



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**DIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS EM LAGARTOS DA
AMAZÔNIA CENTRAL**

AMANDA MARIA PICELLI

Manaus, Amazonas

Outubro, 2020



AMANDA MARIA PICELLI

**DIVERSIDADE DE HEMOPARASITOS EM LAGARTOS DA
AMAZÔNIA CENTRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, da Universidade Federal do Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Zoologia.

Orientador: Igor Luis Kaefer

Coorientador: Felipe Arley Costa Pessoa

Coorientador: Lúcio André Viana Dias

Manaus, Amazonas

Outubro, 2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P591d Picelli, Amanda Maria
Diversidade de hemoparasitos em lagartos da Amazônia Central /
Amanda Maria Picelli . 2020
131 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Igor Luis Kaefer
Coorientador: Felipe Arley Costa Pessoa
Coorientador: Lúcio André Viana Dias
Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biodiversidade. 2. herpetofauna. 3. parasitos de sangue. 4.
relações filogenéticas. 5. taxonomia. I. Kaefer, Igor Luis. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sinopse:

Esta tese investigou a prevalência e a diversidade de hemoparasitos em lagartos da Amazônia Central. Além disso, traz informações sobre distribuição, taxonomia e relações ecológico-evolutivas desses parasitos e seus hospedeiros.

Palavras-chave: Biodiversidade, herpetofauna, morfologia, parasitos de sangue, relações filogenéticas, taxonomia

*Dedico esta tese aos meus amados pais,
Aparecida e José Eduardo (In memoriam), e à
todas as mulheres cientistas, cujas histórias de
vida me inspiraram a seguir nessa jornada.*

Agradecimentos

Ao meu amado pai, que agora mora entre as estrelas. Sei que de alguma forma você está comigo e feliz pela conclusão da minha tese. À minha família, principalmente minha mãe, pelo carinho, apoio e compreensão. Também devo agradecer ao meu querido Paulinho, cuja serenidade e amor foram essenciais para que eu conseguisse finalizar este trabalho.

Aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Igor Kaefer, Dr. Felipe Pessoa e Prof. Dr. Lúcio Viana que acreditaram no meu potencial como cientista. Muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, conselhos e confiança. Cada um de vocês foi essencial à sua maneira ao longo desse processo de aprendizagem.

Sou muito grata a todos os amigos que de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada. Aos amigos de longa data de Rio Claro: Amanda, Ronaldo, Carol, Pri, Marina, Rebeca e Annelise. À familia manauara (“casa trouxa”), Tito, Carol, Well e Úyra (Emerson), sem dúvida o tempo que moramos juntos foi muito importante e sempre vou sentir saudades. Às mulheres mais fortes e maravilhosas que o doutorado trouxe: Giu, Aline, Val, Sula e Gabi – com vocês ao lado foi mais fácil e divertido. Aos meus amigos e vizinhos (Rubana, Camis, Marcão, Ju, Renan, Diogo, Julia, Pedro, Cybelli e Itanna) da Vilinha do Chaves, obrigada pelas conversas, cuidados com a Malu, banhos de piscina e peixinhos assados.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), que além de ter oferecido a infraestrutura para realização desta tese, foi o local onde me reconheci como cientista e desenvolvi minhas melhores relações interpessoais ao longo desses quatro anos. Também quero agradecer à coordenação e equipe de funcionários da Fazenda Experimental da UFAM pelo apoio aos trabalhos de campo.

Sou grata muito ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da UFAM e as pessoas que se dedicam diariamente ao funcionamento do mesmo, como nosso querido secretário Gil (que facilita muito a vida dos alunos), aos docentes, discentes, membros do conselho e a coordenação (Prof. Menin e Prof. Fabricio - que sempre tiveram paciência e disponibilidade para conversar). Nesse contexto, preciso também agradecer aos meus grandes amigos e companheiros de pós, Igor Joventino e Alexandre Almeida, pelos cafés, cervejas, conselhos e risadas.

Aos alunos do KaeferLab, obrigada pela amizade, por me ensinarem muito sobre herpetologia e por despertarem em mim o “crush” pela Ecologia. Lu, obrigada por ser essa fada sensata e sempre me ajudar durante os momentos de ansiedade. Adriane, minha primeira filha

acadêmica, não sei o que teria feito sem sua organização e talento, obrigada por todo seu empenho nesse projeto!

Agradeço ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-Fiocruz) pela infraestrutura, tanto laboratorial quanto de campo (base da Fiocruz na Agrovila Rio Pardo), suporte técnico e logístico para as atividades de pesquisa. À Dra. Yara (IOC-Fiocruz) que foi fonte de inspiração e admiração nesse último ano de doutorado. À equipe do EDTA-ILMD (Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis da Amazônia): Dra. Claudia Rios, Dra. Keilen, Dra. Alessandra Nava, Eric, Jordan, Heliana, Jéssica, Mário, Rebeca, Túlio, Emanuelle e demais membros. Obrigada pelas contribuições científicas, confraternizações e auxílios em campo e no laboratório.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela infraestrutura e apoio a esta pesquisa. Ao Laboratório Temático de Microscopia Óptica e Eletrônica (LTMO-INPA), pela autorização do uso dos sistemas de imagens e ao querido Lucas, gerente do laboratório, por toda colaboração e amizade. Às coordenadoras das coleções zoológicas de Herpetologia e Mastozoologia, Dra. Fernanda Werneck e Dra. Nazareth Silva, respectivamente, pelo apoio com material de campo. À toda equipe do Projeto Dinâmica Biológica dos Fragmentos Florestais (PDBFF), pela autorização e auxílio com as atividades na ARIE-PDBFF.

Aos pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, Dra. Marta Teixeira, Dr. Bruno Fermino e Lyslaine Sato, o conhecimento e a experiência de vocês foram imprescindíveis para os resultados obtidos no terceiro capítulo desta tese.

Aos Dr. Fernando Silveira e Dr. Thiago Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua/PA, por permitir o acesso ao material reunido pelo Dr. Ralph Lainson. Muito obrigada também por toda a ajuda, espaço e equipamentos fornecidos para análise desse rico material durante minha estadia no IEC.

Agradeço àqueles que me auxiliaram em campo: Ayra, José Neto, Alexandre, Adriane, Mota, Sebastião, Eric, Moca, Rafael, Luna, Danilo, Alan, Emanuelle, Wellyngton, Gabi, Giu, Gabriel, Karina e Juruna. Todos vocês foram fundamentais não apenas para a coleta dos dados, mas por fazerem os dias de campo mais alegres.

A presente tese foi realizada com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código de financiamento 001. Também agradeço à essa agência e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de doutorado.

Pelo suporte financeiro destinado à execução desta pesquisa, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Universal 461.573/2014-8 e

429.132/2016-6), ao Programa de Excelência em Pesquisa em Saúde Básica e Aplicada (PROEP FIOCRUZ FAPEAM 001/2014) e ao Programa PDBFF de Auxílio-Pesquisa Thomas Lovejoy.

Meus agradecimentos também ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (RAN/ICMBio), SisGen - Ministério do Meio Ambiente, Comitê de Ética no Uso de Animais da UFAM pela concessão das autorizações relativas à pesquisa.

Muito obrigada ao Dr. Ralph Lainson, que infelizmente não pude conhecê-lo, mas sua vida de protozoologista na Amazônia foi fonte de grande inspiração. Sua memória permanecerá viva em seu trabalho e através daqueles que continuarem seu legado.

Sem vocês esse sonho não seria possível, a todos muito obrigada!

“I’ve always said to young Brazilian students what a wonderful place they’re in. If you turn over a stone you’ll find four new species underneath it. The Amazon region is a veritable mine of parasitological information, yet very, very few people were engaged in parasitological studies in this region.”

Ralph Lainson

(1927-2015)

Resumo

Os parasitos são reconhecidos pela sua grande capacidade de influenciar a evolução e ecologia de seus hospedeiros, tanto ao nível de individuo quanto de comunidade. Entretanto, no Brasil, um dos países com a maior biodiversidade do planeta, estudos sobre parasitismo em populações silvestres ainda são relativamente escassos. Na região amazônica, levantamentos anteriores constataram uma rica fauna de parasitos de sangue em lagartos e deram indícios sobre um elevado potencial para descoberta de novas espécies. Nesse contexto, a presente tese investigou a ocorrência de hemoparasitos em lagartos da Amazônia Central, explorando ao longo de três capítulos aspectos relacionados à diversidade, taxonomia e suas relações ecológico-evolutivas. Para tanto, foram obtidas amostras sanguíneas de diversas espécies de lagartos capturadas em áreas de floresta de terra-firme, localizadas próximas aos municípios de Manaus, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, no Estado do Amazonas, Brasil. No **primeiro capítulo** foram reunidos os resultados sobre a prevalência e a riqueza de hemoparasitos encontrados nessas localidades, apresentando também uma lista atualizada dos estudos realizados no Brasil sobre hemoparasitos em lagartos. O **segundo capítulo** traz a redescrição taxonômica, usando dados morfológicos e moleculares, de uma espécie de hemogregarina, *Hepatozoon ameivae*, detectada em lagartos *Ameiva ameiva*. Para o **terceiro capítulo** foi levantada a hipótese de que a ecologia do lagarto *Uranoscodon superciliosus* está moldando a diversidade dos tripanossomas que os parasitam, o que pode ser evidenciado pelas relações filogenéticas de dois novos genótipos de tripanossomas isolados nessa espécie de hospedeiro. Por fim, os resultados obtidos nessa tese ampliaram o conhecimento sobre a diversidade e distribuição dos hemoparasitos no Brasil, além de terem gerado informações inéditas sobre o sistema parasito-hospedeiro formado pelos lagartos e seus hemoparasitos na região amazônica.

Palavras-chave: Biodiversidade; Filogenia; Floresta Amazônica; Morfologia; Parasitos de Sangue; Squamata.

Abstract

Parasites are recognized for their great ability to influence the evolution and ecology of their hosts, at the individual and community levels. However, in Brazil, one of the countries with the greatest biodiversity on the planet, studies on parasitism in wild populations are still relatively scarce. In the Brazilian Amazonia, previous surveys found a rich fauna of blood parasites in lizards and gave indications of a high potential for the discovery of new species. In this context, the present thesis investigated the occurrence of hemoparasites in lizards from Central Amazonia, exploring over three chapters aspects related to the diversity, taxonomy and their ecological-evolutionary relationships. For this purpose, blood samples were obtained from different lizard species captured in areas of upland forests (*terra-firme*), located near the municipalities of Manaus, Presidente Figueiredo and Rio Preto da Eva, in the State of Amazonas, Brazil. In the **first chapter**, results on the prevalence and richness of hemoparasites found in these locations were gathered, also presenting an updated list of studies carried out in Brazil involving hemoparasites in lizards. The **second chapter** presents the taxonomic redescription, using morphological and molecular data, of a hemogregarine species, *Hepatozoon ameivae*, detected in *Ameiva ameiva* lizards. In the **third chapter**, we raised the hypothesis that the ecology of the lizard *Uranoscodon superciliosus* is shaping the diversity of the trypanosomes that parasitize it, which can be evidenced by the phylogenetic relationships of the two new trypanosome genotypes isolated from this host species. Finally, the results obtained in this thesis expanded the knowledge about the diversity and distribution of hemoparasites in Brazil, in addition to novel information about the host-parasite system formed by lizards and their hemoparasites in the Amazonian region.

Keywords: Biodiversity; Phylogeny; Amazon rainforest; Morphology; Blood Parasites; Squamata.

Sumário

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
Introdução Geral	14
Capítulo 1. Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscopy	21
Capítulo 2. Redescription of <i>Hepatozoon ameivae</i> (Carini and Rudolph, 1912) from the lizard <i>Ameiva ameiva</i> (Linnaeus, 1758)	62
Capítulo 3. Trypanosome phylogenetic relationships from the Amazonian Diving Lizard indicate host ecology as a driver of parasite diversification	86
Considerações Finais	117
Referências Bibliográficas	120
Anexos	128

Lista de Tabelas

Introdução Geral

Tabela 1. Diversidade de hemoparasitos do Filo Apicomplexa e de tripanosomatídeos descritos em répteis ao redor do mundo e seus vetores	17
--	----

Capítulo 1.

Table I. Checklist of haematozoan parasite species occurring in Brazilian lizards	50
Table II. Prevalence of haemoparasites in lizards from Central Amazonia	54

Table III. Infections of Apicomplexa parasites in 12 lizard species sampled in this study	57
---	----

Capítulo 2.

Table 1. Morphometric characteristics of the <i>Hepatozoon ameivae</i> found in the lizard <i>Ameiva ameiva</i> from Central Amazonia, Brazil. Measurements are presented as mean ± standard deviation (SD) followed by the range (maximum and minimum values)	82
--	----

Online Resource 1. Distance matrix among partial 18S rRNA sequences of <i>Hepatozoon ameivae</i> obtained in this study and isolates of <i>Hepatozoon</i> spp. from the GenBank® database (461 base pairs). The upper matrix shows the uncorrected pairwise distance (<i>p</i> distance) among the sequences, while the lower matrix shows the number of nucleotide differences	84
--	----

Capítulo 3.

Table 1. Morphometric characteristics of the trypomastigotes found in the lizard <i>Uranoscodon superciliosus</i> from Central Amazonia. Brazil. Measurements are presented as mean ± standard deviation (SD) followed by the range (maximum and minimum values)	112
--	-----

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figure 1 Sampling areas in Central Amazonia: (1) Campus of the Federal University of Amazonas (UFAM); (2) UFAM Experimental Farm; (3) Biological Dynamics of Forest Fragments Project (BDFFP) Reserve; (4) Agrovila Rio Pardo.....59

Figure 2 Parasites and inclusions found in lizards from Central Amazonia. Gametocytes of (a) *Hepatozoon ameivae* and (b) *Hepatozoon* sp. in *Ameiva ameiva*. (c) *Sauroplasma*-like infection in *Uranoscodon superciliosus*. (d) Trophozoite with nuclear division of *Plasmodium carmelinoi* from *A. ameiva*. (e) Trophozoite and mature (f) gametocyte of *Plasmodium* sp. in *Norops planiceps*. (g) Macrogametocytes and microgametocyte of *Plasmodium kentropyxi* in *Kentropyx calcarata*. (h) Gametocyte of *Sarocystozoon tupinambi* in a lymphocyte from *Tupinambis teguixin*. (i) *Fallisia simplex* in *Plica umbra*, showing single and double gametocyte infections in the thrombocytes. (j) Gametocyte of *Garnia uranoscodoni* from *U. superciliosus*. *Trypanosoma* spp. infections in (k) *U. superciliosus* and (l) *P. umbra*. (m) Microfilaria in *A. ameiva* and in (n) mixed infection in *U. superciliosus*. Vacuole-like inclusions in erythrocytes from (o) *U. superciliosus* and (p) *A. ameiva*. Arrow heads indicate pigment granules; black arrows indicate parasite vacuoles and asterisks indicate inclusions. Micrographs are from Giemsa-stained thin blood films. Scale bar is 10 µm60

Capítulo 2

Fig. 1 Gametocytes of *Hepatozoon ameivae* in the blood of *Ameiva ameiva* from Central Amazonia, Brazil. **a, b** and **c** — Intraerythrocytic gamonts; **d** and **e** — Parasites invading leukocytes (L); **f**— Gamont free in blood (gf). Arrows indicate parasites; asterisks indicate gamont nuclei; and (n) indicates host cell nucleus. Micrographs are from Giemsa-stained thin blood films. Scale bar is 20 µm83

Online Resource 2 Bayesian phylogenetic hypothesis based on an alignment of 445 bp fragment of *Hepatozoon* spp. 18S rRNA from *Ameiva ameiva* isolated in this study and sequences deposited in GenBank®. Bootstrap values (≥ 50) are given above the nodes. The branch length scale represents 0.02 substitutions per site. *Dactylosoma ranarum*, *Adelina*

<i>dimidiata</i> and <i>Adelina grylli</i> were used as outgroup. The sequences indicated in bold represent those from this study	85
---	----

Capítulo 3

Fig. 1 Geographical origin of trypanosome isolates from <i>Uranoscodon superciliatus</i> in Central Amazonia, Brazil. (1) Experimental Farm of the Federal University of Amazonas – FEX-UFAM; and (2-6) Area of Relevant Ecological Interest of the Biological Dynamics of Forest Fragments Project – AREI-BDFFP. Tones of gray indicate the trypanosome prevalence, and the sizes of the circles indicate the number of individuals analyzed per site	113
---	-----

Fig. 2 Trypomastigote forms found in the peripheral blood of <i>Uranoscodon superciliatus</i> from Central Amazonia, Brazil. (a – d) Rounded or elliptical morphologies; (e – h) leaf-shaped trypanosomes; (i – l) elongated forms with cytoplasmic projections. Abbreviations: n, nucleus; k, kinetoplast; f, flagellum; cp, cytoplasmic projection. Micrographs are from Giemsa-stained thin blood films. Scale bar is 10 µm	114
---	-----

Fig. 3 Phylogenetic positioning of trypanosomes of <i>Uranoscodon superciliatus</i> from Central Amazonia. Phylogenetic trees (ML) inferred from V7V8 SSU rDNA (a) and by <i>gGAPDH</i> (characters 812, Ln = -8826.807868) (b) gene sequences. Maximum Likelihood inference (characters 606, Ln = -5963.950862) supported the Genotype 01 and Genotype 02 in the Aquatic clade. Trypanosomes of the terrestrial lineages and trypanosomatids of other genera were used as outgroups. Bootstrap values are given under the nodes	115
---	-----

Fig. 4 Phylogenetic analysis (ML) based on concatenated SSU rDNA and <i>gGAPDH</i> gene sequences of <i>Trypanosoma</i> spp. from <i>Uranoscodon superciliatus</i> isolated in this study. The analyses were inferred by Maximum Likelihood (ML, 1,318 characters, Ln = -17092.752369) and Bayesian Inference (BI). The analyses include species representative of all major clades within the genus <i>Trypanosoma</i> , and trypanosomatids of other genera as outgroups. Numbers at nodes (ML/BI) are bootstrap supports (> 50%) and Bayesian posterior probabilities (> 0.8) derived from 500 replicates	116
---	-----

Introdução Geral

Com origens e histórias evolutivas independentes, o estilo de vida parasitário é complexo e, possivelmente, o mais bem-sucedido entre os seres vivos, estando presente em praticamente todos os grandes grupos taxonômicos (De Meeûs e Renaud 2002, O'Donoghue 2017). Há estimativas que sugerem que mais da metade das espécies viventes podem ser consideradas, em sentido amplo, como parasitos (Dobson et al. 2008, Poulin 2014, Morand 2015). Tradicionalmente, os parasitos (gr. *parasitos* - quem come à mesa do outro) são definidos como organismos que passam a maior parte ou toda a vida associados a outros organismos (hospedeiros) alimentando-se deles e, como consequência, causando algum tipo de prejuízo a esses indivíduos (Price 1977, Poulin e Morand 2004). Contudo, dada a particularidade de cada parasito e das características que envolvem a relação com seu hospedeiro, é possível aprofundar esse significado: além de obter nutrientes, muitas espécies dependem de seus hospedeiros para seu desenvolvimento, reprodução e dispersão, estratégias parasitárias que podem ou não levar seus hospedeiros à morte (Erbet e Herre 1996, Poulin e Morand 2004).

Ecologicamente, parasitos são considerados como verdadeiros “engenheiros” da natureza, pois, além de intervirem sobre a coexistência ou a exclusão das espécies, podem atuar em diferentes níveis e processos dentro das comunidades, influenciando variáveis que estruturam os ecossistemas (Poulin 1999, Thomas et al. 2000, Hatcher et al. 2012, Buck 2019). São organismos-chave para a composição de algumas teias alimentares, aumentando a complexidade e afetando os fluxos de energia e a ciclagem de nutrientes (Lafferty et al. 2008, Hatcher et al. 2012, Anaya-Rojas et al. 2019). Em seus hospedeiros são capazes de influenciar vários processos ecológicos e evolutivos (e.g. seleção sexual, migração, competição e predação, especiação e extinção) que, por sua vez, moldam a dinâmica da população hospedeira e levam a efeitos diretos ou indiretos sobre outras espécies que interagem com seus hospedeiros (e.g.

predadores e competidores) (Schall 1992, Tompkins e Begon 1999, Hatcher et al. 2012, Buck 2019). Dessa forma, os parasitos são importantes preditores da biodiversidade e da saúde dos ecossistemas (Hudson et al. 2006, Dobson et al. 2008, Thompson et al. 2018).

Por outro lado, os parasitos geralmente são reconhecidos pelos diversos efeitos negativos que produzem sobre seus hospedeiros, principalmente quando associados às populações humanas (e.g. malária, Doença de Chagas, filariose, entre outras) com severos impactos na saúde pública e economia mundial (Perkins 2014, Telleria e Tibayrenc 2017, WHO 2019). Como resultado, grande parte das pesquisas estão concentradas em poucos grupos de hospedeiros animais, sobretudo parasitos de mamíferos com interesse econômico ou envolvendo animais silvestres associados a doenças zoonóticas (Valkiunas 2005, Spodareva et al. 2018). Entretanto, negligenciar espécimes pode ter implicações sobre o entendimento da virulência e evolução dos patógenos de importância médica (Rambaut et al. 2001, Galen et al. 2018). A acurácia das inferências sobre processos evolutivos depende de uma amostragem ampla dos taxa (Heath et al. 2008), e especialmente da reconstrução das transições entre grupos de hospedeiros que levaram à origem da doença (Liu et al. 2010).

Embora sejam hospedeiros subestimados, os répteis (Chordata, Reptilia) se destacam pela grande variedade de parasitos sanguíneos (hemoparasitos) que albergam, com uma riqueza de espécies registradas superior àquelas conhecidas para aves e mamíferos (Davies e Johnston 2000, Telford 2009). Isso provavelmente se deve à antiga idade filética dos répteis [final do período Carbonífero (~315 M.a)] e também à elevada diversidade ecológica e taxonómica desses hospedeiros (Poinar e Poinar 2004, Vitt e Caldwell 2013). Nesse aspecto, os lagartos (Lepidosauria, Squamata) podem ser considerados como hospedeiros potencialmente diversos em espécies de hemoparasitos, uma vez que, além de possuirem 60% das 11 mil espécies descritas da classe Reptilia Laurenti, 1768, apresentam hábitos de vida bastante diversificados

e são encontrados em uma ampla variedade de ambientes (Vitt et al 2008, Faria et al. 2019, Peixoto et al. 2020, Uetz et al. 2020).

Nos répteis, os hemoparasitos encontrados com maior frequência pertencem ao filo Apicomplexa Levine, 1970 e à família Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Telford 2009, O'Donoghue 2017). Esses dois taxa contabilizam juntos nesses hospedeiros aproximadamente 570 espécies, divididas em 18 gêneros e 10 famílias, das quais mais da metade (ca. 320) foram identificadas em lagartos (Tabela 1). Há também outros organismos menos frequentes, como os estágios larvais (microfilárias) do filo Nematoda Diesing, 1861 e, também, inclusões virais e bacterianas (Telford 2009, Halla et al. 2014). Além disso, entre os hemoparasitos, à exceção de alguns vírus e bactérias, há uma convergência adaptativa ao uso de invertebrados hematófagos como principais vetores para transmissão entre seus hospedeiros vertebrados (O'Donoghue 2017; Tabela 1).

O filo Apicomplexa (Chromista, Alveolata) detém mais de 6 mil espécies descritas (Votýpka et al. 2017). Todas são endossimbiontes obrigatórias e apresentam um conjunto de estruturas na extremidade anterior, denominado complexo apical, que possibilita a invasão e sobrevivência dentro da célula hospedeira (Levine et al. 1980, Morrissette e Sibley 2002, Baum et al. 2008, Tardieu e Baum 2016). O desenvolvimento dos Apicomplexa é único entre os eucariotos por apresentar uma ontogenia reprodutiva cíclica, que contém duas fases assexuadas, merogonia e esporogonia, e uma sexuada, chamada de gametogonia (Striepen et al. 2007, Baum et al. 2008, Votýpka et al. 2017). Os membros desse filo com estágios de desenvolvimento intracelular nas células sanguíneas dos répteis são (Tabela 1): as hemogregarinas (Coccidia, Adeleorina), os hemococcídios (Coccidia, Eimeriorina), os hemosporídeos (Hematozoa, Haemosporida) e os piroplasmas (Hematozoa, Piroplasmida). Destes, os mais encontrados em lagartos são as hemogregarinas do gênero *Hepatozoon* Miller, 1908 e os hemosporídeos do

gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli 1885 (Smith 1996, Telford 2009, Lainson 2012, Perkins et al. 2014).

Tabela 1. Diversidade de hemoparasitos do Filo Apicomplexa e de tripanosomatídeos descritos em répteis ao redor do mundo e seus vetores (Telford 1995, 2009, Smith 1996, Lainson 2012, Megia-Palma et al. 2017, O'Donoghue 2017, Úngari et al. 2018, Fermino et al. 2019, Tomé et al. 2019).

Parasito (No. spp.)	Hospedeiro	Vetor
Kinetoplastea		
Trypanosomatidae		
<i>Trypanosoma</i> (85)	crocodilianos, quelônios, lagartos e serpentes	sanguessugas e artrópodes
<i>Leishmania</i> (<i>Sauroleishmania</i>) (18)	lagartos e serpentes	flebotomíneos
Coccidia		
Hepatozoidae		
<i>Hepatozoon</i> (220)	crocodilianos, jabutis, tuataras, anfisbênias, lagartos e serpentes	diversos artrópodes
Haemogregarinidae		
<i>Haemogregarina</i> (46)	quelônios aquáticos	sanguessugas
Dactylosomatidae		
<i>Dactylosoma</i> *(1)	lagartos	?
Karyolysidae		
<i>Hemolivia</i> (4)	quelônios e lagartos	ácaros
<i>Karyolysus</i> (13)	lagartos	ácaros
Lankesterellidae		
<i>Lankesterella</i> (4)	lagartos	?
<i>Lainsonia</i> (2)	lagartos	mosquitos
<i>Schellackia</i> (10)	lagartos	mosquitos e ácaros
Hematozoa		

Cont. Tabela 1

Parasito (No. spp.)	Hospedeiro	Vetor
Plasmodiidae		
<i>Plasmodium</i> (107)	lagartos e serpentes	mosquitos e flebotomíneos
<i>Saurocytozoon</i> (2)	lagartos	mosquitos
Haemoproteidae		
<i>Haemocystidium</i> (28)	quelônios, lagartos e serpentes	tabanídeos
Garniidae		
<i>Garnia</i> (11)	lagartos	?
<i>Progarnia</i> (1)	crocodilianos	?
<i>Fallisia</i> (11)	lagartos	?
Haemohormidiidae		
<i>Sauroplasma*</i> (3)	quelônios, lagartos e serpentes	?
<i>Haemohormidium*</i> (1)	quelônios	?

*Espécies desses gêneros nesses hospedeiros foram consideradas de natureza incerta (Barta 1991, Telford 2009).

No caso dos tripanosomatídeos (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), esses são parasitos unicelulares caracterizados principalmente pela presença de um flagelo único e de uma organela chamada cinetoplasto, que é formada por uma grande rede de DNA circular (kDNA) e está localizada na base do flagelo (Stevens et al. 2001, Simpson et al. 2006). A reprodução é assexuada por fissão binária com alternância das formas celulares (pleomorfismo) durante o ciclo de vida, as quais podem variar desde estágios de desenvolvimento intracelulares nos tecidos do hospedeiro (amastigotas), até formas extracelulares flageladas com membranas ondulantes (tripomastigotas) observadas no plasma sanguíneo dos vertebrados (O'Donoghue 2017). Os gêneros *Trypanosoma* Gruby, 1843 e *Leishmania* Ross, 1903 são os únicos flagelados heteroxenos dessa família com representantes infectando répteis (Tabela 1) e outros vertebrados (Telleria e Tibayrenc 2017). Dentre esses dois, *Trypanosoma* se sobressai pela grande

diversidade genética e morfológica de suas espécies em lagartos e serpentes (Viola et al. 2008, 2009, Telford 2009, Fermino et al. 2019).

Com os avanços das ações antrópicas sobre os ambientes naturais e em face a uma eminente crise climática, há uma crescente preocupação sobre os possíveis impactos da perda em massa das espécies (Ceballos et al. 2017). Mas, apesar de serem componentes essenciais da biodiversidade, os parasitos são inconspicuos para a maioria dos esforços conservacionistas (Thompson et al. 2018, Miliotic et al. 2020). No entanto, são extremamente vulneráveis à extinção e frequentemente correm maiores riscos de desaparecerem do que seus hospedeiros (Dunn et al. 2009, Thompson et al. 2018, Miliotic et al. 2020). Isso se deve ao fato de estes poderem ser extintos em decorrência da extinção dos seus hospedeiros (co-extinção) ou através do declínio da população hospedeira (Miliotic et al. 2020). Além disso, assim como na recente pandemia causada pelo vírus Sars-CoV-2 (novo coronavírus), alguns patógenos podem se beneficiar com as atividades humanas e seus efeitos, uma vez que proporcionam a esses organismos oportunidades de propagação e o estabelecimento em novos hospedeiros (Jones et al. 2008, Cizauskas et al. 2017, Zohdy et al. 2019). Dessa forma, alterações na dinâmica da fauna parasitária produzem consequências profundas sobre a saúde de populações humanas e silvestres (Dobson et al. 2008, Corlett et al. 2020, FAO 2020).

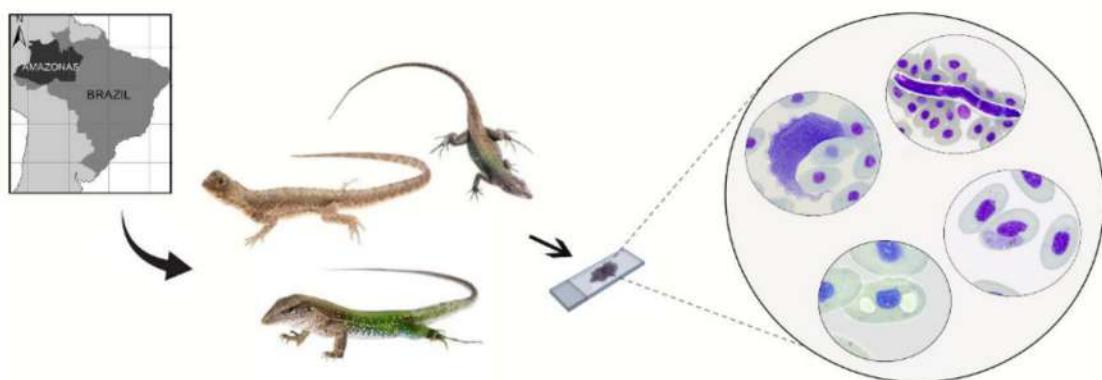
Nesse aspecto, a Floresta Amazônica, a qual concentra grande parte da biodiversidade do planeta, tem sido irreversivelmente destruída e modificada no Brasil sob o amparo de uma legislação ambiental e governos que incentivam a exploração de recursos e o desmatamento (Novaes e Souza 2013, Magnusson et al. 2018). Apenas no ano de 2019 houve um aumento de quase 34% (10.129 km²) em relação à taxa de desmatamento de 2018 na Amazônia brasileira (INPE 2020). Uma condição bastante dramática, tendo em vista que nesse bioma há constantemente descrições de espécies novas de hospedeiros reptilianos, como os lagartos, cujos hemoparasitos ainda são pobremente conhecidos (Costa e Bérnuls 2018, Ribeiro-Júnior et

al. 2020). De fato, há registros de hemoparasitos em somente 10% ($n = 16/152$) das espécies de lagartos que ocorrem na Amazônia brasileira (Lainson 2012, Costa e Bérnuls 2018).

Apesar dessa quantidade relativamente baixa de animais amostrados, os estudos pioneiros conduzidos pelo Dr. Ralph Lainson, principalmente entre os anos de 1966 e 1992, mostraram a existência de uma rica fauna de hemoparasitos nesses hospedeiros, sugerindo assim que a região amazônica no Brasil detém um potencial elevado para novas espécies destes parasitos (Lainson 2012). Entre os hemoparasitos registrados nesses levantamentos, foram 27 espécies do filo Apicomplexa e duas espécies de tripanosomas (para mais detalhes ver Tabela 1 do Capítulo 1). Porém, a maioria dessas foram detectadas em lagartos oriundos da Amazônia Oriental e, em sua maioria, descritas apenas com base na taxonomia tradicional, sem o uso de ferramentas moleculares. Isso pode levar a um desconhecimento dos padrões de distribuição e identidade das espécies de parasitos que ocorrem no Brasil, além de refletir sobre uma baixa compreensão da interação desses organismos com seus hospedeiros lagartos (Heath et al. 2008, Morand 2018).

Nesse contexto, a presente tese investigou a diversidade de hemoparasitos e caracterizou, através de dados morfológicos e moleculares, a composição desta comunidade em hospedeiros lagartos da Amazônia Central. Os resultados alcançados encontram-se organizados em três capítulos:

- **Capítulo 1** trata da prevalência e diversidade dos hemoparasitos encontrados nos lagartos da região da Amazônia Central;
- **Capítulo 2** apresenta a redescrição da hemogregarina *Hepatozoon ameivae* (Carini e Rudolph, 1912) do lagarto *Ameiva ameiva*;
- **Capítulo 3** aborda as relações filogenéticas dos tripanosomas que parasitam *Uranoscodon superciliosus* (Linnaeus, 1758).



CAPÍTULO 1

Amanda M. Picelli, Adriane C. Ramires, Gabriel S. Masseli, Felipe A. C. Pessoa, Lucio A. Viana e Igor L. Kaefer. **Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from Central Amazonia revealed by microscopy.** Manuscrito publicado no periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências em 20 de julho de 2020. DOI [10.1590/0001-37652020200428](https://doi.org/10.1590/0001-37652020200428).

**Under the light: high prevalence of haemoparasites in lizards (Reptilia: Squamata) from
Central Amazonia revealed by microscopy**

AMANDA M. PICELLI¹, ADRIANE C. RAMIRES², GABRIEL S. MASSELI³, FELIPE A. C. PESSOA⁴,
LUCIO A. VIANA⁵ & IGOR L. KAEFER^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Coroado I, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Petrópolis, 69067-375, Manaus, AM, Brazil

⁴Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis na Amazônia (EDTA), Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69067-005, Manaus, AM, Brazil

⁵Laboratório de Estudos Morfológicos e Parasitários, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, s/n, Jardim Marco Zero, 68903-419, Macapá, AP, Brazil

Key words: Biodiversity, blood parasites, Lacertilia, morphology, Neotropics.

Running title: Haemoparasites in lizards from Central Amazonia

Academy Section: Biological Sciences

Amanda Maria Picelli: <https://orcid.org/0000-0001-7543-168X>

Adriane Costa Ramires: <https://orcid.org/0000-0002-2547-614X>

Gabriel Sales Masseli: <https://orcid.org/0000-0002-5762-758X>

Felipe Arley Costa Pessoa: <https://orcid.org/0000-0002-6318-1887>

Lucio André Viana: <https://orcid.org/0000-0002-0932-0479>

Igor Luis Kaefer: <https://orcid.org/0000-0001-6515-0278>

Correspondence to: **Amanda Maria Picelli**

E-mail: amanda.mpicelli@gmail.com

Abstract: Blood samples from 330 lizards of 19 species were collected to investigate the occurrence of haemoparasites. Samplings were performed in areas of upland (*terra-firme*) forest adjacent to Manaus municipality, Amazonas, Brazil. Blood parasites were detected in 220 (66%) lizards of 12 species and comprised four major groups: Apicomplexa (including haemogregarines, piroplasms, and haemosporidians), trypanosomatids, microfilarid nematodes and viral or bacterial organisms. Order Haemosporida had the highest prevalence, with 118 (35%) animals from 11 species. For lizard species, *Uranoscodon superciliosus* was the most parasitised host, with 103 (87%; n = 118) positive individuals. This species also presented the highest parasite diversity, with the occurrence of six taxa. Despite the difficulties attributed by many authors regarding the use of morphological characters for taxonomic resolution of haemoparasites, our low-cost approach using light microscopy recorded a high prevalence and diversity of blood parasite taxa in a relatively small number of host species. This report is the first survey of haemoparasites in lizards in the study region. It revealed a high diversity of lizard haemoparasites and highlights the need to understand their impacts on hosts.

INTRODUCTION

The protozoologist Dr. Ralph Lainson (1992) two decades ago in his work on neglected parasites in the Amazonia basin quoted a phrase from P.C.C. Garnham, his former advisor: "There is a serious danger that malarial parasites become extinct." Since that time, very few efforts have been made to contain the threats to the diversity of these parasites and other organisms (Ferrante & Fearnside 2019). In fact, these threats have been aggravated by increased habitat destruction in recent years, particularly in tropical regions (INPE 2019). Extinction, alteration in the abundance or introduction of parasites can have profound impacts on the health of a large number of free-living species (Dobson et al. 2008), because parasites are ecologically involved in important mechanisms that regulate wildlife populations and structure communities (Tompkins & Begon 1999, Thomas et al. 2000). Moreover, they may influence their host biological processes, such as sexual selection (Ehman & Scott 2002, Megia-Palma et al. 2018), predation and competition dynamics (Schall 1992, Garcia-Longoria et al. 2015), as well as speciation and extinction processes (Anderson & May 1978, Poulin 1999, Prenter et al. 2004).

Reptiles are hosts for a wide variety of parasites, especially for diverse groups that parasitise blood cells (Davies & Johnston 2000, Telford 2009). These blood parasites may be intra- or extracellular organisms that range from protozoan kinetoplastids (Killick-Kendrick et al. 1986, Telford 1995) and apicomplexan parasites (Levine 1988, O'Donoghue 2017), to microfilarid nematodes (Thoisy et al. 2000, Halla et al. 2014) as well as viral and bacterial inclusions (Telford 2009). Except for the last two pathogens, whose transmission is not yet clear, the other three parasitic taxa share a common feature by using a range of haematophagous invertebrates as the main vectors for transmission between vertebrate hosts (Smallridge & Paperna 1997, Viana et al. 2012, Van As et al. 2015, Fermino et al. 2019). Furthermore, the haemoprotzoans of Phylum Apicomplexa Levine, 1970 are apparently the most studied of all

and also represent the taxon with the largest number of species parasitising reptiles (Levine 1988). Only in lizards (Squamata: Sauria), approximately 14 genera were recorded (O'Donoghue 2017); haemogregarines and haemosporidians are the most frequently identified groups (Smith 1996, Perkins 2014).

Although Brazil is a megadiverse country and has the third richest reptilian fauna in the world (Costa & Bérnilds 2018), approximately 795 species, knowledge about haemoparasite diversity in these hosts consists of mainly a few concentrated studies in the eastern Amazon region (Lainson 1992, 2012). These studies recorded a rich haematozoan fauna in lizards and also suggest that the Amazon biome has a great potential for the discovery of new haemoparasitic species in these vertebrates, as 29 (80%) of the 36 known protozoan species in the country occur in this region (Table I). However, these records are limited to a total of 20 lizard species (Table I), which represent 7% ($n = 276$) of the described Brazilian lizard fauna and 10% ($n = 16/152$) for the Amazon region (Costa & Bérnilds 2018). This small number is probably due to the difficulties in collecting these hosts and also the lack of specialists interested in working with haemoparasites from herpetofauna.

Light microscopy is an important tool for diagnosing infections that has crossed centuries and generations of scientists, still being the fastest and most accessible technique for searching parasites (Halla et al. 2014). This is especially true for studies adopting horizontal approaches that aim to estimate parasitism in poorly known groups. In this sense, we sought to investigate using light microscopy the presence and diversity of haemoparasites in lizards from Central Amazonia.

MATERIALS AND METHODS

STUDY AREA

The study was conducted in four upland (*terra-firme*) forest sites in Brazilian Central Amazonia, all located in the State of Amazonas, Brazil (Figure 1). The first study area was the Federal University of Amazonas forest fragment campus (UFAM; 3°4'34"S, 59°57'30"W), located in the eastern part of the city of Manaus. The three remaining study areas were located, respectively, 38 km (UFAM Experimental Farm; 2°38'57.6"S, 60°3'11"W), 80 km (Biological Dynamics of Forest Fragments Project [BDFFP]; 2°25"S, 59°50'W), and 160 km (Agrovila Rio Pardo; 1°48"S, 60°19' W) north of Manaus. These sampling regions present a mean annual temperature of approximately 26°C with relative air humidity over 80% (Araujo et al. 2002). The yearly precipitation is over 2,000 mm and mostly concentrated in a rainy season that usually occurs from December to May (Marques-Filho et al. 1981). The vegetation of the sampling sites is mainly composed of a mosaic of upland Amazonian rainforest, which varies from primary and secondary forests to open areas. The average elevation is 40–160 m above sea level (Laurance et al. 2011). Some of these landscapes are relatively undisturbed (Deichmann et al. 2010, Rojas-Ahumada et al. 2012), but most exhibit anthropogenic alterations (Rocha et al. 2004, Ramos et al. 2014).

LIZARD AND BLOOD SAMPLING

A total of 330 lizards from 19 species distributed in 17 genera and 10 families were sampled between 2016 and 2019 (Table II). Animals were captured using several methods, such as active search (Doan 2003) and traps, i.e., pitfalls with drift-fences (Jenkins et al. 2003), funnels made out of PVC pipes (Abrahão et al. 2019) and live-traps (Vieira et al. 2015). Lizards were identified through specialised literature (Ávila-Pires 1995, Vitt et al. 2008), and taxonomic

nomenclature was adopted following Costa & Bérnls (2018). The blood samples were obtained by tail or cardiac puncture using a sterile insulin syringe (Samour et al. 1984). A portion of collected blood was used to make smears, which were fixed with absolute methanol and stained with 10% Giemsa. The other portion was applied to a filter paper for molecular analyses. Lizards were released within 24 h of capture, but in the case of cardiac puncture, the blood was collected after euthanasia (via injection of 2% lidocaine). Specimens were preserved in 10% formalin and deposited in the Zoological Collections of the National Institute of Amazonian Research (INPA) and UFAM in Manaus, Brazil.

Lizard sampling and access to the genetic data were authorised by the Brazilian Ministry of the Environment (SISBIO n° 53851-4 and SISGEN AA6199D, respectively). All procedures were approved by the ethics committee on animal use from Universidade Federal do Amazonas (protocol number 012/2016).

MICROSCOPIC ANALYSES

Blood smears were examined for up to 20 min under a Leica DM4B microscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) at $\times 400$ and $\times 1000$ total magnification. The slides with parasites were carefully examined and images were captured with an attached Leica DMC4500 digital camera and processed with LAS V4.8 (Leica Microsystems Suiza Limited 2015). Morphometric measurements were taken with this same system. However, they will not be presented here in this work, as they are part of ongoing taxonomic studies. Haematozoan parasites were taxonomically identified by comparing their morphologies to the descriptions from the guides of Telford (2009) and Lainson (2012), besides original description articles. Additionally, to confirm the identification of some haemosporidian species, we compared our material with that of the collection of Dr. Ralph Lainson, deposited at the Evandro Chagas Institute (IEC) in Belém, Brazil.

RESULTS

Haemoparasite infections were detected in 220 (66%) out of 330 lizards of 12 species distributed among seven families (Table II). Mixed infections occurred in 91 positive specimens. For sampling sites, BDFFP had 78% ($n = 156/200$) of the infected lizards, UFAM Experimental Farm had 68% ($n = 13/19$), Agrovila Rio Pardo had 47% ($n = 50/105$) and UFAM urban forest fragment had 16% ($n = 1/6$). Parasites were grouped into four major groups (Figure 2), with the following prevalence: (i) intracellular apicomplexan parasites at 173 (52%) individuals; (ii) trypanosomatids at 84 (25%); (iii) microfilarial worms at 38 (11%); (iv) unidentified viral or bacterial inclusions at 30 (9%).

Among the positive lizards, Tropiduridae and Teiidae were the families that showed the highest prevalence, with 86% ($n = 112/130$) and 66% ($n = 90/135$) positive animals, respectively. With regards to lizard species, *Uranoscodon superciliosus* Linnaeus, 1758 stood out for presenting a high prevalence, with 87% ($n = 103/118$) of infected individuals, and also because it was the species with the greatest diversity of parasites, with the occurrence of six different taxa: Haemohormidiidae, Plasmodiidae, Garniidae, Trypanosomatidae, microfilarial worms and unidentified inclusions.

Parasites of phylum Apicomplexa (Table III) were found in all infected lizard species; 14 species from five families were identified. Two morphotypes of the genus *Hepatozoon* (Hepatozoidae) were observed in 40 *Ameiva ameiva* Linnaeus, 1758 (55%; $n = 72$) and one was identified as *Hepatozoon ameivae* Carini & Rudolph, 1912 (Figure 2a). *H. ameivae* was recorded overlapping the nucleus of the parasitised cells, whereas the other morphotype caused lateral displacement of the nucleus to one end of the red blood cell (Figure 2b). Both parasites were restricted to erythrocytes. *Sauroplasma*-like (Haemohormidiidae) infections (Figure 2c) appeared in 14% ($n = 49/330$) of individuals from six lizard species (Table III). Notably, *U.*

superciliosus had the highest number of parasite occurrences, with 32 (27%; n = 118) positive specimens.

Haemosporidian parasites presented the highest prevalence, with 35% (n = 118/330) animals infected and, except for *Alopoglossus angulatus* Linnaeus, 1758, all positive host species were parasitised by malaria. Based on blood stage morphology, 13 species from two families, Plasmodiidae and Garniidae, were identified (Table III; Figure 2d-j). It is important to note that despite some authors (e.g., Levine 1988, Telford 2009), here we recognise the family Garniidae as well as the genera *Garnia* and *Fallisia* as valid taxa diagnosed by absence of pigment and ultrastructural characteristics (Lainson et al. 1971, Boulard et al. 1987).

Plasmodium spp. (Figure 2d-g) were detected in 64 (19%; n = 330) lizards from nine species, with the highest number of positive specimens seen in *A. ameiva* (36%; n = 72). At least 11 morphotypes were visualised, and five *Plasmodium* species could be recognised (Table III). Gametocytes of *Sauvageozoon* cf. *tupinambis* Lainson & Shaw, 1969b were observed in leucocytes (Figure 2h) from five (20%; n = 25) *Tubinambis teguixin* Linnaeus, 1758. Non-pigmented malaria parasites from the genera *Fallisia* (Figure 2i) and *Garnia* (Figure 2j) were found in four (1%; n = 330) and 46 (14%; n = 330) lizards, respectively (Table III). Two *Fallisia* species were detected in *Plica umbra* Linnaeus, 1758, *Fallisia* cf. *simplex* Lainson et al., 1975 and *Fallisia* cf. *audaciosa* Lainson et al., 1975. In *Neusticurus bicarinatus* Linnaeus, 1758, we found *Fallisia* cf. *effusa* Lainson et al., 1974a. Parasites of the genus *Garnia* were mainly recorded in *U. superciliosus* (22%; n = 118). We also detected four unidentified morphotypes and four species of this genus (Table III).

Extracellular parasites of the family Trypanosomatidae (Table II) were found in 83 *U. superciliosus* (70%; n = 118) and one *P. umbra* (8%; n = 12): each tropidurid species had one *Trypanosoma* morphotype. The trypanosome of *U. superciliosus* had an elongated body and diffuse nucleus (Figure 2k), while the observed *P. umbra* had a rounded shape and compact

nucleus (Figure 2l). Microfilarial worms (Nematoda) occurred in five lizard species (Table II), with higher prevalence in *A. ameiva* with 37% ($n = 27/72$) positive specimens. These blood parasites exhibited highly variable sizes and shapes (Figure 2m-n) and were very similar to the genus *Piratuba*. However, accurate diagnoses of filarial worms is mainly based on morphological features of adult worms. Thus, identification of this group in the present study remains indeterminate.

The last of the four major groups, inclusions of uncertain nature (Figure 2o-p), were detected in erythrocytes of five lizard species and showed little morphological variation. They consisted of a large spherical shape with a rarely darker stained margin. These vacuoles resemble rickettsial parasites recorded for other reptilian hosts, although without ultrastructural study it was not possible to confirm this identification.

DISCUSSION

We observed a high prevalence of blood parasites among lizards from Central Amazonia: More than half of the sampled individuals and species were infected. We also demonstrated that lizards are the hosts for a wide variety of haemoparasites. Indeed, we observed great parasite richness in a small number of host species and in a limited sampling area. This finding reinforces that the neotropical region holds a rich haemoparasite fauna, as shown by studies conducted in other localities across the Amazon Basin (Renjifo et al. 1952, Telford 1970, 1973, 1980, Ayala et al. 1973, Lainson 1992, Thoisy et al. 2000, Matta et al. 2018). Furthermore, it is important to note that we sampled lizard species with diversified microhabitat use, ranging from terrestrial (e.g., *A. ameiva*), semi-aquatic (e.g., *Neusticurus bicarinatus*), scansorial (e.g., *P. umbra*) to arboreal (e.g., *U. superciliosus*) (Vitt et al. 2008). This environmental diversity may imply determinant characteristics for the composition of the haemoparasite assemblages found