*, Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, p. 901-904, Sep. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29718447/>. Acesso em: 30 jan. 2022.

REGENDANZ, P.; KIKUTH, W. Sur un parasite du sang des quica (*Metachirus quica*) *Nuttallia brasiliensis* n. sp. et influence de la rate les infections latentes du sang. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v. 98, p. 1567-1569, 1928. Disponível em: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/cb34349272v/date1928>. Acesso em: 25 jul. 2025.

RONQUIST, F. *et al.*, MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, May, 2012. DOI: 10.1093/sysbio/sys029. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22357727/>. Acesso em: 29 out. 2024.

ROZAS, J. *et al.*, DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017. DOI: 10.1093/molbev/msx248.

SAITO-ITO, A. *et al.*, Survey of rodents and ticks in human babesiosis emergence area in Japan: First detection of *Babesia microti*-like parasites in *Ixodes ovatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5: 2268-70. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2268-2270.2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15131209/>. Acesso em: 6 jul. 2021.

SAMPAIO, M.X. e MASSARD, C.L. *Nuttallia brasiliensis* e *Theileria brasiliensis*, sinónimas de *Babesia brasiliensis* (Piroplasmida: Babesiidae) hemoparasito de marsupiais Didelphidae. **Parasitología Latinoamericana**, v. 58, n.1-2, p. 89-91, 2004. Disponível em: https://scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-77122003000100018&script=sci_abstract&tlng=e. Acesso em: 5 nov. 2025.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, Dec. 1997. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/pdf/10.1073/pnas.74.12.5463>. Acesso em: 29 out. 2025.

SANTODOMINGO, A.M. *et al.*, Apicomplexans in small mammals from Chile, with the first report of the *Babesia microti* group in South American rodents. **Parasitology Research**, v. 121, 1009-1020, Mar. 2022. DOI: 10.1007/s00436-022-07452-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35102466/>. Acesso em: 5 mai. 2022.

SANTOS, F.M. *et al.*, Relationships between vector-borne parasites and free-living mammals at the Brazilian Pantanal. **Parasitology Research**, v. 120, n. 3, p. 1003-1010, Jan. 2021. DOI: 10.1007/s00436-020-07028-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33420620/>. Acesso em: 1 jul. 2021.

SANTOS, F.O. *et al.*, *Necromys lasiurus* (Cricetidae: Sigmodontinae) from open areas of the Atlantic Forest of Rio de Janeiro: Population structure and implications for the monitoring of hantavíruses. **Zoologia-Curitiba**, v. 41, e23086, 2024. DOI: 10.1590/S1984-4689. Disponível em: <https://scielo.br/j/zool/a/JjFxrHCnZJ3xybcjRPtwL8z/?format=html&lang=en>. Acesso em: 7 jan. 2025.

SCHÄFER, I. *et al.*, First evidence of vertical *Hepatozoon canis* transmission in dogs in Europe. **Parasite & Vectors**, v. 23, n. 15, 296, Aug. 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05392-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35999592/>. Acesso em: 7 mai. 2025.

SCHREEG, M.E. *et al.*, Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. **PloS One**, v. 11, n. 11, Nov. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0165702. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27832128/>. Acesso em: 6 jul. 2021.

SCHNITTGER, L. *et al.*, *Babesia*: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788-17809, Dec, 2012. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.07.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871652/>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SCHNITTGER, L. *et al.*, The Piroplasmida *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. **Parasitology Research**, v. 121, n. 5, p. 1207-1245, May. 2022. DOI: 10.1007/s00436-022-07424-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35098377/>. Acesso em: 7 jul. 2025.

SEBASTIAN, P.S. *et al.*, *Babesia* sp. of the “South American Marsupialia Group”: First molecular detection in *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) from Argentina. **Veterinary Parasitology, Regional studies and Reports**. Feb, 2025: 58:101205. DOI: 10.1016/j.vprsr.2025.101205. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40049994/>. Acesso em: 11 mar 2025.

SERRA-FREIRE, N.M. *Babesia ernestoi* sp. n., in *Didelphis marsupialis* L., 1758, and *D. albiventris* Lund, 1841, in Brazil. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 26, n. 8, p. 614-622, Oct. 1979. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1979.tb00855.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/525096/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

SHAW, M.K. Cell invasion by *Theileria* sporozoites. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, Jan. 2003. DOI: 10.1016/s1471-4922(02)00015-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12488213/>. Acesso em: 26 set. 2025.

SHOCK, B.C. *et al.*, Variation in the ITS-1 and ITS-2 rRNA genomic regions of *Cytauxzoon felis* from bobcats and pumas in the eastern United States and comparison with sequences from domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1-2, Nov. 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.06.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22776107/>. Acesso em: 30 jan. 2025.

SILVA, M.R.L. *et al.*, *Didelphis albiventris* naturally infected with *Hepatozoon canis* in southeastern Brazil. **Ticks and Tick Borne Disease**, v. 8, n. 6, p. 878-881, Oct. 2017. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.07.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28728938/>. Acesso em: 21 jun. 2021.

SILVA, O.D.; ARANTES, J.B. Sobre uma gregarina de gambá. *Haemogregarina didelphydis* n. sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, n. 2, p. 61-63, 1916. Disponível em: <https://memorias.ioc.fiocruz.br/article/6821/sobre-uma-hemogregarina-da-gamba-haemogregarina-didelphydis-n-sp/>. Acesso em: 18 jul. 2024.

SLOBODA, M. *et al.*, A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector.

Journal of Parasitology, v. 93, n. 5, p. 1189-1198, Oct. 2007. DOI: 10.1645/GE-1200R.1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18163356/>. Acesso em: 23 ago. 2022.

SLOBODA, M. *et al.*, Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python *Python regius*. **Folia Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 13-16, Mar. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18578163/>. Acesso em: 25 jun. 2021.

SMITH, T.G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 565-585, Aug. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8691364/>. Acesso em: 23 jul. 2021.

SMITH, M.F.; PATTON, J.L. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: Evidence from Cytochrome b. **Journal of Mammalian Evolution**, v. 6, p. 89-128, June 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020668004578/>. Acesso em: 25 jun. 2024.

SMITH, M.F.; PATTON, J.L. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the akodontine tribe. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 50, I. 3, p. 149-177, Nov. 1993. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024406683710527>. Acesso em: 25 jun. 2024.

STEGEMAN, J.R. *et al.*, Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 959-963. Apr. 2003. DOI: 10.2460/javma.2003.222.959. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12685786/>. Acesso em: 29 jul. 2025.

SOARES, J.F. *et al.*, Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3-4, p. 203-208. Aug. 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.03.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21489694/>. Acesso em: 28 out. 2022.

SOARES, H.S. *et al.*, Novel piroplasmid and *Hepatozoon* organisms infecting the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife**, v. 26, n. 6, p. 115-121, May. 2017. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2017.05.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28603688/>. Acesso em: 13 ago. 2021.

SOLDATI, D.; FOTH, B.J.; COWMAN, A.F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 12, p. 567-574, Dec. 2004. DOI: 10.1016/j.pt.2004.09.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15522666/>. Acesso em: 19 set. 2025.

SOUSA, K.C.M. *et al.*, Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary Parasitology**, v. 237, p. 37-46, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.02.023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28291601/>. Acesso em: 19 ago. 2021.

SOUSA, K.C.M. *et al.*, Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Tick and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-

253, Feb. 2018. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.09.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28941935/>. Acesso em: 1 jul. 2021.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, p. 3022-3027, 2021. DOI: 10.1093/molbev/msab120. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33892491/>. Acesso em: 29 jul. 2025.

THOMAS, R. *et al.*, A novel *Babesia* sp. of the “Western *Babesia* group”, detected in opossums from Guatemala. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.14, n. 6:102248, 2023. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2023.102248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37660526/>. Acesso em: 18 mai 2024.

THOMAS, R. *et al.*, *Hepatozoon* (Eucoccidiorida: Hepatozoidae) in wild mammals of the Americas: a systematic review. **Parasite & Vector**, v. 17, p.1-23, Mar, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38444020/>. Acesso em 14 jun. 2024.

TSUJI, M. *et al.*, *Babesia microti*-like parasites detected in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris orientis*) in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical**, v. 68, n. 7, p. 643-646, Jul, 2006. DOI: 10.1292/jvms.68.643. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16891774/>. Acesso em: 29 out. 2024.

TOLKACZ *et al.*, Prevalence, genetic identity and vertical transmission of *Babesia microti* in three naturally infected species of vole, *Microtus* spp. (Cricetidae). **Parasite & Vectors**, v. 6, n. 10, 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2007-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28166832/>. Acesso em 29 out. 2025.

TOLKACZ, K. *et al.*, Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* and *Hepatozoon* sp. in voles (*Microtus* spp.): occurrence and evidence for vertical transmission. **Scientific Reports-UK**, v. 13, 1733, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-28346-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36720952/>. Acesso em 15 mar. 2023.

UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n.1-2, May. 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.035. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16513280/>. Acesso em 15 jul. 2021.

UJVARI, B.; MADSEN, T.; OLSSON, M. High prevalence *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 670-672, June 2004. doi: 10.1645/GE-204R. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15270125/>. Acesso em 27 ago. 2021.

UNGARI, L.P. *et al.*, Diversity of haemogregarine parasites infecting Brazilian snakes from the Midwest and Southeast regions with a description of two new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae). **Parasitology International**, v. 89, 102587, 2022. DOI: 10.1016/j.parint.2022.102587. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35452797/>. Acesso em 11 dez. 2023.

WAKED, R.; KRAUSE, P.J. Human babesiosis. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 655-670, Sep. 2022. DOI: 10.1016/j.idc.2022.02.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36116841/>. Acesso em: 30 set. 2025.

WECK, B.C. *et al.*, Novel genotypes of *Hepatozoon* spp. in small mammals, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 15, 87, 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05216-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35292086/>. Acesso em 5 mai. 2022.

WENYON, C.M. **Protozoology: A manual for medical men, veterinarians and zoologists**. Baillière, Tindall and Cox Limited, London, U.K., v. 2, 1926.

WICK, R.M. *et al.*, Morphological and molecular characteristics of a species of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) from the blood of *Isoodon obesulus* (Marsupialia: Paramelidae) in Western Australia. **Systematic Parasitology**, v. 65, n. 1, p. 19-25, Sep. 2006. DOI: 10.1007/s11230-006-9036-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16758303/>. Acesso em 2 set. 2020.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, USA, v. 4, 1978.

WOLF, R.W. *et al.*, Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Tick and Tick-Borne Diseases**, v. 7, p. 449-456, Apr. 2016. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.01.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26782931/>. Acesso em 21 jun. 2021.

WOOLHOUSE, M.E.; GOWTAGE-SEQUERIA, S.. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1842-1847, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16485468/>. Acesso em 30 mai. 2025.

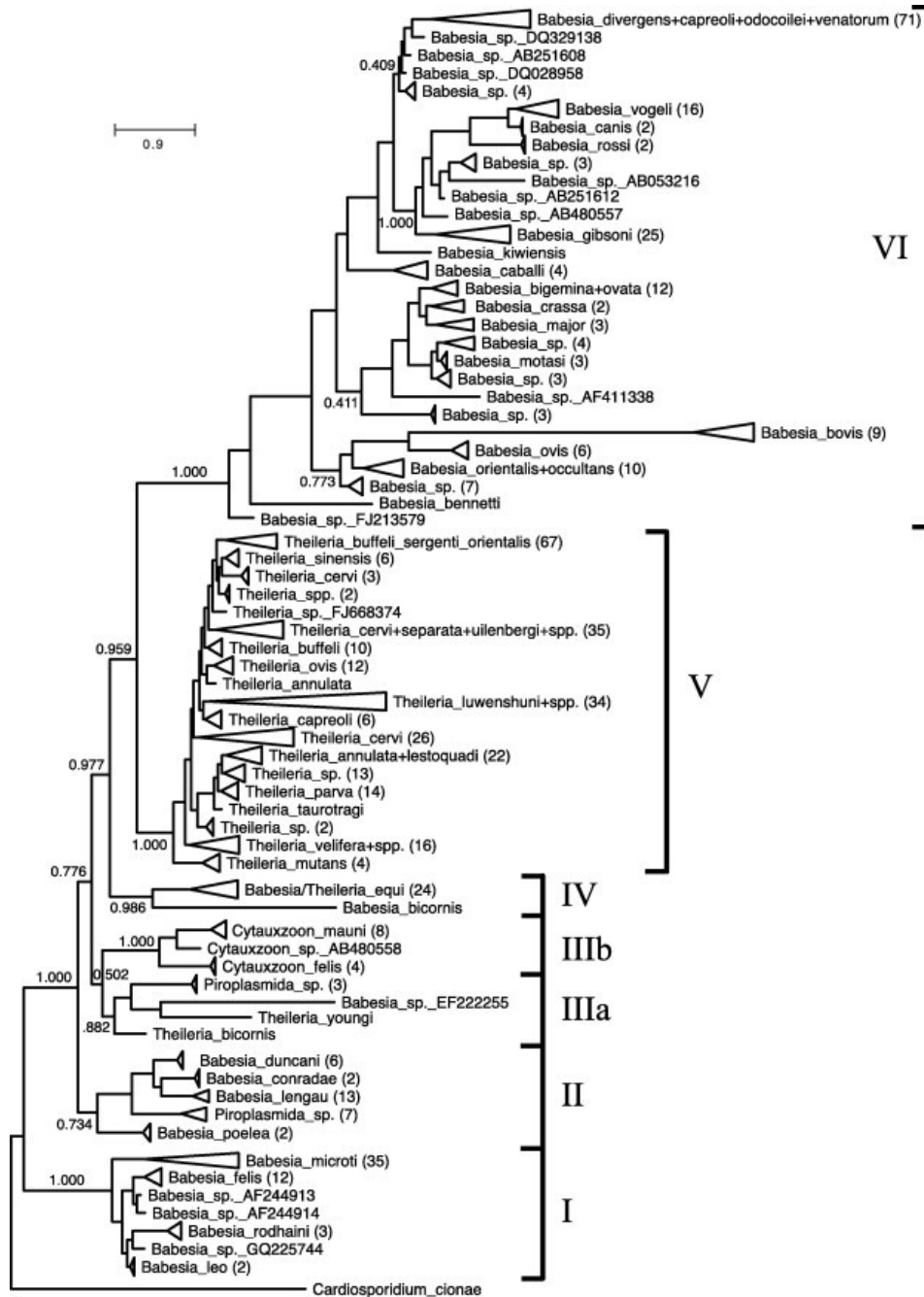
XUE, J. *et al.*, Great genetic diversity of vector-borne bacteria and protozoan in wild rodents from Guangxi, China. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 18, n.5: e0012159. DOI: 10.1371/journal.pntd.0012159. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38739673/>. Acesso em: 18 ago. 2024.

YABSLEY, M.J.; SHOCK, B.C. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.2, p. 18-31. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2012.11.003. eCollection 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24533312/>. Acesso em: 5 ago 2025.

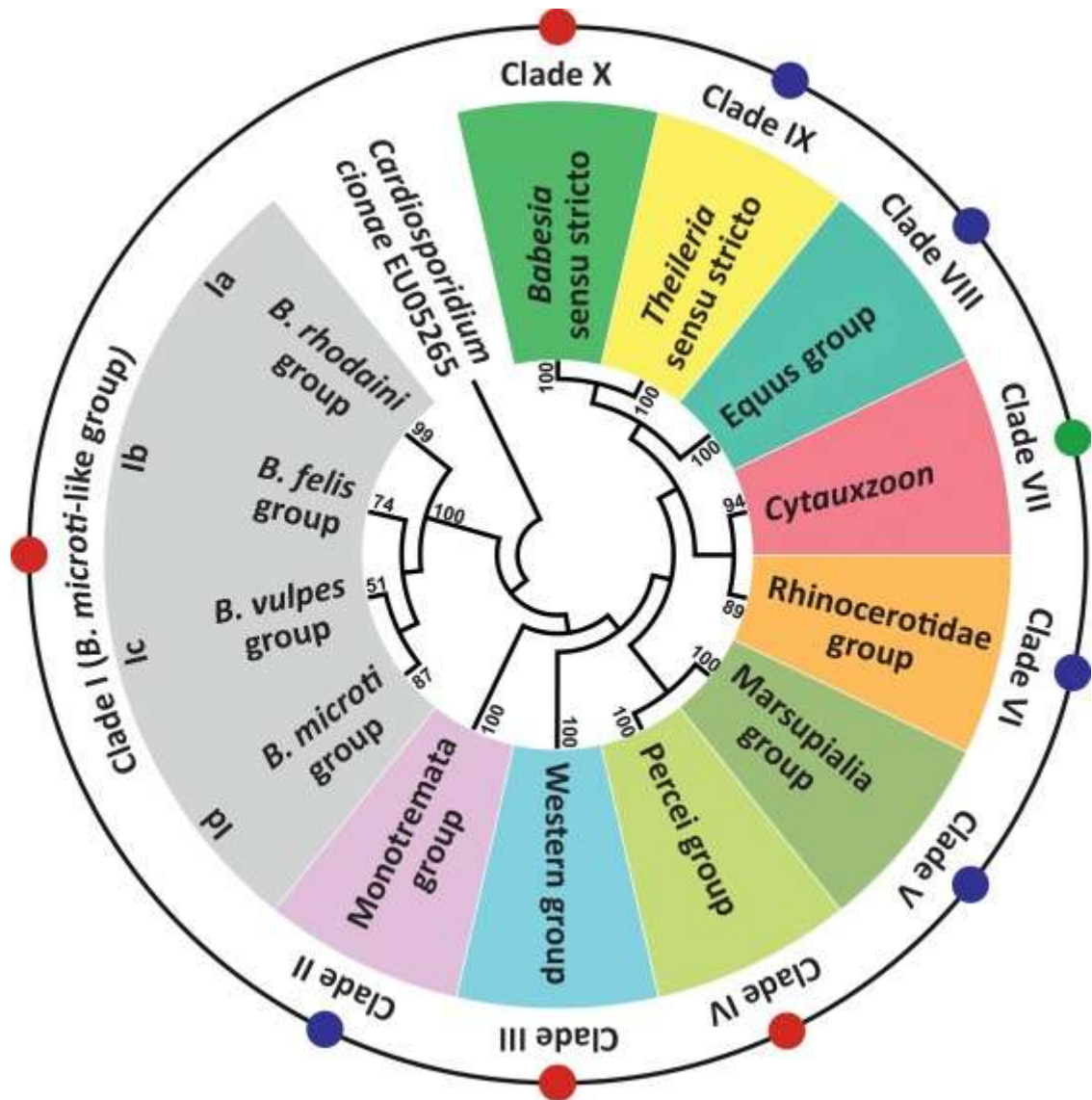
YOUNG, C. *et al.*, Preventing transfusion-transmitted babesiosis: preliminary experience of the first laboratory-based blood donor screening program. **Transfusion**, v. 52, p. 1523-1529, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22452654/>. Acesso em 29 out. 2025.

9 ANEXOS

ANEXO I - Figura do artigo de Schnittger *et al.*, 2012 com reconstrução de uma árvore consenso do gene *18S rRNA* de sequências de piroplasmidas divididos em seis clados.



ANEXO II - Figura do artigo de Jalovecka *et al.*, 2019, demonstrando a filogenia molecular de piroplasmas baseada em sequências do gene *18S rRNA*, divididos em 10 clados.



Trends in Parasitology

ANEXO III – Protocolo de extração de DNA do kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue.

Quick-Start Protocol

April 2016

DNeasy[®] Blood & Tissue Kit

The DNeasy Blood & Tissue Kit (cat. nos. 69504 and 69506) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year if not otherwise stated on label.

Further information

- *DNeasy Blood & Tissue Handbook*: www.qiagen.com/HB-2061
- Safety Data Sheets: www.qiagen.com/safety
- Technical assistance: support.qiagen.com

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
 - Redissolve any precipitates in Buffer AL and Buffer ATL.
 - Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
 - Equilibrate frozen tissue or cell pellets to room temperature.
 - Preheat an incubator to 56°C.
 - Refer to the handbook for pretreatment of fixed tissue, insect, bacterial or other material.
- 1a. **Tissue:** Cut tissue (≤ 10 mg spleen or ≤ 25 mg other tissue) into small pieces, and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube. For rodent tails, use 1 (rat) or 2 (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail. Add 180 μ l Buffer ATL. Add 20 μ l proteinase K, mix by vortexing and incubate at 56°C until completely lysed. Vortex occasionally during incubation. Vortex 15 s directly before proceeding to step 2.
- 1b. **Nonnucleated blood:** Pipet 20 μ l proteinase K into a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube. Add 50–100 μ l anticoagulant-treated blood. Adjust volume to 220 μ l with PBS. Proceed to step 2.

- 1c. **Nucleated blood:** Pipet 20 μ l proteinase K into a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube. Add 5–10 μ l anticoagulant-treated blood. Adjust volume to 220 μ l with PBS. Proceed to step 2.
- 1d. **Cultured cells:** Centrifuge a maximum of 5×10^6 cells for 5 min at $300 \times g$ (190 rpm). Resuspend in 200 μ l PBS. Add 20 μ l proteinase K. Proceed to step 2.
2. Add 200 μ l Buffer AL. Mix thoroughly by vortexing. Incubate blood samples at 56°C for 10 min.
3. Add 200 μ l ethanol (96–100%). Mix thoroughly by vortexing.
4. Pipet the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard the flow-through and collection tube.
5. Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW1. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$. Discard the flow-through and collection tube.
6. Place the spin column in a new 2 ml collection tube, add 500 μ l Buffer AW2 and centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm). Discard the flow-through and collection tube.
7. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
8. Elute the DNA by adding 200 μ l Buffer AE to the center of the spin column membrane. Incubate for 1 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$.
9. **Optional:** Repeat step 8 for increased DNA yield.



Scan QR code for handbook.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy® (QIAGEN Group). 1102226 04/2016 HB-0540-002 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com

ANEXO IV - Lista das sequências de 18S *rDNA* utilizadas na análise filogenética de *Hepatozoon* spp.. A primeira coluna demonstra os códigos de acesso do GenBank, seguidas da identificação do parasita, espécie de hospedeiro intermediário e país de origem.

Acesso				
GenBank	Parasito	Espécie hospedeira	Ordem	País
AB181504	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Bandicota indica</i>	Rodentia	Tailândia
AY461375	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Dusicyon thous</i>	Carnivora	Brasil
AY461378	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	Carnivora	Espanha
AY471615	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Pseudalopex gymnocercus</i>	Carnivora	Brasil
AY600625	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Myodes glareolus</i>	Rodentia	Espanha
DQ439540	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	Carnivora	Venezuela
EF157822	<i>Hepatozoon ayorgbor</i>	<i>Lamprophis fuliginosus</i>	Squamata	Gana
EF222257	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Martes martes</i>	Carnivora	Espanha
EF222259	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Sciurus vulgaris</i>	Rodentia	Espanha
EU041718	<i>Hepatozoon</i>	<i>Ursus thibetanus japonicus</i>	Carnivora	Japão
FJ719813	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Dromiciops gliroides</i>	Marsupialia	Chile
FJ719814	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Dromiciops gliroides</i>	Marsupialia	Chile
FJ719815	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Abrothrix olivaceus</i>	Rodentia	Chile
FJ719816	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Abrothrix sanborni</i>	Rodentia	Chile
FJ719817	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Abrothrix olivaceus</i>	Rodentia	Chile
FJ719818	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Abrothrix olivaceus</i>	Rodentia	Chile
HQ224954	<i>Hepatozoon catesbiana</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	Anura	Canadá
HQ224957	<i>Dactylosoma ranarum</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Anura	França
HQ224963	<i>Hepatozoon clamatae</i>	<i>Rana clamitans</i>	Anura	Canadá
HQ829437	<i>Hepatozoon ursi</i>	<i>Melursus ursinus</i>	Carnivora	Índia
HQ829440	<i>Hepatozoon felis</i>	<i>Panthera leo persica</i>	Carnivora	Índia
HQ829444	<i>Hepatozoon felis</i>	<i>Panthera pardus fusca</i>	Carnivora	Índia
JN181157	<i>Hepatozoon sipedon</i>	<i>Nerodia sipedon sipedon</i>	Squamata	Canadá
JX644996	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Myodes glareolus</i>	Rodentia	Hungria
JX644998	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Myodes glareolus</i>	Rodentia	Hungria
KC138535	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	Carnivora	Espanha
KF257926	<i>Haemogregarina stepanowi</i>	<i>Mauremys caspica</i>	Testudines	Irã
KF939620	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Elaphe carinata</i>	Squamata	China
KJ413132	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Caiman crocodilus yacare</i>	Crocodylia	Brasil
KM887507	<i>Haemogregarina sacaliae</i>	<i>Sacalia quadriocellata</i>	Testudines	Vietnã
KM887509	<i>Haemogregarina pellegrini</i>	<i>Sacalia quadriocellata</i>	Testudines	Vietnã
KU667308	<i>Hepatozoon milleri</i>	<i>Akodon montensis</i>	Rodentia	Brasil
KU667309	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Rodentia	Brasil
KX011039	<i>Karyolysus paradoxa</i>	<i>Varanus albigularis</i>	Squamata	África do Sul
KX011040	<i>Karyolysus paradoxa</i>	<i>Varanus albigularis</i>	Squamata	África do Sul Bosnia e
KX757032	<i>Hepatozoon silvestris</i>	<i>Felis silvestris silvestris</i>	Carnivora	Herzegovina
KX776335	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Thrichomys fosteri</i>	Rodentia	Brasil
KX776337	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Thrichomys fosteri</i>	Rodentia	Brasil
KX776353	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Oecomys mamorae</i>	Rodentia	Brasil

ANEXO IV (continuação) - Lista das sequências de *18S rDNA* utilizadas na análise filogenética de *Hepatozoon* spp.. A primeira coluna demonstra os códigos de acesso do GenBank, seguidas da identificação do parasito, espécie de hospedeiro intermediário e país de origem.

Acesso	Parasito	Espécie hospedeira	Ordem	País
KX776354	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Thylamys macrurus</i>	Marsupialia	Brasil
KX776359	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Nasua nasua</i>	Carnivora	Brasil
KX816958	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Carnivora	Brasil
KY392884	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Didelphis albiventris</i>	Marsupialia	Brasil
MG041594	<i>Hepatozoon involucrum</i>	<i>Hyperolius marmoratus</i>	Anura	África do Sul
MG041602	<i>Hepatozoon thori</i>	<i>Hyperolius marmoratus</i>	Anura	África do Sul
MG041604	<i>Hepatozoon ixoxo</i>	<i>Sclerophrys pusilla</i>	Anura	África do Sul
MG136687	<i>Hepatozoon martis</i>	<i>Martes martes</i>	Carnivora	Bosnia e Herzegovina
MG519502	<i>Hepatozoon angeladaviesae</i>	<i>Philothamnus natalensis</i>	Squamata	África do Sul
MG519504	<i>Hepatozoon cecilhoarei</i>	<i>Philothamnus natalensis</i>	Squamata	África do Sul
MH111407	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Galea spixii</i>	Rodentia	Brazil
MH111410	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon</i> sp.	Rodentia	Brazil
MH111417	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon montensis</i>	Rodentia	Brasil
MH111419	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Necomys lasiurus</i>	Rodentia	Brasil
MH111420	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Calomys callidus</i>	Rodentia	Brasil
MK452253	<i>Hepatozoon griseisciuri</i>	<i>Sciurus carolinensis</i>	Rodentia	Canadá
MK454898	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Rattus norvegicus</i>	Rodentia	Chile
MN104639	<i>Hepatozoon sciuri</i>	<i>Sciurus vulgaris</i>	Rodentia	República Tcheca
MN244528	<i>Hepatozoon catesbiana</i>	<i>Rana clamitans</i>	Anura	Canadá
MN244529	<i>Hepatozoon clamatae</i>	<i>Rana clamitans</i>	Anura	Canadá
MN723844	<i>Hepatozoon colubri</i>	<i>Zamenis longissimus</i>	Squamata	Iran
MN723845	<i>Hepatozoon ophisauri</i>	<i>Pseudopus apodus</i>	Squamata	Iran
MT919387	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Rattus exulans</i>	Rodentia	Polinésia Francesa
MT919388	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Rattus rattus</i>	Rodentia	Polinésia Francesa
MZ412878	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Pseudocerastes fieldi</i>	Squamata	Irã
MW342705	<i>Hepatozoon cf. ayorgbor</i>	<i>Rhombomys opimus</i>	Rodentia	China
OM033660	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon</i> sp.	Rodentia	Brasil
OM033661	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Euryoryzomys russatus</i>	Rodentia	Brasil
OM033662	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Euryoryzomys russatus</i>	Rodentia	Brasil
OM033663	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Akodon</i> sp.	Rodentia	Brasil
OM033664	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Monodelphis domestica</i>	Marsupialia	Brasil
OM033665	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Oecomys mamorae</i>	Rodentia	Brasil
ON237359	<i>Hepatozoon cepavii</i>	<i>Xenodon matogrossensis</i>	Squamata	Brasil
ON237463	<i>Hepatozoon quagliattus</i>	<i>Chironius flavolineatus</i>	Squamata	Brasil

ANEXO V - Lista de haplótipos de *Hepatozoon* spp. usados na rede de haplótipos (Figura 12), relacionando o respectivo haplótipo ao acesso GenBank, ao hospedeiro intermediário e ao país de origem.

Haplótipo	Acesso GenBank	Hospedeiro	País
Hap 1	PQ807534	<i>Oxymycterus quaestor</i>	Brasil
Hap 1	MH111420	<i>Calomys callidus</i>	Brasil
Hap 2	PQ807561	<i>Mus musculus</i>	Brasil
Hap 2	PQ807565	<i>Oxymycterus nasutus</i>	Brasil
Hap 3	PQ807526	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807527	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807528	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807529	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807530	<i>Akodon cursor</i>	Brasil
Hap 3	PQ807531	<i>Akodon cursor</i>	Brasil
Hap 3	PQ807532	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807533	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807535	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807536	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807537	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807538	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807560	<i>Mus musculus</i>	Brasil
Hap 3	PQ807562	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807563	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807564	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	PQ807566	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	KU667308	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	MH111407	<i>Galea spixii</i>	Brasil
Hap 3	MH111410	<i>Akodon</i> sp.	Brasil
Hap 3	MH111417	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 3	OM033660	<i>Akodon</i> sp.	Brasil
Hap 3	OM033661	<i>Euryoryzomys russatus</i>	Brasil
Hap 3	OM033662	<i>Euryoryzomys russatus</i>	Brasil
Hap 3	OM033663	<i>Akodon</i> sp.	Brasil
Hap 4	PQ807539	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807540	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807541	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807542	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807543	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807544	<i>Sooretamys angouya</i>	Brasil
Hap 4	PQ807545	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807546	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasil
Hap 4	PQ807547	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807548	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807549	<i>Sooretamys angouya</i>	Brasil
Hap 4	PQ807550	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807551	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807552	<i>Akodon montensis</i>	Brasil

ANEXO V (continuação) - Lista de haplótipos de *Hepatozoon* spp. usados na rede de haplótipos (Figura 5), relacionando o respectivo haplótipo ao acesso GenBank, ao hospedeiro intermediário e ao país de origem.

Haplótipo	Acesso GenBank	Hospedeiro	País
Hap 4	PQ807554	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasil
Hap 4	PQ807555	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807556	<i>Sooretamys angouya</i>	Brasil
Hap 4	PQ807557	<i>Sooretamys angouya</i>	Brasil
Hap 4	PQ807558	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 4	PQ807559	<i>Akodon montensis</i>	Brasil
Hap 5	MH111419	<i>Necromys lasiurus</i>	Brasil
Hap 6	OM033665	<i>Oecomys mamorae</i>	Brasil
Hap 6	KX777653	<i>Oecomys mamorae</i>	Brasil
Hap 7	KU667309	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Brasil
Hap 8	KX776335	<i>Thrichomys fosteri</i>	Brasil
Hap 8	KX776337	<i>Thrichomys fosteri</i>	Brasil
Hap 9	FJ719817	<i>Abrothrix olivaceus</i>	Chile
Hap 9	FJ719818	<i>Abrothrix olivaceus</i>	Chile
Hap 10	FJ719815	<i>Abrothrix olivaceus</i>	Chile
Hap 10	FJ719816	<i>Abrothrix sanborni</i>	Chile
Hap 11	MK454898	<i>Rattus norvegicus</i>	Chile

ANEXO VI – Lista das sequências de *18S rDNA*, *cox1*, *cox3* e *cytb* utilizadas na análise filogenética de *Babesia* spp.. A primeira coluna demonstra os códigos de acesso do GenBank, seguidos do gene(s), identificação do parasita, espécie de hospedeiro intermediário e país de origem.

GenBank ID	Gene	Espécie	Hosp intermediário	País
AB499085	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Bos taurus</i>	Japão
AB499086	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Babesia caballi</i>	<i>Equus caballus</i>	Japão
AB499087	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Japão
AB499088	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Bos taurus</i>	Japão
AB499089	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Theileria parva</i>	<i>Bos taurus</i>	Japão
AB499090	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Theileria orientalis</i>	<i>Bos taurus</i>	Japão
AB053216	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Bandicota indica</i>	Japão
AB624353	<i>cox1, cytb</i>	<i>Babesia microti</i>	<i>M. musculus</i> (lab)	Japão
AB624356	<i>cox3</i>	<i>Babesia microti</i>	<i>M. musculus</i> (lab)	Japão
AB624357	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Babesia rodhaini</i>	<i>M. musculus</i> (lab)	Japão
AB624358	<i>cox3</i>	<i>Babesia rodhaini</i>	<i>M. musculus</i> (lab)	Japão
AF078815	<i>18S</i>	<i>Theileria mutans</i>	<i>Bos taurus</i>	África do Sul
AF158702	<i>18S</i>	<i>Babesia conradae</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	EUA
AF244911	<i>18S</i>	<i>Babesia leo</i>	<i>Panthera leo</i>	África do Sul
AF244912	<i>18S</i>	<i>Babesia felis</i>	<i>Panthera leo</i>	África do Sul
AF244913	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Caracal caracal</i>	África do Sul
AF499604	<i>18S</i>	<i>Theileria bicornis</i>	<i>Diceros bicornis</i>	África do Sul
AJ439713	<i>18S</i>	<i>Babesia divergens</i>	<i>Homo sapiens</i>	Portugal
AY072925	<i>18S</i>	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	França
AY072926	<i>18S</i>	<i>Babesia canis</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Polônia
AY150058	<i>18S</i>	<i>Babesia ovis</i>	<i>Ovis aries</i>	Espanha
AY150062	<i>18S</i>	<i>Theileria equi</i>	<i>Equus caballus</i>	Espanha
AY260172	<i>18S</i>	<i>Theileria ovis</i>	<i>Ovis aries</i>	Alemanha
AY371196	<i>18S</i>	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Brasil
AY452707	<i>18S</i>	<i>Babesia felis</i>	<i>Felis catus</i>	África do Sul
AY452708	<i>18S</i>	<i>Babesia leo</i>	<i>Felis catus</i>	África do Sul
AY485690	<i>18S</i>	<i>Cytauxzoon manul</i>	<i>Otocolobus manul</i>	USA
AY485691	<i>18S</i>	<i>Cytauxzoon manul</i>	<i>Otocolobus manul</i>	USA
AY533147	<i>18S</i>	<i>Babesia motasi</i>	<i>Ovis aries</i>	Espanha
AY485690	<i>18S</i>	<i>Cytauxzoon manul</i>	<i>Otocolobus manul</i>	Mongólia
AY534602	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Canis lupus familiaris</i>	Espanha
AY679105	<i>18S</i>	<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Felis catus</i>	USA
BBORRNA	<i>18S</i>	<i>Babesia rodhaini</i>	não informado	-
DQ200887	<i>18S</i>	<i>Babesia poeala</i>	<i>Sula leucogaster</i>	Atol Johnston
DQ329138	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Puma concolor coryi</i>	USA
EF222255	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Hydrochoeris hydrochaeris</i>	Brasil
EU083802	<i>18S</i>	<i>Theileria sergenti</i>	<i>Bos taurus</i>	China
EU642511	<i>18S</i>	<i>Theileria equi</i>	<i>Equus caballus</i>	África do Sul
FJ944826	<i>18S</i>	<i>Theileria divergens</i>	<i>Bos taurus</i>	France
GQ411405	<i>18S</i>	<i>Babesia lengau</i>	<i>Acinonyx jubatus</i>	África do Sul
GU903911	<i>18S</i>	<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Felis catus</i>	Brasil
HM538266	<i>18S</i>	<i>Theileria orientalis</i>	<i>Bos taurus</i>	China

ANEXO VI (continuação) – Lista das sequências de *18S rDNA*, *cox1*, *cox3* e *cytb* utilizadas na análise filogenética de *Babesia* spp.. A primeira coluna demonstra os códigos de acesso do GenBank, seguidos do gene(s), identificação do parasita, espécie de hospedeiro intermediário e país de origem.

GenBank ID	Gene	Espécie	Hosp intermediário	País
HQ179765	<i>18S</i>	<i>Theileria</i> sp.	<i>Damaliscus lunatus</i>	África do Sul
HQ184406	<i>18S</i>	<i>Theileria cervi</i>	<i>Cervus nippon</i>	China
HQ289870	<i>18S</i>	<i>Babesia duncani</i>	<i>Homo sapiens</i>	USA
HQ840960	<i>18S</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Bubalis bubalis</i>	China
HQ895985	<i>18S</i>	<i>Theileria parva</i>	<i>Syncerus caffer</i>	África do Sul
JN982342	<i>18S</i>	<i>Babesia rossi</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nigeria
JX495403	<i>18S</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Bos taurus</i>	China
JX962781	<i>18S</i>	<i>Babesia microti</i>	<i>Rattus losea</i>	China
KC461261	<i>18S</i>	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Índia
KC790443	<i>18S</i>	<i>Babesia leugau</i>	<i>Felis catus</i>	África do Sul
KC207821	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Felis catus</i>	USA
KC207822	<i>cox1, cox3</i>	<i>Babesia canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	USA
KC207824	<i>cox1, cytb</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Canis familiaris</i>	USA
KC207825	<i>cox1, cox3, cytb</i>	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Canis familiaris</i>	USA
KC207826	<i>cox1, cytb</i>	<i>Babesia conradae</i>	<i>Canis familiaris</i>	USA
KC207827	<i>cox1, cox3</i>	<i>Babesia microti-like</i>	<i>Canis familiaris</i>	USA
KF928959	<i>18S</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Bos taurus</i>	Índia
KM046917	<i>18S</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Bos taurus</i>	Suíça
KP757839	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Monodelphis domestica</i>	Brasil
KP757840	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
KP995259	<i>18S</i>	<i>Theileria equi</i>	<i>Equus caballus</i>	Índia
KR611121	<i>18S</i>	<i>Babesia felis</i>	<i>Felis catus</i>	África do Sul
KT223483	<i>18S</i>	<i>Babesia vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	Espanha
KT223484	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Meles meles</i>	Espanha
KT224420	<i>cox1</i>	<i>Babesia motasi</i>	não informado	
KU306940	<i>18S</i>	<i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Felis catus</i>	Suíça
KT937390	<i>18S</i>	<i>Theileria</i>	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Austrália
KU647709	<i>18S</i>	<i>Theileria haneyi</i>	<i>Equus caballus</i>	EUA
KX169167	<i>cox1</i>	<i>Babesia vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	Israel
KX169168	<i>cox1</i>	<i>Babesia vulpes</i>	<i>Vulpes vulpes</i>	Israel
KY683997	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Dasyurus novemcinctus</i>	Brasil
KY684001	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Tayassu pecari</i>	Brasil
KY684002	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil
KY684003	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Leopardus pardalis</i>	Brasil
KX698108	<i>cox3</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Ovis aries</i>	China
KY953227	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Austrália
LC576821	<i>18S</i>	<i>Theileria orientalis</i>	<i>Bos taurus</i>	Mianmar
LC684767	<i>cox1</i>	<i>Babesia naoakii</i>	<i>Bos taurus</i>	Japão
LN871600	<i>cytb</i>	<i>Babesia microti</i>	não informado	
MF288026	<i>18S</i>	<i>Babesia percei</i>	<i>Spheniscus demersus</i>	África do Sul
MF288028	<i>18S</i>	<i>Babesia ugwidiensis</i>	<i>Phalacrocorax capensis</i>	África do Sul
MF288029	<i>18S</i>	<i>Babesia ugwidiensis</i>	<i>Phalacrocorax capensis</i>	África do Sul
MF536661	<i>18S</i>	<i>Theileria bicornis</i>	<i>Ceratotherium simum</i>	Austrália
MF996533	<i>cox1</i>	<i>Babesia vesperuginis</i>	<i>Nyctalus noctula</i>	República Tcheca
MF996535	<i>cox1</i>	<i>Babesia vesperuginis</i>	<i>Vespertilio murinus</i>	Áustria

ANEXO VI (continuação) – Lista das sequências de *18S rDNA*, *cox1*, *cox3* e *cytb* utilizadas na análise filogenética de *Babesia* spp.. A primeira coluna demonstra os códigos de acesso do GenBank, seguidos do gene(s), identificação do parasita, espécie de hospedeiro intermediário e país de origem.

GenBank ID	Gene	Espécie	Hosp intermediário	País
MG344785	<i>cox1</i>	<i>Babesia capreoli</i>	<i>Cervus nippon</i>	República Tcheca
MG344792	<i>cox1</i>	<i>Babesia capreoli</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	República Tcheca
MG682489	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Procyon cancrivorus</i>	Uruguai
MG799845	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Meles meles</i>	China
MH107387	<i>cox3</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Homo sapiens</i>	EUA
MK257776	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil
MK580472	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Procyon lotor</i>	EUA
MK742774	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Canis lupus</i>	Itália
MK962313	<i>cox3</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Ovis aries</i>	China
MK962314	<i>cox3</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Ovis aries</i>	China
MN101137	<i>18S</i>	<i>Theileria lupei</i>	<i>Dasyurus viverrinus</i>	Austrália
MN101138	<i>18S</i>	<i>Theileria lupei</i>	<i>Setonix brachyurus</i>	Austrália
MN101140	<i>18S</i>	<i>Theileria</i> sp.	<i>Setonix brachyurus</i>	Austrália
MN135565	<i>cytb</i>	<i>Theileria lupei</i>	<i>Dasyurus viverrinus</i>	Austrália
MN135570	<i>cox3</i>	<i>Theileria</i> sp.	<i>Setonix brachyurus</i>	Austrália
MN135571	<i>cox3</i>	<i>Theileria</i> sp.	<i>Macropus giganteus</i>	Austrália
MN135572	<i>cox3</i>	<i>Theileria</i> sp.	<i>Potorous gilbertii</i>	Austrália
MN605889	<i>cox1</i>	<i>Babesia motasi</i>	<i>Ovis aries</i>	China
MN864544	<i>18S</i>	<i>Babesia negevi</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Israel
MN864546	<i>18S</i>	<i>Babesia negevi</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Israel
MN876837	<i>cox1</i>	<i>Babesia negevi</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Israel
MN876838	<i>cox1</i>	<i>Babesia negevi</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Israel
MT002347	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Phyllostomus discolor</i>	Brasil
MT002348	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Phyllostomus discolor</i>	Brasil
MT002356	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Phyllostomus discolor</i>	Brasil
MW172714	<i>18S</i>	<i>Theileria parva</i>	<i>Bubalis</i> sp.	Alemanha
MW172716	<i>18S</i>	<i>Theileria lestoquardi</i>	<i>Bubalis</i> sp.	Alemanha
MW290046	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Brasil
MW290048	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Brasil
MW290049	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Brasil
MW290050	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Brasil
MW308130	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Brasil
MW308131	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Brasil
MW881036	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Phyllotis darwini</i>	Chile
MW881037	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Phyllotis darwini</i>	Chile
MW883578	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Phyllotis darwini</i>	Chile
MZ231018	<i>cox1</i>	<i>Theileria uilenbergi</i>	<i>Ovis aries</i>	China
NC-034637	<i>cox3</i>	<i>Babesia microti</i>	não informado	
ON239748	<i>cox3</i>	<i>Theileria annulata</i>	<i>Bos taurus</i>	Algéria
ON303276	<i>cox3</i>	<i>Theileria buffeli</i>	<i>Bos taurus</i>	Algéria
ON995396	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Puda puda</i>	Chile
ON995397	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Puda puda</i>	Chile
ON995401	<i>cytb</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Puda puda</i>	Chile

ANEXO VI (continuação) – Lista das sequências de *18S rDNA*, *cox1*, *cox3* e *cytb* utilizadas na análise filogenética de *Babesia* spp.. A primeira coluna demonstra os códigos de acesso do GenBank, seguidos do gene(s), identificação do parasita, espécie de hospedeiro intermediário e país de origem.

GenBank ID	Gene	Espécie	Hosp. intermediário	País
ON995402	<i>cytb</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Puda puda</i>	Chile
OP209977	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis marsupialis</i>	Guatemala
OP023828	<i>18S</i>	<i>Theileria</i>	<i>Tapirus terrestris</i>	Brasil
OP023832	<i>18S</i>	<i>Theileria</i>	<i>Tapirus terrestris</i>	Brasil
OP023833	<i>18S</i>	<i>Theileria</i>	<i>Tapirus terrestris</i>	Brasil
OP023834	<i>18S</i>	<i>Theileria</i>	<i>Tapirus terrestris</i>	Brasil
OP186427	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis marsupialis</i>	Guatemala
OP751797	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis aurita</i>	Brasil
OP751800	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis aurita</i>	Brasil
OQ190472	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis aurita</i>	Brasil
OQ190473	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis aurita</i>	Brasil
PQ631368	<i>cytb</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ631370	<i>cytb</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
OQ787671	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil
OQ969879	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Priodontes maximus</i>	Brasil
OQ969881	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Brasil
OR208155	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
OR208156	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
OR149995	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
OR149996	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
OR149997	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
OR149998	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
OR149999	<i>18S</i>	<i>Babesia goianiaensis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil
PP082974	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Cerdocyon thous</i>	Brasil
PP082976	<i>cox1</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Cerdocyon thous</i>	Brasil
PP117082	<i>18S</i>	<i>Babesia ailuropodae</i>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	China
PP215410	<i>cytb</i>	<i>Babesia ailuropodae</i>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	China
PP215412	<i>cytb</i>	<i>Babesia ailuropodae</i>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	China
PP852299	<i>18S</i>	<i>Babesia coryicola</i>	<i>Puma concolor coryi</i>	EUA
PQ492346	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Argentina
PQ492347	<i>18S</i>	<i>Babesia</i> sp.	<i>Didelphis albiventris</i>	Argentina
PQ602138	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ602139	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ602141	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ602143	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ611206	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ611207	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ611208	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ611209	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PQ611210	<i>18S</i>	Piroplasmida sp.	<i>Thrichomys pachyurus</i>	Brasil
PV402287	<i>cytb</i>	<i>Cytauxzoon paradoxurus</i>	<i>Paradoxurus hermaphroditus</i>	Singapura
THE18SRRNA	<i>18S</i>	<i>Theileria parva</i>	<i>Bos taurus</i>	EUA

ANEXO VII – Lista de sequências do gene *18S rDNA* utilizadas na rede de haplótipos do clado Marsupialia da América do Sul (Figura 15).

ID Genbank	Hosp. Intermediário	Estado/País
MW290046	<i>Didelphis albiventris</i>	DF/Brasil
MW290048	<i>Didelphis albiventris</i>	MS/Brasil
MW290049	<i>Didelphis albiventris</i>	MS/Brasil
MW290050	<i>Didelphis albiventris</i>	MS/Brasil
MW290052	<i>Didelphis albiventris</i>	MS/Brasil
OP751797	<i>Didelphis aurita</i>	RJ/Brasil
OP751800	<i>Didelphis aurita</i>	RJ/Brasil
OQ787671	<i>Didelphis marsupialis</i>	MA/Brasil
OQ969879	<i>Priodontes maximus</i>	MS/Brasil
OQ969880	<i>Priodontes maximus</i>	MS/Brasil
PQ492346	<i>Didelphis albiventris</i>	Argentina
PQ492347	<i>Didelphis albiventris</i>	Argentina
Mmus	<i>Mus musculus</i> *	RJ/Brasil
IG1	<i>Philander quica</i> *	RJ/Brasil
IG2	<i>Philander quica</i> *	RJ/Brasil
PG1	<i>Philander quica</i> *	PG/Brasil
PG2	<i>Philander quica</i> *	PG/Brasil
PG3	<i>Philander quica</i> *	PG/Brasil
Oxym	<i>Oxymycterus nasutus</i> *	PG/Brasil

Abreviaturas: ID, identidade; Hosp., hospedeiro; Mmus, *Mus musculus*; IG, Iguaba Grande; PG, Ponta Grossa, Oxym, *Oxymycterus nasutus*. *Sequências deste estudo.