

**Lyslaine Hatsue Sato**

**Diversidade, biologia, filogeografia e  
taxonomia molecular de tripanossomas de anuros  
da família Leptodactylidae**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2015

**Lyslaine Hatsue Sato**

**Diversidade, biologia, filogeografia e  
taxonomia molecular de tripanossomas de anuros  
da família Leptodactylidae**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sato, Lyslaine Hatsue.

Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomas de anuros da família Leptodactylidae / Lyslaine Hatsue Sato. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Taxonomia, diversidade e evolução dos tripanossomatídeos do homem, de animais domésticos e silvestres e de plantas.

Versão do título para o inglês: Diversity, biology, philogeography and molecular taxonomy of trypanosomes of frogs in the Leptodactylidae family.

1. Hemoprotzoários 2. Tripanossoma 3. Anuro 4. Anfíbios 5. Taxonomia molecular 6. Filogeografia I. Teixeira, Profa. Dra. Marta Maria Geraldes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidato(a): **Lyslaine Hatsue Sato**

Titulo da Tese: Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomas de anuros da família Leptodactylidae

Orientador(a): **Professora Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a..... /..... /....., considerou a candidata:

Aprovada

Reprovada

Examinador(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....

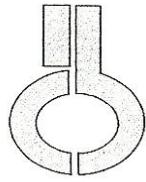
Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil  
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **173** nas fls. **138** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marta Maria Geraldes Teixeira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomas de anuros da família Leptodactylidae*" do qual participam o(s) aluno(s), **Lyslaine Hatsue Sato** e o pesquisador **Erney Felicio Plessmann de Camargo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30.10.2012**, com validade de **4** anos.

São Paulo, 31 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira pela oportunidade e confiança a mim concedida para a realização deste trabalho, orientação, ensinamentos e exemplos de profissionalismo.

Ao Professor Dr. Erney F. Plessmann de Camargo pelo exemplo de profissionalismo, apoio e as valiosas contribuições a este estudo.

À Professora Dra. Silvia Celina Alfieri pela contribuição na correção desta dissertação, exemplo de profissionalismo e ensinamentos.

Ao Dr. Robson Cavalcanti Ferreira pela amizade, ensinamentos, colaboração, paciência e fundamental acompanhamento durante a realização de todo este trabalho.

À Marta Campaner pelos ensinamentos e importante trabalho e dedicação no isolamento e manutenção dos parasitas utilizados neste estudo.

À Carmen Takata pelos ensinamentos, paciência, dedicação e colaboração para este trabalho.

À Tania Elisa Matsumoto pelos ensinamentos e colaboração.

Ao Professor Dr. Miguel Trefault Rodrigues pela colaboração na identificação dos anuros e com amostras de tecidos para este estudo.

Ao Professor Dr. Reinaldo José da Silva pela contribuição com amostras de tecidos de leptodactilídeos.

Ao Professor Dr. Antônio Francisco Malheiros pelos ensinamentos e grandioso incentivo e apoio durante esta jornada.

À Andernice pela colaboração durante as coletas de anuros na cidade de Cáceres – MT.

As Dras. Luciana e a Paola e as doutorandas Carla e Oneida pela grandiosa colaboração na confecção final deste trabalho.

Aos amigos do laboratório André, Bruno, Herakles, Juliana, Omar, Tarcilla e Zuleima pela amizade, risadas e grandes colaborações para este trabalho.

Aos amigos e funcionários do departamento pelo companheirismo e incentivo ao longo desses anos.

A minha abençoada família, mãe, pai, irmãos e avó pelo amor, carinho, compreensão e grandioso incentivo.

*“A satisfação está no esforço e não apenas na realização final.”.*

*Mahatma Gandhi*

*“Eu tentei 99 vezes e falhei. Mas na centésima tentativa eu consegui. Nunca desista de seus objetivos, mesmo que eles pareçam impossíveis. A próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”*

*Albert Einstein*

Este trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

Sato LH. Diversidade, biologia, filogeografia e taxonomia molecular de tripanossomas de anuros da família Leptodactylidae [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Os tripanossomas são hemoparasitas, transmitidos por sanguessugas e dipteros, conhecidos por infectarem anuros de diversas famílias em todo lugar do mundo onde esses animais foram examinados. Quase todo o conhecimento sobre a diversidade desses tripanossomas se restringe a morfologia de formas sanguíneas. Estudos moleculares que permitam uma avaliação real da riqueza de espécies ainda são escassos. Estudos filogenéticos prévios de uma pequena amostra revelaram grande diversidade genética e relações filogenéticas complexas entre os tripanossomas de anuros, mostrando que tripanossomas de bufonídeos ou de hilídeos se agruparam em clados específicos enquanto tripanosomas de leptodactilídeos se dispersaram em vários clados.

A fim de avaliar a riqueza de espécies de tripanossomas e seus padrões ecológicos e biogeográficos, pesquisas foram realizadas em amostras de sangue de leptodactilídeos capturados nos biomas brasileiros da Amazônia (AM), Pantanal (PA), Mata Atlântica (MA), Cerrado (CE) e Caatinga (CA), e em amostras da Venezuela (VEN) e Colômbia (COL). Amostras de tecidos arquivadas também foram examinadas. Sequências dos genes V7V8 SSU rRNA e gGAPDH foram empregadas em análises de barcoding e em inferências filogenéticas.

Os resultados deste estudo corroboraram a complexidade e a monofilia dos tripanossomas de anuros e apoiaram a existência de pelo menos seis clados de tripanossomas (An01-An06) e, juntamente com a análise biogeográfica, sugeriram algumas associações entre clados, famílias dos hospedeiros e biomas. O clado An01 é um conjunto pouco resolvido de tripanossomas de leptodactilídeos e hilídeos de todos os biomas brasileiros investigados. Os clados An01 e An03 compreendem tripanossomas de leptodactilídeos e hilídeos ou bufonídeos. Os clados An02, An05 (exceto *T. chattoni*) e An06 (com apenas um isolado de bufonídeo) são formados quase que exclusivamente por tripanossomas de leptodactilídeos. O clado An04 contém tripanossomas de ranídeos e bufonídeos exóticos e nenhum tripanossoma brasileiro. O clado An03 contém apenas amostras da AM, o An02, amostras do PA, CA e MA mas não da AM. O clado An06 é formado, em sua maioria, por tripanossomas do PA com algumas amostras da AM e da Venezuela.

Análises filogenéticas e padrões biogeográficos de tripanossomas de leptodactilídeos sugerem uma história evolutiva moldada pela evolução dos biomas e das bacias hidrográficas da América do Sul e, provavelmente, por “host-switchings” mediados por vetores de tripanossomas entre leptodactilídeos

e, esporadicamente, entre leptodactilídeos, hilídeos ou bufonídeos. Múltiplas linhas de evidência geradas por análises filogenéticas, biogeográficas e morfológicas permitiram identificar linhagens evolutivas independentes, candidatas a novas espécies. Pelo menos 12 novas espécies de tripanossomas caracterizados nesse trabalho (sete com dados morfológicos) puderam ser identificados entre as 48 culturas obtidas. Portanto, esse estudo aumenta ( $>100\%$ ) o número de espécies conhecidas em anuros e contribui com novas e relevantes informações para o entendimento das histórias evolutivas dos tripanossomas de anuros e de seus hospedeiros nos diferentes biomas brasileiros

**Palavras-chave:** Hemoprotzoários, *Trypanosoma*, Anura, anfíbios, rãs, Neotrópico, morfologia, filogeografia, biogeografia, taxonomia molecular.

## ABSTRACT

Sato LH. Diversity, biology, phylogeography and molecular taxonomy of trypanosomes of frogs in the Leptodactylidae family [Dissertation (Masters Thesis in Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Trypanosomes are haemoparasites reported to infect anurans of many families anywhere these animals have been examined, and transmitted by leeches and dipterans. Almost all data about the diversity of these trypanosomes are restricted to morphology of blood trypanosomes. Molecular studies for a real appraisal of species richness are still scarce. Previous phylogenetic studies of a small sample revealed great genetic diversity and complex relationships among anuran trypanosomes, showing that trypanosomes from bufonids or hylids clustered in specific clades while leptodactylid trypanosomes dispersed through various clades.

To assess the trypanosome species richness and corresponding ecological and biogeographical patterns, surveys were carried out in blood samples from leptodactylids captured in the Brazilian biomes of Amazonia (AM), Pantanal (PA), Atlantic Forest (AF), Cerrado (CE) and Caatinga (CA), plus some places in Venezuela (VEN) and Colombia (COL). Archived tissue samples were also examined. Sequences from V7V8 SSU rRNA and gGAPDH genes were employed for barcoding and phylogenetic inferences.

This study corroborated the monophyly and high complexity of anuran trypanosomes and supported the existence of at least six major trypanosome clades (An01-An06) and together with biogeographical analysis suggested some links between clades and host families and biomes. The clade An01 is an unresolved assemblage of trypanosomes from leptodactylids and hylids from all Brazilian biomes investigated. Clades An01 and An03 comprise trypanosomes of leptodactylids and hylids or bufonids. Clades An02, An05 (except for the North American *T. chattoni* from a ranid) and An06 (one bufonid isolate) harbored almost exclusively leptodactylid trypanosomes. Clade An04 was composed by African, European and North American trypanosomes from ranids and bufonids, and did not include Brazilian trypanosomes. The clade An03 was restricted to AM, An02 comprised trypanosomes from PA, CA and AF, but no trypanosome from AM. The clade An06 was formed mostly by samples from PA and a few samples from AM and Venezuela.

Phylogenetic analysis and biogeographical patterns of leptodactylid trypanosomes suggest an evolutionary history shaped by South American historical landscapes and by vector-mediated host switching among leptodactylids and, sporadically, between these frogs and hylids or bufonids. Phylogeographical analyses suggest that host family and species, biome and hydrographic basin may

all be determinants of the clade structure of anuran trypanosomes. Integrative approaches that combine multiple lines of evidence from phylogenetic, biogeographical and morphological analyses allowed identifying evolutionary independent lineages candidate for new trypanosomes species. Up to 12 candidate new species could be identified among 48 cultures of leptodactylid trypanosomes and seven were morphological characterized in this work. Therefore, results significantly increase the number of known species of anuran trypanosomes and provide new insights on the connected evolutionary histories of anuran trypanosomes and their hosts.

**Keywords:** Hemoprotozoans, *Trypanosoma*, Anura, amphibians, frogs, Neotropics, morphology, phylogeny, biogeography, molecular taxonomy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estágios morfológicos de tripanossomas encontrados no sangue de anuros (Ferreira et al., 2007).	21
<b>Figura 2.</b> Relacionamento filogenético entre os clados do gênero <i>Trypanosoma</i> (Viola et al., 2009)	24
<b>Figura 3.</b> Relacionamento filogenético entre tripanossomas de anuros Ferreira et al., (2008).	27
<b>Figura 4.</b> Fotos de leptodactilídeos pertencentes ao gênero <i>Leptodactylus</i> realizadas durante este estudo	31
<b>Figura 5.</b> Filogenia da família Leptodactylidae (Fouquet et al., 2013).	32
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos.	38
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática dos genes GAPDH.	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Amostras de sangue de leptodactilídeos utilizadas neste estudo.	43
<b>Tabela 2.</b> Amostras de fígado de leptodactilídeos utilizadas neste estudo	44
<b>Tabela 3.</b> Tripanossomas isolados de leptodactilídeos utilizados neste estudo	46
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos e ciclos de amplificação e temperatura utilizados nas diferentes reações de PCR.	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAB	Meio agar sangue (“Blood Agar Base”)
BSA	Albumina bovina sérica
BSC	Blood Sample Collection
dATP	Desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	Desoxicitosina-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-trifosfato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxitimidina-trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
gGAPDH	Gliceraleído 3-fosfato desidrogenase glicossomal
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Molar
mg	Miligrama
MH	Microhematócrito
min	Minutos
ML	Máxima Verossimilhança
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N2	Nitrogênio líquido
P	Parcimônia
PBS	Salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
Sarkosil	Lauril sarcosinato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Solução salina Tris-EDTA
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão Tris acetato-EDTA
TCC	Trypanosomatid Culture Collection
TE	Tampão tris-EDTA
TSC	Tissue Sample Collection
UV	Luz ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
1.1 A família Trypanosomatidae	18
1.2 O gênero <i>Trypanosoma</i>	19
<b>1.2.1 Clado aquático</b>	23
<b>1.2.2 Tripanossomas de anuros</b>	25
<b>1.2.3 Filogenia dos tripanossomas de anuros</b>	26
1.3 Hospedeiros vertebrados	28
<b>1.3.1 A Família Leptodactylidae</b>	30
<b>1.3.2 Ciclo biológico de tripanossomas de anuros</b>	33
<b>1.3.3 Hospedeiros invertebrados</b>	34
1.4 Parâmetros taxonômicos utilizados na taxonomia e caracterização de tripanossoma	35
<b>1.4.1 Morfologia</b>	35
<b>1.4.2 Hospedeiro e origem geográfica</b>	36
<b>1.4.3 Características biológicas</b>	37
<b>1.4.4 Genes ribossômicos</b>	37
<b>1.4.5 Gene de Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH)</b>	39
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	42
3.1 Captura de anuros	42
<b>3.1.1 Áreas de captura de anuros</b>	42
3.2 Isolamento e cultivo dos tripanossomas	42
3.3 Culturas de tripanossomas de espécies das famílias Leptodactylidae	43
3.4 Manutenção dos tripanossomatídeos	45
3.5 Caracterização morfológica	45
<b>3.5.1 Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura</b>	47
3.6 Extração de DNA dos parasitas	47
3.7 Ampificação de DNA por PCR e nested PCR e eletroforese em gel de agarose	47
3.8 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, clonagem e sequenciamento dos produtos purificados	49
3.9 Alinhamento das sequências obtidas e análises filogenéticas	49
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51

4.1 Filogeografia e riqueza de espécies de tripanossomas de rãs de Leptodactylidae da América do Sul 51  
REFERÊNCIAS 53

**APÊNDICE - Phylogeography and species richness of trypanosomes from South American frogs  
of Leptodactylidae** (artigo em elaboração). 63

## PREFÁCIO

“Esta Dissertação foi elaborada de acordo com as normas da CPG / ICB relativas a outras formas de elaboração de dissertação de Mestrado que permite a inclusão, como Anexos, de resultados já publicados ou submetidos em periódicos internacionais indexados em língua inglesa. Permite ainda que detalhes metodológicos e resultados obtidos sejam aqueles contidos nos artigos anexados ao corpo da dissertação”.

Artigo que compõe o corpo da dissertação:

**APÊNDICE** - Phylogeography and species richness of trypanosomes from South American frogs of Leptodactylidae (artigo em elaboração).

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos são protozoários uniflagelados pertencentes à classe Kinetoplastea, filo Euglenozoa (Busse, Preisfeld, 2002a,b; Cavalier-Smith, 1998, 2004; Moreira et al., 2001; Preisfeld et al., 2001). Os cinetoplastídeos são caracterizados pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria, constituída por moléculas concatenadas de DNA circular, localizada na base flagelar (Vickerman, 1976). A família Trypanosomatidae alberga a maior parte da diversidade dos cinetoplastídeos conhecidos (Moreira et al., 2004, Simpson et al., 2006; Vickerman, 1976), compreendendo 14 gêneros, definidos de acordo com a utilização de parâmetros clássicos (morfologia, hospedeiro de origem e ciclo de vida) e filogenéticos (monofilia e suporte): (a) *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma* possuem parasitas com ciclos de vida heteroxênicos no qual participam hospedeiros invertebrados e vertebrados ou vegetais (Jankevicius et al., 1988; Leonard et al., 2011; Lukes et al., 2014; Maslov et al., 2013; Porcel et al., 2014); (b) *Paratrypanosoma*, *Blechomonas*, *Critidinia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Angomonas* incluem parasitas monoxênicos, possuindo assim apenas um tipo de hospedeiro (invertebrado) em seus ciclos biológicos (Borghesan et al.; 2013; Lukes et al.; 2014; Maslov et al.; 2013; Merzlyac et al., 2001; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Vickerman, 1976; Votýpka et al., 2013).

Os tripanossomatídeos possuem uma ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros, infectam animais invertebrados, vertebrados de praticamente todas as ordens e plantas (Lukes et al, 2014; Maslov et al., 2013; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1976). Os primeiros estudos evolutivos baseados em sequências dos genes de RNA ribossômico (rRNA) sugerem que os membros da classe Kinetoplastea estão entre os eucariontes mais antigos que provavelmente divergiram muito antes do aparecimento dos animais, plantas e até mesmo dos fungos (Fernandes et al., 1993). Estudos recentes, baseados em análises combinadas de diversos genes (ribossômicos e codificantes) não corroboram essa hipótese e apresentam os cinetoplastídeos como um grupo derivado dentro da irradiação dos eucariontes (Katz et al., 2012; Parfrey et al., 2011).

Os organismos da classe Kinetoplastea apresentam diversas peculiaridades de grande interesse filogenético e evolutivo, tais como variação antigênica de glicoproteínas de superfície, proteína de membrana ancorada por GPI, endocitose e exocitose de macromoléculas via bolso flagelar, um nucleotídeo não usual denominado base J em seu DNA nuclear, ausência de condensação cromossônica durante a mitose, edição de RNA mitocondrial, arquitetura única do DNA mitocondrial,

*trans-splicing* de todos os RNA mensageiros, transcrição eucariótica policistrônica, compartimentalização das enzimas glicolíticas nos glicossomas etc (Donelson et al., 1999; Simpson et al., 2006).

Estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares procuram entender os eventos evolutivos importantes da história dos tripanossomatídeos, como a origem do parasitismo e o modo de vida heteroxênico. Esses estudos têm corroborado a hipótese de um bodonídeo aquático de vida livre ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao *habitat* intestinal, assim originando os tripanossomatídeos monoxênicos de insetos. Com o surgimento da hematofagia nos insetos, esses parasitas podem ter sido inoculados em vertebrados e aqueles que se adaptaram ao parasitismo no sangue passaram a circular entre insetos hematófagos e vertebrados (Hamilton et al., 2007). Insetos hematófagos existentes há milhões de anos (Cretáceo - Jurássico), como os ceratopogonídeos e os flebotomíneos, podem ter participado desse processo (Poinar, 2004, 2008).

Os estudos sobre tripanossomatídeos estão concentrados principalmente nos organismos responsáveis por patologias de grande importância médica humana e veterinária, pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, e *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono) e *Leishmania* (leishmanioses tegumentares e viscerais). A maioria dos tripanossomas não é patogênica para o homem o que tem limitado o conhecimento sobre a diversidade desses organismos. Recentemente, estudos abrangendo características biológicas, celulares, bioquímicas e moleculares de um grande número de flagelados do filo Euglenozoa estão sendo realizados a fim de validar, ou não, as novas propostas de classificação dos cinetoplastídeos, inclusive de alguns gêneros de tripanossomatídeos e subgêneros de *Trypanosoma* bastante controversos (Hamilton et al., 2007; Hughes, Piontkivska, 2003b; Lukes et al., 1997; Moreira et al., 2004; Stevens et al., 2001).

## 1.2 O gênero *Trypanosoma*

Ao observar um hemoflagelado de rã, Gruby (1843) o denominou, a princípio, de *Trypanosoma sanguinis*; entretanto, por apresentar estrutura similar a *Amoeba rotatoria*, um parasita descrito meses antes por Mayer (1843), *T. sanguinis* foi reclassificado como *Trypanosoma rotatorium*, que é a espécie tipo do gênero (Bardsley, Harmsen, 1973).

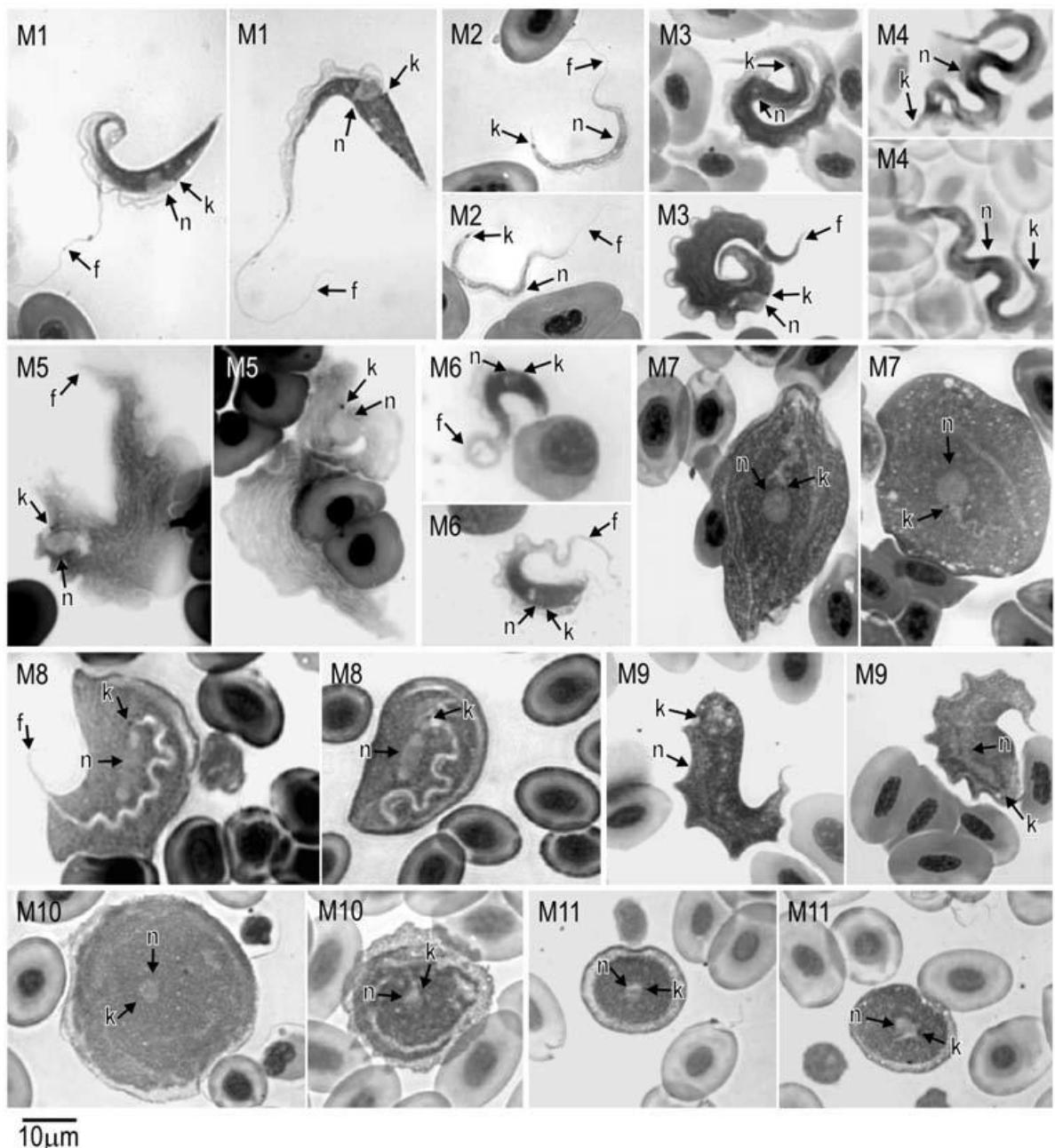
As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitam hospedeiros vertebrados de todas as classes (mamíferos, peixes, anfíbios, répteis e aves), são heteroxênicos com ciclos de vida que alternam entre invertebrados e vertebrados, sendo que a maioria das espécies desenvolve-se em artrópodes hematófagos pertencentes a diversas ordens e famílias. Em geral, os tripanossomas de mamíferos são

transmitidos por moscas, hemípteros e pulgas, enquanto que os de aves podem ser veiculados por uma variedade de artrópodes.

Dentre os tripanossomas pertencentes ao Clado Aquático, cujos hospedeiros vertebrados possuem hábito aquático (anfíbios, peixes e jacarés), flebotomíneos, culícideos e sanguessugas figuram entre os vetores já descritos (Ferreira et al., 2007; Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Molineux, 1977; Stevens et al., 2001). Estudos baseados na caracterização molecular e no posicionamento em diagramas filogenéticos de tripanossomas de sanguessugas terrestres sugerem que esses hospedeiros invertebrados podem albergar tripanossomas de outros clados, não relacionados ao Clado Aquático (Hamilton et al., 2005).

Os tripanossomas são pleomórficos e apresentam diferenças no tamanho e formato do corpo (Figura 1), posição do núcleo e do cinetoplasto e no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo. As formas que estes protozoários assumem durante o seu ciclo de vida são classificadas em amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota, definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, presença ou ausência de flagelo livre e membrana ondulante. As formas tripomastigotas são encontradas nos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) e invertebrados (tripomastigotas metacíclicos), enquanto que as demais são espécies-dependentes e ocorrem nos vertebrados (amastigotas intracelulares) e invertebrados (promastigotas e epimastigotas) (Hoare, 1972).

Os tripanossomas de mamíferos são classificados nas Secções Stercoraria ou Salivaria, de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado. Os tripanossomas da Secção Salivaria (trianossomas africanos) são transmitidos pela mosca tsétsé por inoculação de formas metacíclicas presentes nas glândulas salivares, onde o ciclo do parasita se completa; *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi* são exceções, pois sua transmissão ocorre apenas mecanicamente. No hospedeiro vertebrado, os parasitas multiplicam-se sob a forma tripomastigota. Diferindo dos tripanossomas da Secção Salivaria, os da Secção Stercoraria desenvolvem-se na parte posterior do intestino do hospedeiro invertebrado, determinando a eliminação das formas metacíclicas com as fezes do hospedeiro invertebrado e, portanto, a transmissão contaminativa por meio de solução de continuidade com a pele. Nos hospedeiros vertebrados, a multiplicação dos flagelados varia conforme a espécie, podendo ocorrer sob a forma amastigota, epimastigota, promastigota ou tripomastigota (Hoare, 1972).



**Figura 1.** Estágios morfológicos de tripanossomas encontrados no sangue de anuros

Microfotografias selecionadas para ilustrar a diversidade morfológica de tripanossomas encontrados em esfregaços de sangue (coloração Giemsa) de anuros brasileiros, que são distribuídos em dois grandes grupos (I e II) e compreende 11 tipos morfológicos (M1-M11): Grupo I, tripomastigotas alongadas com extremidades pontiagudas observadas em Bufonidae (M1, M2, M3, M5 e M6), Leiuperidae (M3) e Leptodactylidae (M2, M3, M4), e do grupo II, os tripanossomas em forma de folhas, arredondadas ou elípticas encontrados principalmente em Hylidae (M7, M8, M9, M10) e Leptodactylidae (M8, M9, M10). Morfotipos associados às espécies previamente descritas de tripanossomas de anuros são: M1 (*T. bocagei-like*); M3 (*T. leptodactyl-like*); M5 (*T. fallisi-like*); M7 (*T. loricatum-like*); M8 (*T. rotatorium-like*), M10 (*T. chattoni-like*); e M11 (*T. tsunezumiya-like*). k, Cinetoplasto; f, flagelo; N, núcleo. **Adaptado:** Ferreira et al., (2007).

Os tripanossomas de anfíbios, répteis, aves e peixes não possuem parâmetros morfológicos definidos que permitam uma classificação confiável. Estes parasitas têm sido classificados arbitrariamente como espécies novas ou antigas com base em critérios tradicionais, como hospedeiro

de origem e/ou a origem geográfica. Ao longo do tempo, esta conduta gerou dezenas de espécies descritas sem critérios confiáveis e estudos comparativos.

Doflein (1901) propôs uma classificação para os tripanossomas que subdividia o gênero em três subgêneros: *Trypanomonas*, *Herpetosoma* e *Trypanosoma*, este último contendo o isolado de anuro *T. rotatorium*, a espécie tipo do gênero *Trypanosoma*. Esta classificação foi, contudo, abandonada posteriormente. Na última revisão do gênero *Trypanosoma*, foi proposta uma classificação restrita aos tripanossomas de mamíferos, que os agrupa em 8 subgêneros, um dos quais, o subgênero *Megatrypanum*, apresenta afinidades morfológicas com tripanossomas de anfíbios e répteis (Hoare, 1964, 1972).

Os critérios tradicionais para a classificação dos tripanossomas são a morfologia e/ou a combinação de dados como: hospedeiro(s) vertebrado e invertebrado, distribuição geográfica, morfologia, ciclo de vida, patologia, características bioquímicas e fisiológicas (Bardsley, Harmsen, 1973). Porém, esses critérios têm se mostrado insuficientes, ou mesmo incongruentes, com os padrões hierárquicos obtidos por inferências filogenéticas baseadas em caracteres moleculares (Ferreira et al., 2007, 2008; Garcia et al., 2011 a, b; Hamilton et al., 2004, 2005, 2007, 2009; Lima et al., 2012; Maia da Silva et al. 2004 a, b; Rodrigues et al. 2006; Stevens et al. 2001; Stevens, Gibson, 1999; Viola et al., 2008, 2009a,b).

Estudos iniciais baseados em sequências dos genes de SSU rRNA sugeriram a polifilia do gênero *Trypanosoma* (Maslov et al., 1996). Inferências filogenéticas de um maior número de espécies baseadas em sequências independentes e combinadas dos genes SSU rRNA e gGAPDH demonstraram a monofilia do gênero *Trypanosoma* e que as inúmeras espécies a ele pertencentes provavelmente compartilham um ancestral comum e exclusivo (Lukes et al., 2002, 2005, 2014; Stevens et al., 1998, 1999, 2001). Essas análises reforçam a hipótese de uma origem comum para todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes e sugerem a existência de duas grandes irradiações no gênero: a dos tripanossomas do Clado Aquático (hospedeiros vertebrados de hábito aquático) e outra que alberga todos os demais tripanossomas (Hamilton et al., 2004; 2005; 2007; Lukes et al., 2002; Simpson et al., 2002; Stevens et al., 2001).

Análises filogenéticas baseadas em diversos genes sugeriram a existência de três grandes clados dentro do gênero *Trypanosoma*: clado *Trypanosoma brucei*, clado *Trypanosoma cruzi* e o clado Aquático (Hamilton et al., 2004, 2007; Stevens et al., 1999a,b, 2001). Em estudos posteriores com a inclusão de mais táxons foi possível identificar novos agrupamentos de tripanossomas, revelando a existência de novos grupos, a saber:

**Clado *T. brucei*:** neste clado foram posicionados todos os tripanossomas de origem africana que infectam mamíferos, incluindo o homem. As espécies deste clado divergem bastante das demais

espécies de tripanossomas, sugerindo uma história evolutiva distinta, confinada à África e associada com moscas tsetsé (Stevens et al., 1999; 2001)

**Clado *T.cruzi*:** constituído por espécies pertencentes ao subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi* e tripanossomas exclusivos de morcegos) e um tripanossoma isolado de canguru da Austrália (Maia et al., 2004 a, b, 2007).

**Clado Aquático:** formado predominantemente por tripanossomas de anuros, peixes e outros vertebrados aquáticos, incluindo um isolado de ornitorrinco e um isolado de tartaruga e isolados de anuros e peixes (Ferreira et al., 2007).

**Clado *T. theileri*:** agrupa tripanossomas isolados de mamíferos da ordem Artiodactyla e que apresentam significativa especificidade pelo hospedeiro vertebrado. Esse grupo está distribuído por todo o mundo e acredita-se que tabanídeos sejam os principais vetores (Rodrigues et al., 2006).

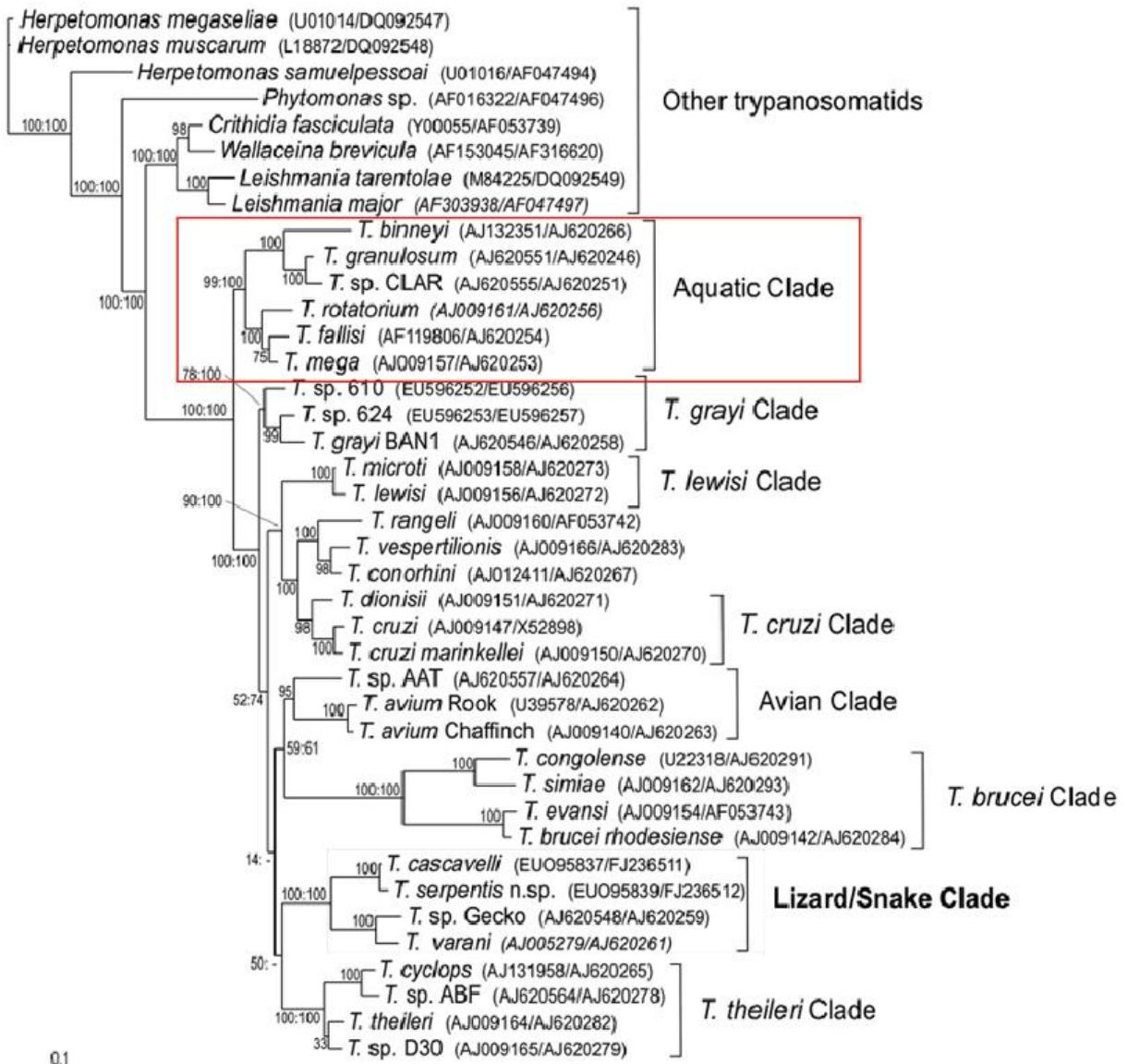
**Clado *T. lewisi*:** compreende tripanossomas que parasitam as ordens Rodentia, Lagomorpha e Insetívora. Os organismos desse grupo são transmitidos por pulgas e apresentam especificidade pelo hospedeiro vertebrado (Hamilton et al., 2005).

**Clado *T. cyclops*:** composto por um isolado de macaco da Malásia (*T. cyclops*), um de *Wallabia bicolor* da Austrália, um isolado enigmático de anuro e diversos isolados de sanguessugas da família Haemadipsidae. A presença de isolados de sanguessugas nesse grupo sugere que estes sejam seus principais vetores (Hamilton et al., 2005).

**Clados *T. avium* e *T. corvi*:** formado por tripanossomas de aves e artrópodes de vários grupos, aparentemente, sem restrição a espécie do hospedeiro (Sehgal et al., 2001).

### 1.2.1 Clado aquático

Os tripanossomas pertencentes a este clado são de hospedeiros vertebrados aquáticos, principalmente anfíbios e peixes, alem de um isolado de ornitorrinco e um isolado de tartaruga (Stevens et al., 2001). Estudos recentes incluíram novos isolados de anuros em análises filogenéticas, sugerindo a subdivisão do clado Aquático em dois grupos, um deles formado principalmente por tripanossomas de peixes e outro por tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2007, 2008; Hamilton et al., 2005, 2007). Sanguessugas já foram descritas como vetores de tripanossomas de anuros, peixes, tartarugas e serpentes aquáticas (Ferreira et al., 2007, 2008; Hayes et al., 2014; Jakes et al., 2001; Stevens et al., 2001; Viola et al., 2009b). Algumas espécies de flebotomíneos e culicídeos também foram implicadas como hospedeiras de tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2007, 2008) (Figura 2).



**Figura 2.** Relacionamento filogenético entre os clados do gênero *Trypanosoma*.

Árvore filogenética baseada nas sequências concatenadas da subunidade menor (SSU) rRNA e glicosomal gliceraldeído-3-fosfato (gGAPDH) de 32 isolados de tripanossomas e usando os tripanossomatídeos não-tripanossomas como grupo externo. O alinhamento contendo 3.011 caracteres (incluindo Ln521,217.287404) *Trypanosoma cascavelli*, isolado TryCC 425, e *Trypanosoma serpentis* n. sp., isolado TryCC 1052, a partir de serpentes brasileiras, e tripanossomas representante dos clados dentro *Trypanosoma* foi empregado para análises de inferência filogenética a Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiana. Os números de acesso de seqüências no GenBank estão entre parênteses. Os valores individuais nos nós são valores de bootstrap ML. Vários valores de bootstrap nos principais nós seguem a ordem ML de bootstrap e valores derivados de 500 repetições apoio Bayesiana (probabilidade posterior). A escala de comprimento do ramo é o número de substituições por sítio. **Adaptado de Viola et al., (2009a).**

### 1.2.2 Tripanossomas de anuros

Cerca de 60 espécies de tripanossomas de anuros haviam sido descritas no mundo inteiro até 1973, data da última revisão deste grupo (Bardsley e Harmsen, 1973), contra apenas 26 espécies reconhecidas em uma detalhada revisão de Diamond, 1965. Muito provavelmente, a informação

conflitante se deve à descrição de espécies baseada apenas na análise morfológica das formas encontradas no sangue.

A classificação de tripanossomas de anuros baseada na morfologia gerou confusão e um número grande de espécies descritas, de forma que Bardsley e Harmsen (1973) propuseram a combinação de vários outros critérios para guiar a classificação destes tripanossomas: hospedeiro(s) vertebrado(s) de origem; hospedeiro(s) invertebrados(s) de origem; distribuição geográfica; morfologia e citologia; composição química (enzimas etc); fisiologia (requerimentos nutricionais, patologia etc); comportamento; padrão reprodutivo (ciclo de vida). Apesar do elevado número de espécies de tripanossomas de anuros descritas, poucos estudos foram realizados com o cultivo desses organismos. A maioria das descrições é oriunda da América do Norte (Canadá, Estados Unidos) e apenas um isolado africano e um europeu estão disponíveis em bancos de organismos (Clark et al., 1995). Cinco espécies de tripanossomas de anuros foram descritas no Brasil, quatro encontradas em anuros da família Leptodactylidae, em *Leptodactylus ocellatus*, e uma em Hylidae, *Scinax ruber* (Bardsley, Harmsen, 1973). Apesar do elevado número de espécies descritas, estas foram identificadas utilizando critérios tradicionais, morfológicos, e não foram cultivadas ou criopreservadas. Recentemente, um novo meio de cultivo foi utilizado para o cultivo de um tripanossoma de *L. ocellatus* (Lemos et al., 2013). Ainda hoje, estudos sobre a diversidade destes tripanossomas têm se baseado neste parâmetro (Desser, 2001; Leal et al., 2009; Lemos et al., 2008; Zickus, 2002).

Atualmente, das mais de 60 espécies de tripanossomas descritas em anuros (Bardsley, Harmsen, 1973), apenas 6 podem ser consideradas espécies válidas, baseado em critérios taxonômicos moleculares como padrão de isoenzimas (Martin et al., 1992), riboprinting (Clark et al., 1995), filogenia baseada no gene ribossômico (Haag et al., 1998; Stevens et al., 2001) e caracterização dos genes de mini-exon (Gibson et al., 2000). As demais espécies de tripanossomas descritas não foram isoladas em cultura ou foram perdidas, impossibilitando assim a validação das mesmas.

Estudos mais recentes (Ferreira et al., 2007, 2008), analisaram um grande número de tripanossomas isolados de anuros obtidos a partir de várias localidades e de diferentes biomas do Brasil. Foi observada uma grande diversidade genética entre esses isolados e o posicionamento desses organismos em diagramas filogenéticos na família Trypanosomatidae sugere que muitos desses tripanossomas representam novas espécies (Ferreira et al., 2007, 2008).

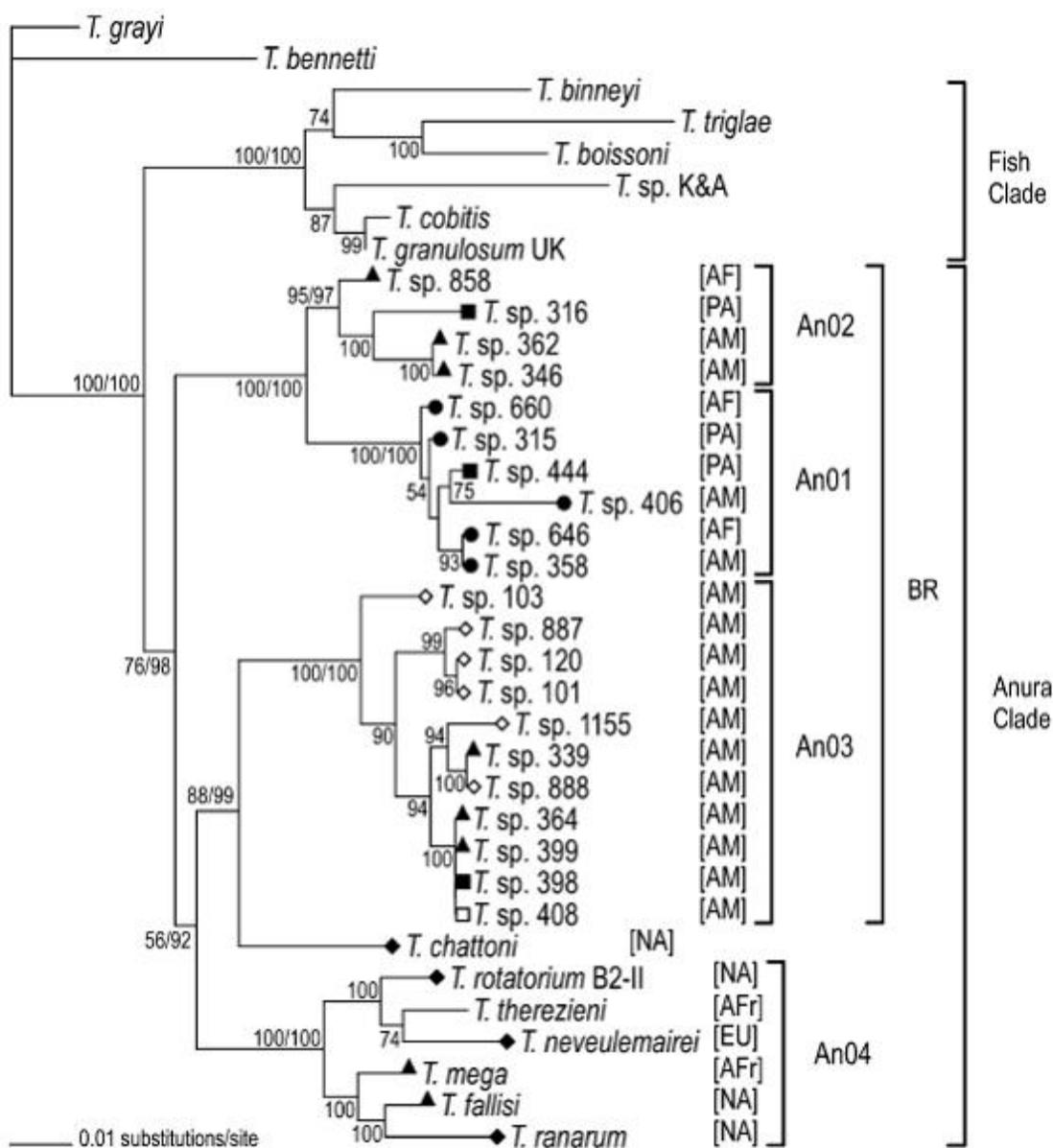
### **1.2.3 Filogenia dos tripanossomas de anuros**

Diferentes estudos filogenéticos indicaram posicionamentos distintos para os tripanossomas de anuros: o estudo de Maslov et al., (1996) incluiu apenas um tripanossoma de anuro, *T. rotatorium*, que

foi agrupado com três espécies de peixes, *T. boissoni*, *T. triglæ* e *T. carassi*, que se posicionaram como grupo irmão do clado formado por *T. cruzi* e *T. avium*. *T. brucei* se posicionou basal aos tripanossomatídeos, sugerindo a parafilia do gênero *Trypanosoma*. Essa análise mostrou, pela primeira vez, um grupo “aquático” formado por parasitas com hospedeiros de hábito aquático (peixes e anfíbios). Lukes et al., (1997) em um estudo que incluiu 11 tripanossomas, além de corroborar o grupo “Aquático”, observaram também um grupo formado apenas pelos tripanossomas da secção Salivaria. Este estudo sugeriu a monofilia do gênero *Trypanosoma*.

Stevens e Gibson, (1999) empregaram um maior número de tripanossomas em suas análises filogenéticas e mostraram uma maior complexidade no grupo Aquático que, por sua vez, apresentou duas irradiações: uma formada por isolados de anuros (*T. rotatorium* e *T. mega*) e um isolado de camaleão (*T. therezieni*) (Hamilton et al., 2004, 2005, 2007; Stevens et al., 2001) e outra que suporta a hipótese de coevolução destes tripanossomas com seus vetores aquáticos (sanguessugas), constituída por tripanossomas transmitidos por sanguessugas, incluindo isolados de peixes de água doce e salgada, de sanguessuga aquática (*Trypanosoma* sp K&A), de ornitorrinco (*Trypanosoma binneyi*) e de tartaruga (*Trypanosoma chelodina*). Martin et al., (2002) analisaram quatro novos tripanossomas de anuros (*T. ranarum*, *T. neveulemairei*, *T. chattoni* e *T. fallisi*). Alguns agruparam com *T. mega* e *T. rotatorium* e *T. chattoni* agrupou com isolados de peixes. Gibson et al., (2005) corroboraram esses agrupamentos no grupo Aquático, mostrando, porém, *T. chattoni* mais proximamente relacionado aos demais isolados de anuros do que com tripanossomas de peixes.

Ferreira et al., (2007, 2008) foram os primeiros a incluir tripanossomas de anuros brasileiros em análises filogenéticas. Nesses trabalhos observou-se grande diversidade entre os tripanossomas analisados, que se distribuíram em 3 grupos apresentando certa correlação com as famílias dos hospedeiros vertebrados: grupo An01, compreendendo isolados de hilídeos e os grupos An02 e An03, com isolados de bufonídeos. Entretanto, os tripanossomas de leptodactilídeos posicionaram-se nos três grupos descritos (An01, An02 e An03), sugerindo que os leptodactilídeos possam ter sido colonizados por tripanossomas de outras famílias de anuros em eventos recentes de troca de hospedeiros. Todos os tripanossomas de anuros analisados da Europa, América do Norte e África foram agrupados no clado An04 (*T. ranarum*, *T. neveulemairei*, *T. mega*, *T. rotatorium* e *T. fallisi*) junto com *T. therezieni*, isolados de camaleão de Madagascar. Apenas *T. chattoni* (isolado de ranídeo dos EUA) não se agrupou no clado An04, embora tenha se posicionado dentro do grupo de tripanossomas de anuros formando um clado monofilético (Ferreira et al., 2007, 2008) (Figura 3).



**Figura 3.** Relacionamento filogenético entre tripanossomas de anuros.

Árvore filogenética de tripanossomas de anuros, peixes e outros hospedeiros agrupados no clado aquático inferida por análise de Máxima Verossimilhança (ML) de sequências da SSU rRNA, foram incluídas no alinhamento (2390 caracteres, \_Ln59114.075939) tripanossomas do Brasil (BR), África (AFR), América do Norte (NA) e Europa (EU). Os isolados brasileiros incluídos na análise são da Mata Atlântica (AF), Pantanal (PA), e Amazônia (AM) de anuros das famílias Hylidae (●), Leptodactylidae (■), Bufonidae (▲), Leiuperidae (□) e Ranidae (◆) famílias. Os isolados de flebotomíneos (◇) são da Amazônia. Ferreira et al., (2008).

### 1.3 Hospedeiros vertebrados

Os anfíbios foram os primeiros vertebrados a conquistar o ambiente terrestre. Os primeiros tetrápodas conhecidos datam do final do Devoniano, há cerca de 400 milhões de anos. Os anfíbios são

importantes para estudos evolutivos dos tetrápodes e de outros vertebrados (Laurin et al., 2000; Pough et al., 2006).

A classe Amphibia (Lissamphibia) possui cerca de 6770 espécies e está dividida em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Gymnophiona (cecílias ou ápodes) e Caudata ou Urodela (salamandras e tritões) (Frost, 2014). O nome dado à linhagem Lissamphibia (Triássico recente), faz referência à textura do tegumento (Grego *liss* = liso), pois os anfíbios possuem pele nua, isto é, sem escamas, pêlos ou penas (Pough et al., 2006).

As três linhagens de anfíbios (salamandras, anuros e cecílias) possuem formas corporais e de locomoção diferentes. Os anuros possuem patas traseiras alongadas, corpo curto e inflexível e não se dobra quando caminham; já salamandras possuem patas dianteiras e traseiras de igual tamanho e movem-se por ondulações laterais. As cecílias são ápodes e empregam locomoção semelhante à das cobras. Apesar das diferenças entre as linhagens, todas são identificadas como uma linhagem evolutiva monofilética, sendo as cecílias basais ao grupo. Esses organismos compartilham importantes características, tais como tegumento permeável e úmido, glândulas mucosas responsáveis por mantê-los umedecidos e troca de parte substancial de oxigênio e dióxido de carbono com o ambiente através da pele; além disso, a evaporação da água do tegumento limita a atividade da maioria dos anfíbios a microambientes relativamente úmidos. Possuem também glândulas de veneno (granular) na pele que produzem substâncias tóxicas para afastar predadores; todos os anfíbios possuem uma área sensorial especial, a *papilla amphibiorum*, localizada na parede do saculo da orelha interna, sensível a frequências inferiores a 1.000 hertz, e uma segunda área sensorial, a *papilla basilaris*, que detecta frequências sonoras superiores a 1.000 Hz. Embora as orelhas sejam os receptores primários para som, sons de baixa frequência podem também ser percebidos através da vibração da parede lateral do corpo e dos pulmões e transmitidos para o interior da orelha (Frost et al., 2006; Pough et al., 2006; Vitt, Caldwell, 2014).

Os anfíbios estão dispersos por todos os continentes, exceto a Antártica (Pough et al., 2006), sendo comumente encontrados em regiões temperadas úmidas. Mais da metade da diversidade de anfíbios se concentra na região Neotropical, com aproximadamente 44% do total de espécies já descritas (Duellman, 1988).

Fatores climáticos como temperatura e umidade são importantes na vida dos anfíbios e podem limitar sua distribuição geográfica. Estes fatores, aliados às características fisiológicas e ecológicas, restringem a distribuição desses animais a locais mais úmidos, necessários à manutenção de sua homeostase e reprodução, refletindo assim nos microhabitats selecionados por diferentes espécies (Pough et al., 2006).

Os anfíbios possuem surpreendente variedade de especializações reprodutivas, de modos de reprodução e cuidado parental, havendo exemplos de espécies que carregam os ovos aderidos à superfície do corpo ou que carregam seus ovos em bolsas no tegumento do dorso ou flancos, nos sacos vocais ou mesmo no estômago; existem ainda espécies em que as fêmeas retêm os ovos nos ovidutos e dão à luz filhotes metamorfoseados. Quanto ao cuidado parental, há casos em que um dos pais permanece com os ovos e às vezes com os filhotes que estão saindo da casca, transporta os girinos do ninho até a água e, em algumas poucas espécies, até mesmo alimenta os girinos (Pough et al., 2006; Vitt, Caldwell, 2014).

Os anfíbios em fase adulta são carnívoros, alimentando-se de quase tudo que são capazes de capturar; é o tamanho da cabeça que determina o tamanho máximo da presa que pode ser capturada. Os anuros (grego *an* = sem, *uro* = cauda) são os anfíbios mais bem sucedidos e possuem uma variedade de modos de locomoção proporcionados por sua morfologia especializada. Esses animais podem saltar com movimentos simultâneos das pernas traseiras, nadar com movimentos simultâneos ou alternados das pernas e andar ou escalar com movimentos alternados das pernas (Pough et al., 2006). As vocalizações dos anuros são associadas ao comportamento reprodutivo; os sistemas de acasalamento são divididos em reprodução explosiva (estaçao reprodutiva muito curta, às vezes de apenas alguns dias) e em reprodução prolongada (estações reprodutivas que se estendem por vários meses). As espécies de anuros que se reproduzem na classificação “explosiva”, se acasalam em habitats aquáticos temporários, como lagoas ou poças formadas no deserto. Nesse caso, grande número de machos e fêmeas chegam aos sítios reprodutivos quase que simultaneamente. Nas espécies com estação reprodutiva prolongada, os machos geralmente chegam antes das fêmeas aos sítios reprodutivos, enquanto que as fêmeas vão aos sítios reprodutivos apenas para o acasalamento, abandonando-os logo em seguida.

O sucesso no acasalamento é bastante desigual, com muitos machos não se acasalando e uns poucos se acasalando várias vezes. As características da vocalização dos anuros machos (altura, duração ou taxa de repetição) fornecem informações que uma fêmea utiliza para avaliar a qualidade do parceiro potencial.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia, o Brasil possui a maior riqueza de espécies de anfíbios, com 1026 espécies, sendo 988 de Anuros (distribuídos em 19 famílias e 87 gêneros), as cecílias com 33 espécies (distribuídas em 4 famílias e 12 gêneros) e as salamandras com 5 espécies (1 família e 1 gênero). A ordem Anura possui ao menos 6452 espécies (o que corresponde a 88% da diversidade de anfíbios) distribuídas em 57 famílias (SBH, 2014; Frost, 2014).

### **1.3.1 A Família Leptodactylidae**

Dados moleculares têm sido utilizados em estudos evolutivos da família Leptodactylidae. A taxonomia da família Leptodactylidae tem sofrido várias reformulações nos últimos anos. Até o ano de 2006, os leptodactídeos constituíam uma das maiores famílias de anuros. Ruvinsky e Maxson (1996), baseados em análises de genes mitocondriais, sugeriram a polifilia de Leptodactylidae. Frost et al., 2006 revisaram diversos grupos de anuros e desmembraram os leptodactídeos em quatro famílias: Batrachophrynidae, Leptodactylidae, Ceratophryidae e Cycloramphidae. Grant et al., 2006 posteriormente, dividiram Cycloramphidae em Cycloramphidae e Hylodidae, e Leptodactylidae em Leptodactylidae e Leiuperidae.

Pyron e Wiens (2011), em um estudo que incluiu dados moleculares de 2800 espécies de anfíbios, corroboraram os esquemas taxonômicos propostos por estudos anteriores (Frost et al., 2006; Grant et al., 2006), acrescentando pequenas modificações. A família Leptodactylidae sofreu uma nova modificação e passou a compreender três subfamílias: Leiuperinae (com 90 espécies distribuídas em 5 gêneros: *Edalorhina*, *Engystomops*, *Physalaemus*, *Pleurodema* e *Pseudopaludicola*); Leptodactylinae (com 96 espécies classificadas em 4 gêneros: *Adenomera*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus* e *Lithodytes*) e Paratelmatobinae (com 13 espécies classificadas em 4 gêneros: *Crossodactylodes*, *Paratelmatobius*, *Rupirana* e *Scythrophrys*) (Figura 5).

Os leptodactídeos são amplamente distribuídos por toda a região Neotropical, encontrados ao Sul da América do Norte, América Central e América do Sul, predominantes em clima tropical e terras baixas, e concentrando no Brasil elevado número de espécies (Frost, 2014; Sá et al., 2014). As espécies desta família possuem comprimento e peso variados, desde pequenos anuros até animais medindo cerca de 30 cm e pesando 1,5 kg.

Estudos baseados em dados moleculares e não moleculares suportam a monofilia dos gêneros *Adenomera*, *Hydrolaetare*, *Leptodactylus* e *Lithodytes* e o posicionamento de *Hidrolaetare* como grupo irmão de *Leptodactylus*, e *Adenomera* como grupo irmão de *Lithodytes* (Fouquet et al., 2013; Sá et al., 2014).

O gênero *Leptodactylus* (Figura 4) é um importante clado dentro da família Leptodactylidae (Figura 5), grupo neotropical rico em espécies e distribuição geográfica. Esse gênero é dividido em quatro grupos de espécies que formam uma topologia pectinada: *Leptodactylus fuscus*, que se apresenta basal aos demais, seguido por *L. pentadactylus*, que é grupo irmão do clado formado por *L. latrans* e *L. melanotus* (Sá et al., 2014).

Os leptodactídeos apresentam interessantes modos reprodutivos, como o de *L. chaquensis*, espécie de porte médio e abundante no Pantanal, que segue padrão reprodutivo explosivo (geralmente em períodos de chuvas), reproduzindo-se em ambientes abertos, alagados e rasos e depositando seus

ovos em ninhos de espuma. Essa espécie apresenta cuidado parental, sendo que os girinos recém-eclodidos são defendidos pelos pais (Fernandes et al., 2010).

*Leptodactylus fuscus* e *L. pentadactylus* apresentam desova em ambiente terrestre inundável; os machos escavam tocas subterrâneas próximas a áreas alagadas, sendo os girinos liberados quando as tocas são inundadas. Em seu modo reprodutivo, *L. pentadactylus* apresenta também o comportamento de ovofagia (Fernandes et al., 2010; Sá et al., 2014). As fêmeas de *L. latrans* apresentam um complexo cuidado parental, defendendo agressivamente os ovos e larvas de ataques de predadores (pássaros) (Fernandes et al., 2010; Sá et al., 2014).

A maioria dos relatos de tripanossomas de leptodactilídeos está baseada em dados morfológicos e poucas foram as espécies de tripanossomas encontradas nesses hospedeiros: *T. rotatorium*, *T. leptodactyli*, *T. ocellati*, *T. celestinoi*, *T. arcei* e *T. chattoni* (Bardsley, Harmsen, 1973; Lemos et al., 2008). Ferreira et al., (2007, 2008) baseados em dados moleculares, demonstram elevada ocorrência de tripanossomas em leptodactilídeos brasileiros, principalmente das subfamílias Leptodactylinae (gênero *Leptodactylus*) oriundos do Pantanal, e Leiuperinae (gênero *Engystomops*) oriundos da Amazônia.



**Figura 4.** Fotos de leptodactilídeos pertencentes ao gênero *Leptodactylus* realizadas durante este estudo.

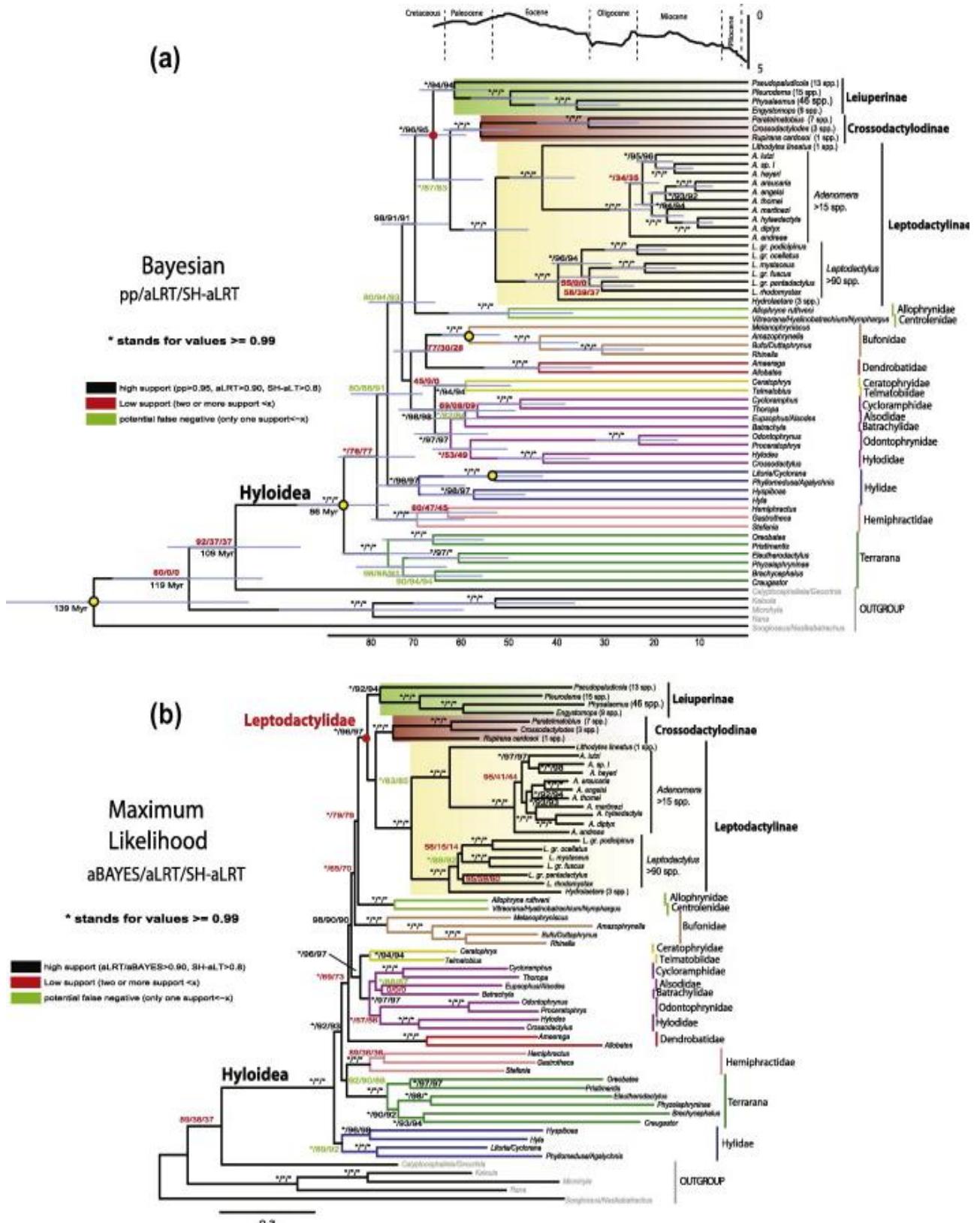


Figura 5. Filogenia da família Leptodactylidae (Fouquet et al., 2013).

### 1.3.2 Ciclo biológico de tripanossomas de anuros

Em estudos realizados por Martin e Desser, (1990, 1991b) após a infecção experimental de *Bufo americanus* por um clone de *T. fallisi*, foi possível analisar o desenvolvimento desses flagelados. Foi observado que de 8 a 10 dias após a infecção experimental as formas tripomastigotas metacíclicas dão origem a tripomastigotas sanguícolas, que se apresentam com corpo largo e membrana ondulante bem desenvolvida e que gradualmente são substituídas por formas tripomastigotas curtas e finas. Outra importante observação feita é que as formas tripomastigotas largas foram encontradas apenas no verão, sugerindo que esses flagelados possam sofrer modificações morfológicas sazonais dependentes da temperatura ou da resposta imunológica do hospedeiro.

Em estudos de infecções experimentais com *T. andersoni* e *T. grylli* em *Hyla versicolor* criada em laboratório e aclimatada a 10 °C, 22 °C e 30 °C durante cinquenta dias foi observado, nas duas espécies de tripanossomas, as formas epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas. *Trypanosoma andersoni* foi encontrado principalmente no fígado e apesar de não terem sido observadas formas em divisão observou-se aumento em número e tamanho dos flagelados a 22 °C (até 20 dias) e 30 °C (até 50 dias) e muito pouco a 10 °C. *Trypanosoma grylli* apresentou divisões binárias e múltiplas na circulação geral e aumento no número e tamanho dos parasitas nas três temperaturas (até 10 dias a 22 °C e 50 dias nas outras temperaturas), havendo pequenas diferenças de tamanho com o tempo e temperaturas testadas (Reilly e Woo, 1982b).

Em estudo com *T. rotatorium* em *Rana catesbeiana*, testou-se a influência da temperatura sob a parasitemia periférica. Foi observada forte correlação entre temperatura e parasitemia, sendo que a 10 °C houve grande concentração de tripanossomas em órgãos como o fígado, rins e coração; variações circadianas foram observadas a 26 °C, mas não a 10 °C. Foi sugerido que as variações de temperatura não são as causas diretas da variação da parasitemia e outros fatores, como excitação e aumento fisiológico da adrenalina, já foram relacionados com a liberação de tripanossomas estocados em órgãos, como o fígado e os rins, para a circulação periférica (Bardsley e Harmen, 1969; 1973).

A variação circadiana na parasitemia periférica observada por Johnson et al., (1993) de um tripanossoma de anuro em *Hyla cinerea* é baixa das 8 h às 16 h e sofre um aumento até as 21 h, mantendo-se o pico até 1 h; neste mesmo horário, foi observado também um pico de ocorrência de *Corethrella wirthi* (díptera) se alimentando em machos adultos de *H. cinerea*.

A luminosidade também foi associada com variações circadianas da parasitemia periférica de tripanossomas em anuros. Da mesma forma que o observado em animais mantidos na escuridão por 24 h, que apresentam tripanossomas apenas nos rins, *T. rotatorium* aumenta numericamente no

sangue de *R. clamitans* em períodos de luminosidade e migra para os rins na ausência de luz (Southworth et al., 1968).

Bardsley e Harmsen, (1973) associaram o aparecimento e o aumento de infecções de tripanossomas em anuros com a idade do hospedeiro, Barta e Desser, (1984) corroboram a hipótese do aumento exponencial de *T. ranarum* em *Bufo americanus* em indivíduos acima de 50 mm de comprimento.

### 1.3.3 Hospedeiros invertebrados

Os hospedeiros invertebrados dos tripanossomas apresentam estreita associação com seus habitats. O principal vetor descrito para os anuros em ambiente aquático são as sanguessugas (classe Hirudinea, filo Anelida). No ambiente terrestre, a transmissão pode ocorrer por meio de artrópodes hematófagos (Bardsley e Harmsen, 1973).

As sanguessugas ectoparasitas sugam sangue de variados hospedeiros e geralmente apresentam relação com determinadas classes de vertebrados. Espécies da ordem Rhynchobdellida já foram relatadas como vetores de tripanossomas de anuros, e espécies onívoras da ordem Arhynchobdellida também parasitam anuros; é o caso de *Helobdella algira*, que parasita *Rana sp.*, e *Hirudo medicinalis*, que parasita anuros e mamíferos (Sawyer, 1986).

*Trypanosoma inopinatum* já foi observado no sistema digestório da sanguessuga *H. algira* (Billet, 1904) e formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. falliisi* foram observadas na probóscide da sanguessuga *Desserobdella picta* (Martin, Desser 1991a). Com o objetivo de avaliar a infecção de sanguessugas por tripanossomas, Reilly e Woo, (1982) alimentaram *Desserobdella picta* em *Hyla versicolor* infectada com *Trypanosoma andersoni* ou *Trypanosoma grylli* e observaram formas epimastigotas e esferomastigotas de *T. andersoni* em divisão no trato digestório das sanguessugas. Após 24 horas, formas tripomastigotas metacíclicas foram encontradas no trato digestório; estas, porém, foram incapazes de infectar *H. versicolor*. *Trypanosoma grylli* não se desenvolveu em *D. picta*.

Estudos moleculares realizados com tripanossomas encontrados em sanguessugas terrestres da família Haemadipsidae posicionaram esses tripanossomas no clado *T. cyclops*, junto de *Trypanosoma sp. ADE*, de anuro australiano, sugerindo a possibilidade de um ciclo envolvendo anuros, sanguessugas terrestres e tripanossomas não relacionados ao clado Aquático (Hamilton et al., 2005).

Tripanossomas de anuros possuem diversos vetores e hospedeiros invertebrados, como os insetos hematófagos dos gêneros *Culex* (Bartlett-Healy et al., 2009; Desser et al., 1973, 1975), *Aedes* (Bailey, 1962; Ramos Urdaneta-Morales, 1977), *Phlebotomus* (Kato et al., 2010), *Lutzomyia* (Anderson, Ayala 1968; Ayala, McKay, 1971) e *Corethrella* (Johnson et al., 1993). Ferreira et al., (2008) em um

estudo filogenético baseado em dados moleculares, posicionaram tripanossomas isolados de flebotomíneos da região amazônica em diagramas filogenéticos da família Trypanosomatidae. Foi observado que todos os tripanossomas de flebotomíneos analisados são proximamente relacionados a alguns isolados de anuros da mesma região, formando um grupo monofilético (clado An03) e sugerindo ainda que flebotomíneos são hospedeiros invertebrados e possíveis vetores desses tripanossomas de anuros.

Infecções experimentais revelaram o desenvolvimento de tripanossomas de anuros em flebotomíneos (Anderson e Ayala, 1968; Ayala, 1970), simulídeos e culicídeos (Desser et al., 1975). O desenvolvimento em flebotomíneos foi demonstrado com a transmissão via ingestão do inseto pelos anuros (Anderson e Ayala 1968; Ayala, 1971). Muitas espécies de flebotomíneos têm hábitos restritos de alimentação. *Lutzomyia vexator occidentis*, por exemplo, alimenta-se apenas em répteis e anuros (Anderson e Ayala, 1968; Ayala, 1971). Evidências obtidas em infecções experimentais de *Culex territans*, por alimentação em anuros infectados com *T. rotatorium*, sugerem que este inseto possa ser vetor deste tripanossoma (Desser et al., 1973). Anuros que ingeriram *Aedes aegypti* infectado com *T. rotatorium* também se infectaram com este tripanossoma (Bailey, 1962; Ramos e Urdaneta-Morales, 1977). Esses possíveis vetores apresentaram desenvolvimento de flagelados restrito ao intestino, sem evidências de desenvolvimento nas glândulas salivares. Não foi possível determinar se na natureza estes animais são infectados por contaminação com fezes destes insetos, contendo formas metacíclicas depositadas próximo ao orifício da picada, ou se a ingestão de insetos infectados é o mecanismo de transmissão ou se ambos os mecanismos são importantes.

## 1.4 Parâmetros taxonômicos utilizados na taxonomia e caracterização de tripanossomas

### 1.4.1 Morfologia

As espécies de tripanossomatídeos podem diferir no tamanho e no formato do corpo, na posição do núcleo e do cinetoplasto, e no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo. O conjunto destas características é utilizado na identificação de espécies de *Trypanosoma*, sendo particularmente útil na classificação de tripanossomas de mamíferos em subgêneros (Hoare, 1972). Entretanto, não há padrões morfológicos bem definidos para a classificação de tripanossomas de anuros. Estes tripanossomas são altamente pleomórficos e a utilização da morfologia como principal parâmetro taxonômico na classificação de várias espécies necessitam ser reavaliadas. As formas sanguíneas de alguns destes flagelados são comparáveis às maiores já observadas entre os tripanossomas de mamíferos. Apesar de alguns desses tripanossomas apresentarem semelhanças

com tripanossomas de peixes e répteis, estes apresentam também uma morfologia muito peculiar, não observada em isolados de nenhum outro grupo de animais. Apesar da diversidade de formas, os tipos morfológicos foram associados com algumas espécies, como por exemplo: a) *T. inopinatum*, formas tripomastigotas grandes e alongados, algumas formas são bem afiladas, com membrana ondulante bem desenvolvida; b) *T. ranarum*, tripomastigotas muito largos, com flagelo longo e membrana ondulante bem desenvolvida; c) *T. rotatorium*, formas menores e arredondadas com membrana ondulante bem definida; d) *T. chattoni*, formas esféricas muito grandes, sem membrana ondulante e sem flagelo livre (Bardsley e Harmsen, 1973; Desser, 2001). Quando cultivados, os tripanossomas de anuros geralmente apresentam formas epimastigotas e não apresentam diferenças tão marcantes quanto às descritas para as formas sanguíneas.

Estudos realizados por microscopia eletrônica de transmissão com *T. mega* (Steinert e Novikoff, 1960), *T. rotatorium* (Bardsley e Harmsen, 1973), *T. andersoni* (Reilly e Woo, 1982a,b,c) e *T. fallisi* (Martin e Desser, 1990), com formas de cultura e de tripomastigotas sanguíneos de *T. andersoni* e *T. fallisi* não apresentaram diferenças significativas com tripanossomas de mamíferos (Bardsley e Harmsen, 1973). Foi observada nos tripanossomas de anuros uma estrutura chamada citóstoma (Steinert e Novikoff, 1960) e estrias longitudinais na porção posterior das formas largas, características semelhantes às descritas em tripanossomas de peixes e répteis (Bardsley e Harmsen, 1973).

Estudo mais recente de Ferreira et al., (2007) descreveu uma grande diversidade morfológica entre tripanossomas no sangue de anuros brasileiros. Foram observados 11 morfotipos, oito associados a espécies previamente descritas e três com padrão totalmente novo. Os 11 morfotipos foram divididos em dois grupos: grupo I (M1-6), que compreende tripanossomas alongados e com extremidades afiladas observados em Bufonidae e Leptodactylidae; e grupo II (M7-11), que compreende tripanossomas esféricos ou elípticos, associados às famílias de anuros Hylidae e Leptodactylidae.

#### **1.4.2 Hospedeiro e origem geográfica**

Alguns estudos sugeriram que espécies de tripanossomas de anuros, como *T. rotatorium*, fossem cosmopolitas e inespecíficas em relação ao hospedeiro (Bardsley e Harmsen, 1973); outros indicaram relativo isolamento geográfico e especificidade pela espécie do hospedeiro de origem (Clark et al., 1995; Lun e Desser, 1995; 1996a,b; Martin et al., 1992).

Clark et al., (1995) demonstraram a fragilidade de considerar apenas morfologia, hospedeiro e origem geográfica como parâmetros taxonômicos, demonstrando que dois isolados previamente identificados como *T. rotatorium* correspondem, na verdade, a espécies distintas e pouco relacionadas.

Ferreira et al., (2007) demonstraram que grupos de tripanossomas de anuros brasileiros, determinados por polimorfismo de tamanho e restrição de ITS, apresentam certa correlação com hospedeiros e regiões geográficas de origem.

#### **1.4.3 Características biológicas**

As características biológicas dos tripanossomas são importantes para a classificação desses parasitas, sendo importante considerar dados como ciclo de vida, mecanismos de transmissão, infectividade, patogenicidade e comportamento em cultura.

As necessidades nutricionais para o cultivo de cada tripanossoma podem diferir, gerando assim especificidades de cada espécie quanto a adequações de pH, osmolaridade, entre outros fatores (Bardsley e Harmsen, 1973). O comportamento em cultura de tripanossomatídeos pode diferir e revelar preliminarmente a distinção de espécies, no entanto, meios de cultivo e comportamento semelhante em cultura não garantem que parasitas possam pertencer a uma mesma espécie.

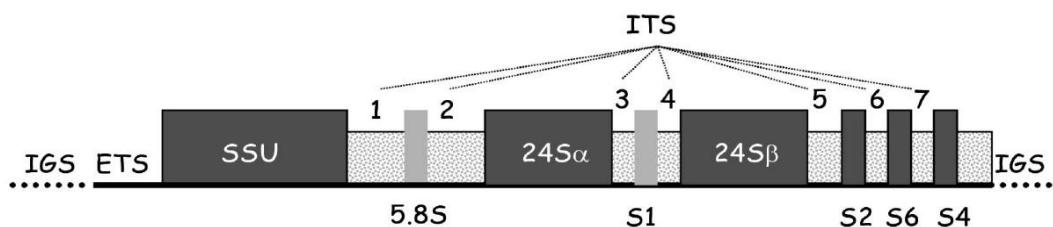
Martin e Desser, (1991a) observaram a diferenciação em cultura de *T. fallisi*. Após 24 horas de cultivo (ágar sangue com meio mínimo essencial) a 20 °C, as formas tripomastigotas encontradas no sangue transformaram-se em epimastigotas e após 48 h foram observadas formas amastigotas e esferomastigotas, bem como a formação de rosetas, indicando divisões múltiplas. Foram também observadas formas epimastigotas dividindo-se por fissão binária, além de formas tripomastigotas metacíclicas.

#### **1.4.4 Genes ribossômicos**

Filogenias baseadas em marcadores moleculares têm tradicionalmente utilizado genes ribossômicos, dada sua distribuição universal e o fato de serem funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos (Sogin et al., 1986). Sequências da subunidade menor, SSU, têm sido as mais utilizadas devido a diversas características, tais como o tamanho, a facilidade de obtenção (amplificação por PCR) e a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas. A SSU dos genes de rDNA da família Trypanosomatidae possui oito regiões conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández et al., 1990). Estudos baseados em sequências de SSU rDNA têm contribuído para o esclarecimento de questões filogenéticas e evolutivas dos tripanossomas.

Sequências de diversas regiões dos genes ribossômicos vêm sendo utilizadas como marcadores filogenéticos, de relacionamento genético ou mesmo como alvos para diagnóstico de tripanossomas. Os espaçadores IGS e ITS são muito mais variáveis do que as regiões S (1-4 e 6), SSU

e LSU, diferindo inter e intraespecificamente, sendo, assim, excelentes para analisar organismos filogeneticamente muito próximos, para diagnóstico e como marcadores taxonômicos (Ferreira et al., 2007). Análises da ITS rDNA revelaram variabilidade em linhagens de *T. cruzi* (Fernandes et al. 1999; Marcili et al., 2009a,b,c; Mendonça et al. 2002) e *T. rangeli* (Beltrame-Botelho et al., 2005; Maia da Silva et al., 2004 a,b), espécies de tripanossomas Africanos (Cortez et al., 2006; Desquenes et al. 2001; Njiru et al., 2005), *T. lewisi* (Maia da Silva et al., 2010) e *T. theileri* (subgênero *Megatrypanum*) (Garcia et al., 2011a,b; Rodrigues et al. 2006) (Figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos.

O relacionamento genético entre tripanossomas de anuros foi estudado por Clark et al., (1995) com a técnica de “Riboprinting” (amplificação por PCR da SSU rRNA seguida de digestão com enzimas de restrição e análise dos padrões de fragmentos de DNA obtidos em gel de agarose) e os nove isolados estudados formaram “clusters” não associados com a morfologia, a origem geográfica ou com a espécie do hospedeiro de origem. Espécies morologicamente indistinguíveis como *T. fallisi* e *T. schmidti*, se posicionaram em grupos separados. Por outro lado, tripanossomas de rã (*T. ranarum*) e sapo (*T. fallisi*) foram agrupados. Essas duas espécies de tripanossomas são simpáticas e compartilham o vetor *Desserobdella picta*; contudo, não foi observada infecção cruzada entre os hospedeiros vertebrados.

A análise de polimorfismo de tamanho e restrição de fragmentos de ITS amplificados por PCR de tripanossomas de anuros revelou grande diversidade genética entre os isolados brasileiros (Ferreira et al., 2007). Nesse trabalho, foram analisados 82 isolados de 25 espécies de anuros. A diversidade genética entre esses isolados permitiu distribuí-los em 29 genótipos. Os genótipos de tripanossomas de anuros apresentaram correlação consistente com a família dos hospedeiros vertebrados com a exceção do genótipo A1, que foi encontrado em bufonídeos e leptodactilídeos (Ferreira et al., 2007).

#### 1.4.5 Gene de Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH)

Os genes de GAPDH codificam enzimas envolvidas na glicólise e no ciclo de Calvin (Forthergill-Gilmore e Michels, 1993; Martin e Schnarrenberger, 1997). Os tripanossomatídeos possuem duas versões de GAPDH, localizadas em compartimentos celulares diferentes, ambas codificadas por genes nucleares (Opperdoes, 1987). A versão citosólica de GAPDH de tripanossomatídeos (família Gap I, subfamília GapC) está mais proximamente relacionada com o Gap I de gama-proteobactérias (Michels et al., 1991; Qian e Keeling, 2001). Os tripanossomatídeos, provavelmente, adquiriram esse gene via transferência horizontal de uma gama-proteobactéria (Figge et al., 1999; Henze, et al., 1995). A versão glicossômica do gene GapC de tripanossomatídeos (Michels et al., 1991) está mais proximamente relacionada com o Gap I de eubactérias (Figge et al., 1999) e é equivalente a versão citosólica de GAPDH de *Euglena* (Henze et al., 1995). Nos genomas de *T. cruzi* (Kendall et al., 1990), *T. brucei* (Michels et al., 1986) e *L. mexicana* (Hannaert et al., 1992) observou-se que a versão citosólica da proteína GAPDH é codificada por um gene de cópia única, enquanto que a versão glicolítica é codificada por genes em tandem, com duas cópias idênticas. A versão glicolítica da GAPDH, depois da SSUrRNA, é o gene mais utilizado em estudos evolutivos da família Trypanosomatidae (Hamilton et al., 2004; 2005; 2007; Hannaert et al., 1998; Viola et al., 2008; 2009).



**Figura 7.** Representação esquemática dos genes GAPDH.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A família Leptodactylidae é atualmente subdividida em três subfamílias: Leiuperinae, Leptodactylinae e Paratelmatobinae. Essa família é amplamente distribuída pelo território brasileiro e por todo o Neotrópico (Fouquet et al., 2013; Pyron, Weins, 2011). A maioria dos estudos sobre tripanossomas de anuros se restringe a descrições morfológicas de formas encontradas no sangue de ranídeos e bufonídeos. Embora os parâmetros taxonômicos tradicionais, morfologia e hospedeiro de origem, sejam insuficientes, estes foram amplamente utilizados na classificação e identificação desses organismos. Análises filogenéticas e de polimorfismo genético de tripanossomas de anuros brasileiros (Ferreira et al., 2007; 2008) demonstraram uma relevante associação entre grupos formados e família dos hospedeiros vertebrados (An01: hilídeos e An02-03: bufonídeos), mesmo comparando isolados de famílias diferentes em simpatria. Contudo, observou-se que leptodactilídeos podem apresentar infecções por tripanossomas dos três grupos (An01-03), sugerindo que a restrição de clados de tripanossomas de anuros pelas famílias dos hospedeiros vertebrados (que reflete certa restrição parasita-hospedeiro) não é um axioma estrito, o que torna o estudo de tripanossomas de leptodactilídeos importante sob o ponto de vista evolutivo e das relações entre os tripanossomas de anuros e seus hospedeiros. Considerando a grande diversidade de tripanossomas que nosso grupo vem encontrando nos anuros brasileiros (Ferreira et al., 2007, 2008) e os poucos estudos moleculares existentes sobre esse grupo de parasitas, os principais objetivos do presente estudo foram:

- Detectar e isolar tripanossomas de anuros brasileiros da família Leptodactylidae de diferentes biomas.
- Comparar algumas características biológicas desses tripanossomas: comportamento em cultura, cultivo e diferenciação celular; restrição de hospedeiros; padrões eco-biogeográficos.
- Analisar a morfologia de formas do sangue e de cultura, por microscopia de luz e eletrônica.
- Avaliar o polimorfismo genético dos isolados obtidos nesse trabalho (barcoding baseado em sequências da região V7V8rDNA e análise de polimorfismo de ITS rDNA) e comparar com isolados já disponíveis em nosso laboratório, de diversas famílias.
- Analisar sequências obtidas diretamente do sangue de anuros, a fim de detectar espécies que não foram isoladas em cultura.

- Determinar o relacionamento genético e inferir relações filogenéticas entre isolados brasileiros de diferentes biomas, entre esses e isolados de outras regiões do mundo, com base em sequências dos genes SSUrDNA e gGAPDH.
- Comparar os dados obtidos com as análises moleculares com a morfologia e hospedeiro de origem.
- Comparar padrões filogeográficos dos tripanossomas e dos respectivos anuros hospedeiros e analisar os grupos obtidos frente a características ecológicas (biomas, ecótopos e nichos) e biológicas dos anuros.
- Investigar os possíveis vetores dos tripanossomas de leptodactilídeos

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Captura de anuros

A captura dos espécimes foi feita manualmente ou através de armadilhas de interceptação e queda ("pit fall traps"). Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos umedecidos a fim de evitar choques mecânicos, desidratação e diminuir o stress. Mantidos vivos, os animais foram conduzidos até o laboratório ou base montada no campo para o preparo. Os animais coletados foram numerados e fotografados em diversos ângulos para posterior identificação. Após a coleta do sangue, os anuros foram devolvidos ao local de captura. Cada coleta teve registrado o dia, condições climáticas e local exato da coleta por GPS. Todos os animais foram vistoriados à procura de ectoparasitas e estes, quando encontrados, foram preservados em etanol 100%, para posterior identificação e pesquisa de tripanossomas. Para a identificação dos anuros coletados contamos com a colaboração do Prof. Dr. Miguel T. Rodrigues (Departamento de Zoologia, IB, USP).

##### 3.1.1 Áreas de captura de anuros

No presente estudo, os anuros foram capturados entre os anos de 2012 e 2014, em diferentes cidades e biomas brasileiros, como em Cáceres (MT), região de Pantanal, Angicos (RN), região de Caatinga, Arapoema (TO), região de Cerrado, e em outros países da América do Sul/do Neotrópico, como Venezuela (Zulia) e Colômbia (Tolima). Neste estudo também foram utilizados tripanossomas de leptodactílidos já pertencentes à coleção do Departamento de Parasitologia do ICB/USP (TCC, Trypanosomatidae Culture Collection), originários de outras regiões do Brasil, como Miranda (Mato Grosso do Sul, Pantanal) e cidade de Monte Negro (Rondônia, Amazônia). Além disso, amostras de tecido (sangue e fígado) de anuros de diferentes localidades e biomas brasileiros (Tabela 1 e 2) pertencentes a este laboratório e outras disponibilizadas pelos professores Dr. Miguel T. Rodrigues (Departamento de Zoologia, IB, USP) e Dr. Reinaldo José da Silva (Departamento de Parasitologia, IB, UNESP/Botucatu).

#### 3.2 Isolamento e cultivo de tripanossomas

Os anuros capturados foram anestesiados em solução de benzocaína a 5%. Após verificação do processo de sedação e posterior assepsia com álcool 70% iodado, amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca, empregando-se seringa heparinizada. As amostras de sangue foram

inoculadas em tubos com etanol absoluto e de ensaio de 3 ml, contendo meio bifásico constituído por BAB (Blood Agar Base) a 4% na fase sólida e na fase líquida meio LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964), este último suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,8 mg/ml de gentamicina e 5 mg/ml de ampicilina. As hemoculturas foram incubadas a 25 °C e examinadas em microscópio óptico após 15 dias da inoculação.

**Tabela1.** Amostras de sangue de leptodactilídeos e origens geográficas utilizadas neste estudo.

BSC*	Hospedeiro		Origem geográfica		MH***	PCR****
	Subfamília	Espécie	Local	Bioma		
191**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
192**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
193**	Leiuperinae	<i>Pleurodema diploristris</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
194**	Leiuperinae	<i>Physalaemus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
195	Leiuperinae	<i>Physalaemus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
196**	Leiuperinae	<i>P. albifrons</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
197**	Leiuperinae	<i>P. albifrons</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
198**	Leiuperinae	<i>P. cicada</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
199	Leptodactylinae	<i>L. gr. podicipinus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	N.D.	X
200	Leptodactylinae	<i>L. labyrinthicus</i>	BR/BA/TO/Est. Ecol. Serra Geral BA/TO	Cerrado	N.D.	X
201**	Leptodactylinae	<i>L. labyrinthicus</i>	BR/BA/TO/Est. Ecol. Serra Geral BA/TO	Cerrado	N.D.	X
202	Leptodactylinae	<i>L. troglodytes</i>	BR/BA/TO/Est. Ecol. Serra Geral BA/TO	Cerrado	N.D.	X
203**	Leptodactylinae	<i>L. vastus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
204	Leptodactylinae	<i>L. vastus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
205	Leptodactylinae	<i>L. gr. podicipinus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
206	Leptodactylinae	<i>L. gr. podicipinus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
440	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
441	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
442	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
443	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
444	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
445	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Floresta úmida tropical	X	X
446	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Floresta seco tropical	N.D.	
447	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Floresta seco tropical	N.D.	
448	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Floresta seco tropical	N.D.	
449	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Floresta seco tropical	N.D.	
450	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Prado	Floresta seco tropical	N.D.	

\*Coleção de amostras de sangue; \*\*Amostra de sangue misto; \*\*\*Microhematócrito; \*\*\*\*Reação da cadeia da polimerase

### 3.3 Culturas de tripanossomas de espécies das famílias Leptodactylidae

Os tripanossomas utilizados neste trabalho estão mantidos na coleção de tripanossomatídeos (TCC: Trypanosomatidae Culture Collection) do Departamento de Parasitologia, ICB/USP. Até o momento, dispomos de 48 isolados de anuros da família Leptodactylidae (Tabela 3).

**Tabela 2.** Amostras de fígado de leptodactilídeos e origens geográficas utilizadas neste estudo.

TSC*	Hospedeiro		Origem geográfica		MH***	PCR****
	Subfamília	Espécie	Local	Bioma		
TSC01	Leptodactylinae	<i>L. spixi</i>	BR/SP/Iguape	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC02	Leptodactylinae	<i>L. spixi</i>	BR/SP/Iguape	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC074	Leptodactylinae	<i>L. mystaceus</i>	BR/MG/Lagoa Santa	Cerrado	N.D.	X
TSC075	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/MG/Lagoa Santa	Cerrado	N.D.	X
TSC076	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/PE/Igarassu	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC077	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/ES/São José do Calçado	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC078**	Leptodactylinae	<i>L. mystaceus</i>	BR/ES/São José do Calçado	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC079	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/BA/Serra do Teimoso, Jussari	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC080	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/BA/Serra do Teimoso, Jussari	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC081	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/ES/Parque Nacional do Caparaó	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC073	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC082	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC083	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC084	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC085	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC086	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC087	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC088	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		X
TSC089	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
TSC090	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
TSC091	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazônia	N.D.	X
TSC092	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Floresta úmida tropical		X
TSC093	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Floresta úmida tropical		X
TSC094	Leiuperinae	<i>Physalaemus</i> sp.	VE/Yaracuy/San Felipe	Floresta tropofílica		X
TSC095	Leptodactylinae	<i>L. gr. podicipinus</i>	BR/SP/Castilho	Mata Atlântica		X
TSC096	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/SP/Castilho	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC097	Leiuperinae	<i>Pseudopaludicola</i> sp.	BR/SP/Castilho	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC098	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/SP/Castilho	Mata Atlântica	N.D.	X
TSC099	Leptodactylinae	<i>L. spixi</i>	BR/SP/Iguape	Mata Atlântica		
TSC100	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/ES/Parque Nacional do Caparaó	Mata Atlântica	N.D.	
TSC101	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/BA/Trancoso	Mata Atlântica	N.D.	
TSC102	Leptodactylinae	<i>L. spixi</i>	BR/BA/Camaçan	Mata Atlântica	N.D.	
TSC103	Leptodactylinae	<i>L. marmoratus</i>	BR/SP/Santo André	Mata Atlântica	N.D.	
TSC104	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/PR/Pinhalão	Mata Atlântica	N.D.	
TSC105	Leptodactylinae	<i>L. labyrinthicus</i>	BR/PR/Pinhalão	Mata Atlântica	N.D.	
TSC106	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Cer/Ama	N.D.	
TSC107	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Cer/Ama	N.D.	
TSC108	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Cer/Ama	N.D.	
TSC109	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal		
TSC110	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Floresta úmida tropical		
TSC111	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Floresta úmida tropical		
TSC112	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Floresta úmida tropical		
TSC113	Leptodactylinae	<i>L. podicipinus</i>	BR/SP/Castilho	Mata Atlântica	N.D.	
TSC114	Leiuperinae	<i>Pseudopaludicola</i> sp.	BR/SP/Castilho	Mata Atlântica	N.D.	

\*Coleção de amostras de tecidos; \*\*Amostra de fígado mista; \*\*\*Microhematócrito; \*\*\*\*Reação da cadeia da polimerase

Para comparação, incluímos nas análises *T. chattoni* (isolado de ranídeo dos EUA) e isolados de outras famílias de anuros pertencentes à coleção de tripanossomatídeos. Com as coletas de anuros

realizadas entre os anos de 2010 e 2014 foram estabelecidas 21 culturas de novos isolados de leptodactilídeos que são mantidos criopreservados na coleção.

Para este estudo dispomos de um total de 48 isolados de leptodactilídeos, sendo a maioria pertencente à subfamília Leptodactylinae e ao gênero *Leptodactylus* (43 isolados) oriundos de diversas localidades e biomas, principalmente do Pantanal, Miranda - MS (19) e Cáceres – MT (8), do Cerrado, Rio Claro – SP (2), Caatinga, Angicos – RN (8), Amazônia, Monte Negro – RO (1), Venezuela (3) e Colômbia (2). Contamos ainda com 5 isolados de anuros da cidade de Monte Negro – RO, Amazônia pertencentes à subfamília Leiuperinae, gênero *Engystomops*, um isolado cujo hospedeiro não foi possível identificar e 3 isolados da Venezuela, cujos hospedeiros também não puderam ser identificados.

### 3.4 Manutenção dos tripanossomatídeos

As hemoculturas positivas eram transferidas do tubo de coleta para garrafas de cultura já contendo monocamadas de células HI-5 (isolada de *Trichophlusia ni*) em meio TC100. As culturas eram incubadas a 25 °C e os repiques realizados a cada 12 dias. Para a obtenção de maior quantidade de tripanossomas, foram utilizadas garrafas de 250 ml contendo células HI-5. As culturas eram lavadas 3 vezes em PBS, centrifugadas por 10 minutos a 8.000 g e os pellets armazenados a -20 °C. Os tripanossomas que foram utilizados neste estudo estão criopreservados em nitrogênio líquido (10% de DMSO) e fazem parte da coleção de tripanossomatídeos (TCC), do Departamento de Parasitologia, ICB/USP.

### 3.5 Caracterização morfológica

Durante a coleta de amostras de sangue dos anuros por punção cardíaca, foram preparados esfregaços sanguíneos em lâminas de microscopia. As lâminas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (~50 µL por mL de água não tamponada) por aproximadamente 45 minutos.

**Tabela 3.** Tripanossomas isolados de leptodactilídeos e origens geográficas utilizados neste estudo.

Organismo		Hospedeiro		Origem geográfica		Ano de Coleta
TCC*	Clado	Subfamília	Espécie	Local	Bioma	
306	An02	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
316	An02	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
317	An01	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
324	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
326	An02	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
327	An01	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
365	An03	Leptodactylinae	<i>L. pentadactylus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2001
398	An03	Leptodactylinae	<i>L. pentadactylus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2002
401	An03	Leiuperinae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2002
402	An03	Leiuperinae	<i>E. petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2002
405	An03	Leiuperinae	<i>E. petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2002
407	An05	Leiuperinae	<i>E. petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2002
408	An03	Leiuperinae	<i>E. petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia	2002
436	An01	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
438	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
439	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
440	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
443	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
444	An01	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
445**	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
446	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
447	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
449	An02	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
492	An02	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
920	An05	Leptodactylinae	<i>L. labyrinthicus</i>	BR/SP/Rio Claro	Cerrado	2004
928	An01	Leptodactylinae	<i>L. labyrinthicus</i>	BR/SP/Rio Claro	Cerrado	2004
966	An05	Leptodactylinae	<i>L. chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2005
2170	An02	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2171	An06	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2174	An01	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2175	An02	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2185	An02	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2011
2186	An05	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2011
2187	An02	Leptodactylinae	<i>L. latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2011
2262	An02	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2011
2263	An01	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2264	An02	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2265	An02	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2266	An02	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2269	An05	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2270	An01	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2271	An05	Leptodactylinae	<i>L. fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2280	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2012
2379	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/ Santa Barbara	Floresta úmida tropical	2012
2380	An06	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/ Santa Barbara	Floresta úmida tropical	2012
2392**	An06	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/ Santa Barbara	Floresta úmida tropical	2012
2499	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Floresta seca tropical	2013
2501	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Prado	Floresta seca tropical	2013

**Espécie de referência:** *Trypanosoma chattoni*ATCC50294 Ranidae *Rana pipiens* EUA/Minnesota

\*Coleção de tripanossomatídeos isolados em cultura; \*\*Isolado de tripanossoma misto em cultura

### 3.5.1 Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura

Para o estudo morfológico, os isolados foram cultivados em monocamada de HI-5 em meio Tc100, e observados em fase logarítmica e fase estacionária. As culturas foram lavadas três vezes em PBS e preparados em lâmina (adicionando-se uma gota da cultura nas fases logarítmica e estacionária), em seguida fixados com metanol, corados com Giemsa e posteriormente fotografados. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), culturas em fase logarítmica foram fixadas em 2,5% (v/v) de glutaraldeído, mais 1% (v/v) de paraformaldeído em tampão cacodiolato de sódio 0,1M (pH 7,2) acrescido de cloreto de cálcio 1mM, os parasitas foram aderidos em lamínulas redondas previamente revestidas com Poli-L-lisina 0,1%, pós-fixados com tretróxido de ósmio 1% em tampão cacodilado de sódio 0,1M, por 30 minutos, lavados em tampão cacodilato e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50% a 100%). As amostras foram secas pelo método de ponto crítico em CO<sub>2</sub> em aparelho Balzers CDP-20, em seguidas as lamínulas foram montadas em suporte de alumínio, metalizadas com fina camada de ouro em aparelho Sputter Coater SCD 050 Balzers e analisadas em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250 (Fei Company).

### 3.6 Extração de DNA dos parasitas

Foi utilizado o método de extração com fenol-clorofórmio. Os *pellets* armazenados a -20°C foram ressuspensos (1,0 ml/10<sup>9</sup> tripanossomas) em tampão SE e mantidos em banho de gelo para extração de DNA. Após a adição de Sarkosil (10% do volume inicial), Pronase e RNase (1% do volume inicial, ambos à uma concentração inicial de 10 mg/ml), o material foi incubado em banho-maria (2 horas, temperatura de 55 °a 60 °C) e então extraído uma vez com Fenol:Tris (1:1), duas vezes com Fenol:CHCl<sub>3</sub> (1:1), duas vezes com CHCl<sub>3</sub>:álcool isoamílico (24:1) e uma vez com CHCl<sub>3</sub>. Após a última extração, o DNA foi precipitado (12 a 15 horas, a -20 °C) com acetato de sódio a 0,3 M (pH 7,0) e 2 volumes de Etanol 100% gelado por incubação, em seguida lavado com Etanol a 70% e os *pellets* secos a 37 °C e ressuspensos em TE (TrisHCL a 1mM, pH 7,4, EDTA a 1 mM pH 8,0). As amostras de DNA foram quantificadas utilizando espectrofotômetro UV/Visível, Ultropec 3000 (Pharmacia Biotech).

### 3.7 Amplificação de DNA por PCR e nested PCR e eletroforese em gel de agarose

Nas reações de PCR foram utilizadas as seguintes misturas de reação: 200 mM de dNTP; 100 ng do “primer” (ver Tabela 4); 100 ng de DNA genômico; 5µl de tampão (2 mM de Tris-HCl, pH 8.4; 500 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>); 2,5 µl de *Taq* DNA polymerase e água bidestilada deionizada e

autoclavada (qsp 50 ul). Os ciclos de amplificação e a temperatura de anelamento foram padronizados de acordo com os “primers” utilizados. De 2 a 5 µl dos produtos das reações de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando o marcador de peso molecular 1 kb e corados com Gel Red® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) e fotografados em transiluminador de luz UV.

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos, ciclos de amplificação e temperatura utilizados nas diferentes reações de PCR.

Gene e oligonucleotídeos utilizados	Condições de amplificação
<b>SSU rDNA (completo)</b> KDR3 5' GAT CTG GTT GAT TCT GCC AGT AG 3' KDR5 5' GAT CCA GCT GCA GGT TCA CCT AC 3'	1 ciclo: 3 min 94 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1min 55 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C
<b>SSU rDNA (V7-V8)</b> 609F 5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3' 706R 5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3'	1 ciclo: 3 min 94 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 48 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C
<b>Oligonucleotídeos para sequenciamento da SSU:</b> 1156F 5'CGT ACT GGT GCG TCA GAG G 3' 1156R 5'CCT CTG ACG CAC CAG TAC G 3' 285F 5'GTG TTG ATT CAA TTC ATT C 3' 285R 5'GAA TGA ATT GAA TCA ACA C 3' 202F 5'ATG CTC CTC AAT GTT CTG 3' 202R 5'CAG AAC ATT GAG GAG CAT3'	1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 15 seg 96 °C; 15 seg 50 °C; 4 min 60 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C
<b>Oligonucleotídeos para sequenciamento do gGAPDH:</b> GAP-trymodF 5'GGB CGC ATG GTS TTC CAG 3 GAP-tryR 5'CCC CAC TCG TTR TCR TAC C 3' GAP3F (5' GTG AAG GCG CAG CGC AAC 3') GAP5R (5' CCG AGG ATG YCC TTC ATG 3')	1 ciclo: 3 min 95 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C ; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C
<b>Reações de sequenciamento de fragmentos clonados:</b> M13F 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3' M13R 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 15 seg 96 °C; 15 seg 50 °C; 4 min 60 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

O método do nested PCR (Noyes, et al., 1999) foi utilizado para a amplificação do gene gGAPDH e da região V7V8 do gene SSU rRNA de amostras de material direto (sangue e fígado) que contém muito DNA do hospedeiro. Para a 1<sup>a</sup> amplificação do gene gGAPDH foram utilizados os “primers” SF e SR e para a 2<sup>a</sup> amplificação os “primers” 3F e 5R (Fermino et al., em preparação). Para

a amplificação da região V7V8 SSU rRNA foram utilizados os “primers” KDR3 e KDR5 (Clark et al., 1995) e para a 2<sup>a</sup> amplificação os “primers” 609F e 706R (Maia da Silva et al., 2004a; Rodrigues et al., 2006).

### 3.8 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR, clonagem e sequenciamento dos produtos purificados

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corados com Gel Red® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) e, em seguida, cortados e extraídos do gel de agarose usando o kit Spin - X (Costar®, Nova York, NY, Estados Unidos). Os produtos purificados foram克lonados ou submetidos diretamente à reação de sequenciamento.

A clonagem, quando necessária, foi feita com os produtos amplificados e purificados,克lonados em vetor pGEM® - T Easy (Promega®, São Paulo, SP, Brasil), e transformadas em células DH10 $\beta$ . Após crescimento dos clones positivos em meio de cultura LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, o DNA foi extraído e purificado, utilizando o sistema “Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System” (Promega®, São Paulo, SP, Brasil).

O sequenciamento do DNA克lonado e dos produtos amplificados por PCR (não克lonados) foi realizado utilizando o aparelho sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) e utilizando o kit Big Dye Terminator, conforme especificações do fabricante. As reações de PCR foram efetuadas empregando primers específicos do fragmento克lonado ou primers universais M13F/M13R utilizados no sequenciamento de fragmentos de DNA克lonados em vetor pCR 2.1.

### 3.9 Alinhamento das sequências obtidas e análises filogenéticas

As sequências obtidas por PCR da gGAPDH, da SSUrDNA, e as dos bancos de dados foram alinhadas através do programa ClustalX v. 2.1 (Larkin et al., 2007) e refinadas manualmente utilizando o programa GeneDoc 2.7 (Nicholas et al., 1997). As inferências filogenéticas foram determinadas pelos métodos de máxima parcimônia (P), máxima verossimilhança (ML) (“maximum likelihood”) e análise bayesiana (B). As árvores de P foram construídas utilizando o programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais, seguida de troca de ramos (“RAS – TBR”). As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas com 100 replicatas e os mesmos parâmetros empregados na busca.

As análises de ML foram realizadas no programa RAxML v7.2.6 (Stamatakis, 2006), com a aplicação de 500 replicatas, usando GTR como modelo de substituição e 4 categorias de gama e

diagramas obtidos por parcimônia como árvores iniciais. Os parâmetros do modelo de substituição empregado foram estimados durante a busca. O suporte de ramos foi estimado em 500 replicatas de “bootstrap” no programa RAxML.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003), com o emprego de 500.000 gerações, usando GTR como modelo de substituição e 4 categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a construção do dendrograma final, foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 75 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com o programa MrBayes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho serão apresentados e discutidos sucintamente através do resumo abaixo. Os detalhes do trabalho serão apresentados no manuscrito em fase de publicação, anexado ao final da dissertação.

### 4.1 Filogeografia e riqueza de espécies de tripanossomas de rãs de Leptodactylidae da América do Sul.

#### **APÊNDICE - Phylogeography and species richness of trypanosomes from South American frogs of Leptodactylidae**

Lyslaine H Sato<sup>#</sup>, Robson C Ferreira<sup>#</sup>, Marta Campaner, Carmen SA Takata, Laerte B Viola, Bruno R Fermino, Miguel T Rodrigues, Erney P Camargo, Marta MG Teixeira

Tripanossomas são hemoparasitas, transmitidos quer por sanguessugas e dípteros, conhecidos por infectarem anuros de diversas famílias em qualquer lugar do mundo onde esses animais foram examinados. O conhecimento sobre a diversidade desses tripanossomas se restringe a morfologia das formas sanguíneas. Estudos moleculares que permitam uma avaliação real da riqueza de espécies ainda são escassos. Estudos filogenéticos prévios de uma pequena amostra revelou grande diversidade genética e relações filogenéticas complexas entre os tripanossomas de bufonídeos, hilídeos e leptodactilídeos.

**Métodos:** A fim de avaliar a riqueza, padrões ecológicos e biogeográficos de espécies de tripanossomas foram examinados por microscopia, hemocultura e PCR foram realizados em amostras de sangue de leptodactilídeos capturados nos biomas brasileiros da Amazônia (AM), Pantanal (PA), Mata Atlântica (MA), Cerrado (CE) e Caatinga (CA), além de alguns lugares da Venezuela (VEN). Amostras de tecidos (sangue e fígado) também foram examinadas. Sequências de genes V7V8 SSU rRNA e gGAPDH foram empregadas e analisadas por barcoding e inferências filogenéticas.

**Conclusões:** Os resultados desse estudo corroboraram a complexidade e a monofilia dos tripanossomas de anuros. Os resultados apóiam a existência de ao menos seis grandes clados de tripanossomas (AN01-AN06) e, juntamente com a análise biogeográfica sugerem algumas associações entre clados, famílias de leptodactilídeos e biomas. O clado AN01 é um conjunto não bem resolvido de tripanossomas de leptodactilídeos e hilídeos de todos os biomas. Os clados AN01 e AN03 compreendem tripanossomas de leptodactilídeos e hilídeos ou bufonídeos. Os clados AN02, AN05

(exceto *T. chattoni* dos EUA) e AN06 foram formados quase exclusivamente por tripanossomas de leptodactilídeos. O clado AN04 não contém nenhum tripanossoma da América do Sul. O clado AN03 contém apenas amostras da AM, AN02 amostras do PA, CA e MA mas não da AM. O clado AN06 foi formado, em sua maioria, por tripanossomas da Caatinga e Pantanal. Análises filogenéticas e de padrões biogeográficos de tripanossomas de leptodactilídeos sugerem uma história evolutiva moldada pela história dos biomas e bacias hidrográficas da América do Sul e, provavelmente, por “host-switching” de tripanossomas entre leptodactilídeos e esporadicamente, entre eles e hilídeos ou bufonídeos. Múltiplas linhas de evidências geradas por análises filogenéticas, biogeográficas e morfológicas permitiram identificar linhagens evolutivas independentes, candidatas a novas espécies de tripanossomas. Assim 12 tripanossomas candidatos a novas espécies, caracterizados nesse trabalho (7 com dados morfológicos) puderam ser identificados entre os 48 tripanossomas de leptodactílideos isolados em culturas. Portanto, esse estudo aumenta (>100%) o número de espécies conhecidas de anuros e contribui com novas e relevantes informações para o entendimento das histórias evolutivas dos tripanossomas de anuros e de seus hospedeiros nos diferentes biomas brasileiros.

## REFERÊNCIAS\*

- Anderson JR, Ayala SC. Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: first report from the Americas. *Science* (New York, NY). 1968 Sep 6;161(3845):1023-5.
- Ayala SC. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. *The Journal of Protozoology*. 1971 Aug;18(3):433-6.
- Ayala SC, McKay JG. *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. *The Journal of Protozoology*. 1971 Aug;18(3):430-3.
- Ayala SC. Lizard malaria in California; description of a strain of *Plasmodium mexicanum*, and biogeography of lizard malaria in western North America. *The Journal of Parasitology*. 1970 Jun;56(3):417-25
- Bailey JK. *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. *Experimental parasitology*. 1962 Jun;12:155-63.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of anura. *Advances in Parasitology*. 1973;11(0):1-73.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of Ranidae. I The effects of temperature and diurnal peridiocity on the parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). *Canadian journal Zoology*. 1969; 47: 283-88.
- Barta JR, Desser SS. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of wildlife diseases*. 1984 Jul;20(3):180-9.
- Bartlett-Healy K, Crans W, Gaugler R. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). *The Journal of Parasitology*. 2009 Apr;95(2):381-7.
- Beltrame-Botelho IT, Gaspar-Silva D, Steindel M, Davila AM, Grisard EC. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2005 Jan;5(1):17-28.
- Billet A. Culture d'un trypanosome de la grenouille chez une hirudinée; relation ontogénétique possible de ce trypanosome avec une hémogrégarine. *C r hebd Séanc Acad Sci, Paris*. 1904; 139: 574-76.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, et al. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*. 2013 Jan;164(1):129-52.
- Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 2002a Dec;55(6):757-67.
- Busse I, Preisfeld A. Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene*. 2002b Feb 6;284(1-2):83-91.

---

\* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1964 May-Jun;6:93-100.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. The royal society. 2004 May; 271: 1251-1262.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society. 1998 Aug;73(3):203-66.
- Clark CG, Martin DS, Diamond LS. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 1995 Jan-Feb;42(1):92-6.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. Parasitology. 2006 Aug;133(Pt 2):159-69.
- Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Davila AM. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. International journal for parasitology. 2001 May 1;31(5-6):610-4.
- Desser SS. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. The Journal of Parasitology. 2001 Feb;87(1):152-60.
- Desser SS, McIver SB, Jez D. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. International Journal for Parasitology. 1975 Oct;5(5):507-9.
- Desser SS, McIver SB, Ryckman A. Culex territans as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. Development of the flagellate in the mosquito. The Journal of Parasitology. 1973 Apr;59(2):353-8.
- Doflein F. Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger. Jena: G. Fisher; 1901.
- Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM. More surprises from Kinetoplastida. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 Mar 16; 96(6):2579-81.
- Duellman WE. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the american tropics. Ann Missouri Bot Gard. 1988; 75: 79-104.
- Fernandes IM, Signor CA, Penha J. Biodiversidade no Pantanal de Poconé. 2010. Cuiabá, 1-194.
- Fernandes O, Santos S, Junqueira A, Jansen A, Cupolillo E, Campbell D, et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:195-7.
- Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Dec 15;90(24):11608-12.
- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, et al. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 2008 Sep-Oct;55(5):427-35.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitology. 2007 Oct;134(Pt 11):1623-38.

- Figge RM, Schubert M, Brinkmann H, Cerff R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene diversity in eubacteria and eukaryotes: evidence for intra- and inter-kingdom gene transfer. *Molecular Biology and Evolution*. 1999 Apr;16(4):429-40.
- Fothergill-Gilmore LA, Michels PA. Evolution of glycolysis. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1993;59(2):105-235.
- Fouquet A, Blotto BL, Maronna MM, Verdade VK, Junca FA, de Sa R, et al. Unexpected phylogenetic positions of the genera *Rupirana* and *Crossodactylodes* reveal insights into the biogeography and reproductive evolution of leptodactylid frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013 May;67(2):445-57.
- Frost DR. 2014. Amphibian Species of the World: na Online Reference. Version 6.0 (09/01/2015). Eletronic Database accessible at <http://reserch.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, et al. The amphibian tree of life. *Bull American Museum Natural History*. 2006; 297: 1-370.
- Garcia HA, Kamyngkird K, Rodrigues AC, Jittapalapong S, Teixeira MM, Desquesnes M. High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary Parasitology*. 2011a Aug 25;180(3-4):363-7.
- Garcia HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AH, Campaner M, Nunes VL, et al. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *International Journal for Parasitology*. 2011b Nov;41(13-14):1385-96.
- Gibson WC, Lom J, Peckova H, Ferris VR, Hamilton PB. Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using ssu rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. *Parasitology*. 2005 Apr;130(Pt 4):405-12.
- Gibson WC, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000 Apr 15;107(2):269-77.
- Grant T, Frost DR, Cadwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE, Wheeler WC. Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatiidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2006; 299: 1-262.
- Gruby M. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1843; 55: 1134-36.
- Haag J, O'HUigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and biochemical parasitology*. 1998 Mar 1;91(1):37-49. PubMed PMID: 9574924.
- Hamilton PB, Adams ER, Njokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009 Jan;9(1):81-6.

- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007 Jul;44(1):15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology*. 2005 Apr 1;35(4):431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*. 2004 Nov;34(12):1393-404.
- Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *Journal of Molecular Evolution*. 1998 Dec;47(6):728-38.
- Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992 Oct;55(1-2):115-26.
- Hayes PM, Lawton SP, Smit NJ, Gibson WC, Davies AJ. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasites & Vectors*. 2014;7:50.
- Henze K, Badr A, Wettern M, Cerff R, Martin W. A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Sep 26;92(20):9122-6.
- Hernandez R, Rios P, Valdes AM, Pinero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1990 Jun;41(2):207-12.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972.
- Hoare CA. The classification of mammalian trypanosomes. *Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie*. 1964;39:43-57.
- Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Molecular Biology and Evolution*. 2003 Apr;20(4):644-52.
- Jakes KA, O'Donoghue PJ, Adlard RD. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitology*. 2001 Nov;123(Pt 5):483-7.
- Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, do Carmo JB, et al. [Biological cycle of Phytomonas]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1988 Nov;83 Suppl 1:601-10.
- Johnson RN, Young DG, Butler JF. Trypanosome transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *Journal of Medical Entomology*. 1993 Sep;30(5):918-21.

- Kato H, Uezato H, Sato H, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, et al. Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. *Parasites & vectors*. 2010;3:10.
- Katz LA, Grant JR, Parfrey LW, Burleigh JG. Turning the crown upside down: gene tree parsimony roots the eukaryotic tree of life. *Systematic biology*. 2012 Jul;61(4):653-60.
- Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *The EMBO journal*. 1990 Sep;9(9):2751-8.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2007 Nov 1;23(21):2947-8.
- Laurin M, Girondot M, de Ricqlés A. Early tetrapod evolution. *Trends Ecol Evol*. 2000; 15:118-123.
- Leal DD, O'Dwyer L H, Ribeiro VC, Silva RJ, Ferreira VL, Rodrigues RB. Hemoparasites of the genus *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and hemogregarines in Anurans of the São Paulo and Mato Grosso do Sul States - Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009 Jun;81(2):199-206.
- Lemos M, Souza CS, da Costa SC, Souto-Padron T, D'Agosto M. Isolation and in vitro culture of trypanosomes from *Leptodactylus ocellatus* from the Atlantic Forest in a new experimental culture medium. *The Journal of Parasitology*. 2013 Feb;99(1):164-7.
- Lemos M, Morais DH, Carvalho VT, D'Agosto M. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *The Journal of Parasitology*. 2008 Feb;94(1):148-51.
- Leonard G, Soanes DM, Stevens JR. Resolving the question of trypanosome monophyly: a comparative genomics approach using whole genome data sets with low taxon sampling. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011 Jul;11(5):955-9.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, et al. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) erneyi sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) cruzi and allied species. *Protist*. 2012 Nov;163(6):856-72.
- Lukes J, Skalicky T, Tyc J, Votypka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2014 Jul;195(2):115-22.
- Lukes J, Hashimi H, Zikova A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics*. 2005 Nov;48(5):277-99.
- Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic cell*. 2002 Aug;1(4):495-502.
- Lukes J, Jirku M, Dolezel D, Kral'ova I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *Journal of Molecular Evolution*. 1997 May;44(5):521-7.
- Lun ZR, Desser SS. Karyotype analysis of anuran trypanosomes by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *The Journal of Parasitology*. 1995 Dec;81(6):1018-20.

- Lun ZR, Desser SS. Comparisons of molecular karyotype and RAPD patterns of anuran trypanosome isolates during long-term in vitro cultivation. *Folia Parasitologica*. 1996a;43(4):241-8.
- Lun ZR, Desser SS. Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. *Parasitology research*. 1996b;82(1):22-7.
- Maia da Silva F, Marcili A, Ortiz PA, Epiphanio S, Campaner M, Catao-Dias JL, et al. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2010 May;10(4):522-9.
- Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular ecology*. 2007 Aug;16(16):3361-73.
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brígido MC, Junqueira AC, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. 2004a Mar;128(Pt 3):283-94.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2004b; 129(5): 549-61.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009a May;136(6):641-55.
- Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009b Dec;9(6):1265-74.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for Parasitology*. 2009c Apr;39(5):615-23.
- Martin DS, Desser SS, Hong H. Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *The Journal of Parasitology*. 1992 Apr;78(2):317-22.
- Martin DS, Desser SS. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron microscopic study. *Parasitology research*. 1991a;77(1):18-26.
- Martin DS, Desser SS. Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. *The Journal of Parasitology*. 1991b Jun;77(3):498-500.
- Martin DS, Desser SS. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* N. Sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. *The Journal of Protozoology*. 1990 May-Jun;37(3):199-206.

Martin DS, Wright AD, Barta JR, Desser SS. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *The Journal of Parasitology*. 2002 Jun;88(3):566-71.

Martin W, Schnarrenberger C. The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Current Genetics*. 1997 Jul;32(1):1-18.

Maslov DA, Votypka J, Yurchenko V, Lukes J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*. 2013 Jan;29(1):43-52.

Maslov DA, Lukes J, Jirku M, Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996 Jan;75(2):197-205.

Mayer AFIC. Spicilegium observationum anatomicarum de organo electrico in *Raiis anelectricis* et de haematozois. Bonnae; 1843.

Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology*. 2002 Feb;124(Pt 2):177-84.

Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2001 Mar-Apr;48(2):161-9.

Michels PA, Marchand M, Kohl L, Allert S, Wierenga RK, Opperdoes FR. The cytosolic and glycosomal isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei* have a distant evolutionary relationship. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1991 Jun 1;198(2):421-8.

Michels PA, Polischczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, Wierenga RK, et al. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *The EMBO journal*. 1986 May;5(5):1049-56.

Molyneux DH. Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*. 1977;15:1-82.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004 Sep;54(Pt 5):1861-75.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F. New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001 Nov;51(Pt 6):2211-9.

Nicholas KB, Nicholas HB, Deerfield DW. GeneDOC: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News*. 1997; 4:14.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *International Journal of Parasitology*. 1999;Feb;29(2):331-9.

- Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, et al. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology research*. 2005 Feb;95(3):186-92.
- Opperdoes FR. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual review of microbiology*. 1987a;41:127-51.
- Parfrey LW, Lahr DJ, Knoll AH, Katz LA. Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Aug 16;108(33):13624-9.
- Poinar G, Jr. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasites & Vectors*. 2008;1(1):22.
- Poinar G, Jr., Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*. 2004 Sep;155(3):305-10.
- Porcel BM, Denoeud F, Opperdoes F, Noel B, Madoui MA, Hammarton TC, et al. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *PLoS genetics*. 2014 Feb;10(2):e1004007.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. A vida dos vertebrados. Atheneu Editora São Paulo. 2006; 4:220-62.
- Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdononadales (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001 May;51(Pt 3):751-8.
- Pyron RA, Wiens JJ. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2011 Nov;61(2):543-83.
- Qian Q, Keeling PJ. Diplonemid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfer. *Protist*. 2001 Sep;152(3):193-201.
- Ramos B, Urdaneta-Morales S. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. *Revista de Biología Tropical*. 1977 Dec;25(2):209-17.
- Reilly BO, Woo PTK. The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida) from *Hyla versicolor* Le Conte, 1825 (Anura). *Canadian Journal Zoology*. 1982a; 60: 116-23.
- Reilly BO, Woo PTK. The *in vivo* and *in vitro* development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). *Canadian Journal Zoology*. 1982b; 60: 124-33.
- Reilly BO, Woo PTK. The ultrastructure of an anuran trypanosome, *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo 1982c (Kinetoplastida). *Canadian Journal Zoology*. 1982; 60: 134-8.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. Phylogeny of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006 Feb;132(Pt 2):215-24.

- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. *Bioinformatics*. 2003 Aug;19(12):1572-4.
- Ruvinsky I, Maxson LR. Phylogenetic relationships among bufonoid frogs (Anura:Neobatrachia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1996 Jun;5(3):533-47.
- Sá RO, Grant T, Camargo A, Heyer WR, Ponsa ML, Stanley E. Systematics of the Neotropical Genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Anura: Leptodactylidae): Phylogeny, the Relevance of Non-molecular Evidence, and Species Accounts. *South American Journal of Herpetology*. 2014; 9 (Special Issue 1): S1-S128.
- Sawyer RT. Leech biology and behaviour. Oxford Science Publications; 1986.
- SBH. Brazilian Amphibians: List of Species. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). 2014.
- Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB. Host specificity and incidence of trypanosomes in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology*. 2001; 10: 2319-2327
- Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*. 2006 Apr;22(4):168-74.
- Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Molecular Biology and Evolution*. 2002 Dec;19(12):2071-83.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Mar;83(5):1383-7.
- Southworth GC, Mason G, Seed JR. Studies on frog trypanosomiasis. I. A 24-hour cycle in the parasitemia level of *Trypanosoma rotatorium* in *Rana clamitans* from Louisiana. *The Journal of Parasitology*. 1968 Apr;54(2):255-8.
- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006;22:2688-90.
- Steinert M, Novikoff AB. The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the *Trypanosome*, *Trypanosoma mega*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 1960 Oct 1;8(2):563-9.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson WC. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* 2001; 48:1-56.
- Stevens JR, Teixeira MM, Bingle LE, Gibson WC. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *International Journal for Parasitology*. 1999a May;29(5):749-57.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 1999b Jan;118 ( Pt 1):107-16.
- Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1998 Sep-Oct;93(5):669-76.
- Svobodova M, Zidkova L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votypka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2007 Feb;57(Pt 2):423-32.

Swofford DL. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony: and other methods. Version4. Sunderland MA: Sinauer Associates; 2003.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, et al. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*. 2011 Jul;162(3):503-24.

Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press; 1976. p. 1-34.

Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, et al. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2009a Nov-Dec;56(6):594-602.

Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, et al. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology*. 2009b Jan;136(1):55-65.

Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 2008 Apr;135(5):595-605.

Vitt LJ, Cadwell JP. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 2014; 4<sup>th</sup> edition. London, 413-480.

Votypka J, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, et al. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*. 2013 Nov;164(6):763-81.

Zickus T. The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Litu*. 2002; 12: 197-202.

# Phylogeography and species richness of trypanosomes from South American frogs of Leptodactylidae

Lyslaine H Sato<sup>#</sup>, Robson C Ferreira<sup>#</sup>, Marta Campaner, Carmen SA Takata, Laerte B Viola, Bruno R Fermino, Miguel T Rodrigues, Erney P Camargo, Marta MG Teixeira

# equal contribution

---

## Abstract

**Background:** Trypanosomes are haemoparasites reported to infect anurans of many families anywhere these animals have been examined. They are transmitted either by leeches and/or dipterans in aquatic and terrestrial environments. Almost all data about the diversity of these trypanosomes are restricted to morphology of blood trypanosomes. Studies using molecular approaches for a real appraisal of species richness are still scarce. Previous phylogenetic studies of a small sample revealed the great genetic diversity and complex phylogenetic relationships of anuran trypanosomes, showing that trypanosomes from bufonids or hylids selectively clustered in specific clades, whereas leptodactylid trypanosomes dispersed through various clades.

**Methods:** To assess trypanosome species richness and ecological and biogeographical patterns, surveys by microscopy, hemoculturing and nested-PCR were carried out in blood samples from leptodactylids captured in the Brazilian biomes of Amazonia, Pantanal, Atlantic Forest, Cerrado and Caatinga, plus few sites from Venezuela and Colombia. Archived frog tissue samples were also examined. Sequences from SSU rRNA and gGAPDH genes from leptodactylid trypanosomes were employed for barcoding and phylogenetic inferences.

**Results:** This study corroborated the monophyly and high complexity of anuran trypanosomes and a lineage composition congruent by SSU rRNA and gGAPDH gene sequences analysis. Results strongly supported the existence of 6 major trypanosome clades (An01-An06). The clade An01 is an unresolved assemblage of trypanosomes from leptodactylids and hylids from all Brazilian biomes investigated. Clades An01 and An03 comprise trypanosomes from leptodactylids and hylids or bufonid, respectively. Clades An02, An05 (except for the North American *T. chattoni* from a ranid) and An06 (except for one bufonid isolate) harbored almost exclusively leptodactylid trypanosomes. Most clades comprised trypanosomes from various Brazilian leptodactylid species and biomes, excepting An04 that was composed by African, European and North American trypanosomes from ranids and bufonids. The clade An03 was restricted to trypanosomes from Amazonia and An02 comprised samples from the Pantanal, Caatinga and Atlantic Forest, but lacked any trypanosome from Amazonia. Trypanosomes from Colombia frogs nested into An02 and An05 clades while those from Venezuela clustered into An01 and An06 clades.

**Conclusions:** Phylogenetic analysis and biogeographical patterns suggest an evolutionary history of leptodactylid trypanosomes shaped by Neotropical historical landscapes and, probably, by vector-mediated host switching among leptodactylids and, sporadically, between these frogs and hylids or bufonids. Phylogeographical analysis suggests that host family and species, biome, hydrographic basins and ecological niches may all be determinants of the clade structure of anuran trypanosomes. Integrative approaches that combine multiple lines of evidence from phylogenetic, biogeographical and morphological analyses allowed identifying evolutionary independent lineages candidate for new trypanosomes species. Altogether, findings from this study revealed high molecular and morphological diversity and disclosed up 12 isolates candidates to new species among the 48 cultures of trypanosomes from leptodactylid, significantly increasing the number of species of anuran trypanosomes, and provides new relevant insights on the connected evolutionary histories of these trypanosomes and their hosts.

**Keywords:** Hemoprotozoans, *Trypanosoma*, Anura, amphibians, frogs, Neotropics, morphology, phylogeny, biogeography, molecular taxonomy.

---

## 1. INTRODUCTION

Anuran trypanosomes are obligated and widespread hemoparasites infecting toads and frogs across the world and transmitted by leeches or dipterans in aquatic and terrestrial environments (Anderson and Ayala 1968; Bardsley and Harmsen, 1973; Desser, 2001; Ferreira et al., 2007, 2008; Bartlett-Healy et al., 2009; Netherlands et al., 2015). Besides their interest for ecological and biogeographical studies, the positioning of the anuran trypanosomes within the most basal clade (the Aquatic clade composed mostly of fish and anuran trypanosomes) of the *Trypanosoma* phylogenetic tree, makes knowledge about these parasites essential to the understanding of the evolutionary history of the trypanosomes in general (Stevens et al., 2001; Ferreira et al., 2008; Hamilton et al., 2005, 2007).

The diversity of parasites belonging to the genus *Trypanosoma* encompasses a large number of species infecting all classes of vertebrates and vectored by a range of haematophagous arthropods and leeches (Stevens et al., 2001; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Lukes et al., 2014). Molecular studies on trypanosomes are dominated by pathogens of humans and livestock and even studies of wildlife trypanosomes are concentrated in reservoirs of human and livestock trypanosomes (Rodrigues et al., 2008; Maia da Silva et al., 2010; Lima et al., 2012; Pinto et al., 2012; Hamilton et al., 2012; Truc et al., 2013). However, the last years have seen an increased interest in trypanosomes harmful to endangered species of mammals (Maia da Silva et al., 2008; Botero et al., 2013; Thompson et al., 2014). Despite decades old reports on trypanosomes infecting fishes, amphibians and reptiles, almost all knowledge about these trypanosomes relies on surveys done by traditional diagnostic methods and on species

description based on morphology of blood trypanosomes (revised by Bardsley and Harmsen, 1973; Lom, 1979; Telford, 1995). Only recently these trypanosomes have been included in phylogenetic studies (Martin et al., 2002; Gibson et al., 2005; Viola et al., 2008, 2009; Fermino et al., 2013; Grybchuk-Ieremenko et al., 2014; Hayes et al., 2014).

The long tradition of taxonomy based on host origin and morphology of blood forms led to a profusion of anuran trypanosome species (> 60 species) throughout the world, including the description of "cosmopolitan" species such as *T. rotatorium* and *T. chattoni* in anurans of diverse families in different continents. Despite their high prevalence, the potential consequences of trypanosome infections in anuran hosts are virtually unknown (Diamond, 1965; Bardsley and Harmsen, 1973; Woo and Bogart, 1984; Desser, 2001; Ferreira et al., 2007, 2008; Lemos et al., 2008). The species of anuran trypanosome erected according to traditional taxonomy have been challenged by molecular phylogenetic taxonomy revealing synonymous species of disparate morphologies and cryptic species morphologically indistinguishable. Currently, there are 6 species of anuran trypanosomes phylogenetically validated: *T. rotatorium*, *T. mega*, *T. falisi*, *T. ranarum*, *T. neveulemarei* and *T. chattoni* (Martin et al., 2002; Hamilton et al., 2004, 2007; Ferreira et al., 2007, 2008). We previously performed the first molecular investigation on the diversity and phylogenetic relationships of trypanosomes from Neotropical anurans (Ferreira et al., 2007). This previous studies suggested the existence of four clades of anuran trypanosomes into the major Anuran clade; the clade An04 comprised only non-Brazilian trypanosomes clustering together trypanosomes from bufonids and ranids from Europe, Africa and North America, excepting *T. chattoni* from North American ranid that constituted a separated phylogenetic lineage

(An05). Clade An01 was associated to hylid hosts, clades An02 and An03 were related to bufonids while, interestingly, leptodactylid trypanosomes were dispersed over all clades except An04, suggesting the occurrence of many events of host-switching between trypanosomes from Hylidae, Bufonidae and Leptodactylidae (Ferreira et al., 2007, 2008, 2015 in preparation).

Molecular studies on anuran trypanosomes are still limited to a small sampling representing an insignificant number of host species of restricted geographic coverage (Martin et al., 1992; Allozyme, 2002; Ferreira et al., 2007, 2008). Data about the species richness of these trypanosomes, their genetic diversity, geographic distribution, population structure, ecology, host-parasite interactions and vectors, all remain poorly investigated.

The order Anura, the major order of the class Amphibia, started their diversification about 250 Mya. The more than 6,500 extant species of living anurans are generally divided into three suborders: Archaeobatrachia, Mesobatrachia and Neobatrachia. More than 90% of the living anurans belong to the Gondwanan Neobatrachia clade that began its diversification in the Jurassic. Neobatrachia consists of Ranoidea, originated in Africa and India, and Hyloidea, a clade of relatively recent origin (65–110 Mya) in South America. Hyloidea includes more than half of the neobatrachian species distributed in several families such as Bufonidae, Hylidae, Centrolenidae, Hemiphractidae, Dendrobatidae and Leptodactylidae (Frost et al., 2006; Roelants et al., 2007; Heinicke et al., 2009; Pyron and Wiens, 2011; Fouquet et al., 2014). The Leptodactylidae, or southern frogs, constitute a speciose anuran family (~ 200 species) distributed across tropical habitats of southern North America, Central and South America, and West Indies (<http://amphibiaweb.org> – Accessed Feb. 2015). The

major diversity of leptodactylids is concentrated in Brazil, with more than 150 species (Pyron and Wiens, 2011; Frost, 2014). Currently, Leptodactylidae consists of three subfamilies: Leptodactylinae, Paratelmatobiinae and Leiuperinae. However, relationships among lineages within Leptodactylidae still remain ambiguous, and species believed to be widespread are emerging as complex of cryptic species (Pyron and Wiens, 2011; Fouquet et al., 2014; Frost, 2014).

The existence of widespread species as well as endemic species, and species spotted to specific ecological niches, make leptodactylids an excellent model for studies of host and parasite joint diversification. We surveyed for trypanosomes infecting leptodactylids in various biodiversity hotspots in South America across vast continental areas and highly different biomes. Several species of trypanosomes have been reported in leptodactylid frogs such as *T. chattoni*, *T. rotatorium*, *T. leptodactyli*, *T. ocellati*, *T. celestinoi* and *T. arcei* (Bardsley and Harmsen, 1973; Lemos et al., 2008). These species, similarly to the majority of trypanosomes reported in anurans, were all classified based exclusively on the morphology of blood trypomastigotes.

Our previous study showed a high prevalence of trypanosome infections in Brazilian leptodactylids of the subfamilies Leptodactylinae (81%) and Leiuperinae (50%), mostly captured in the biomes of the Pantanal and Amazonia (Ferreira et al., 2007). In this previous study, 27 trypanosome cultures obtained from 40 leptodactylids were barcoded (V7V8 SSU rRNA) revealing high trypanosome genetic diversity both inter- and intra-host species. Although this previous study examined samples from only 4 species of leptodactylids, results indicated that these frogs could harbour diverse trypanosomes exhibiting complex

relationships with trypanosomes from bufonids and hylids (Ferreira et al., 2007).

Results from previous studies on trypanosomes from anurans (Ferreira et al., 2007, 2008), snakes (Viola et al., 2009) and crocodilians (Viola et al., 2008; Fermino et al., 2013) of South American biomes suggest that the evolution of these parasites was influenced by many factors such as phylogenetic relationships, historical biogeography, present day geographical distribution and ecology of their hosts (Ferreira et al., 2007, 2008). A better understanding of the species richness, diversification and evolutionary history of anuran trypanosomes requires the analysis of a larger sampling of isolates from a wide eco-geographical range.

Integrative approaches that combine multiple lines of evidence including molecular, morphological and eco- biogeographical data, have allowed taxonomists to define and name many of the evolutionary independent lineages as valid species of trypanosomes. In this study, we surveyed for trypanosomes in a large sampling of leptodactylids captured in the Brazilian biomes of the Pantanal, Amazonia, Atlantic Forest, Cerrado and Caatinga, plus a few samples from Venezuela and Colombia, representing a considerable part of the Anuran diversity and geographical distribution. We assessed their genetic diversity and phylogenetic relationships by comparing their SSU rRNA and gGAPDH gene sequences. Isolates identified in the phylogenetic analysis as candidates for new trypanosome species were further submitted to morphological analysis.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Areas of study, capture of frogs and blood and tissues sampling

Leptodactylid frogs were captured in several locations in the Brazilian biomes of Atlantic Forest, Pantanal, Caatinga, Cerrado and Amazonia between 2001 and 2014. We also captured some frogs in Venezuela, Santa Barbara (State of Zulia) and Colombia (State of Tolima), west of the Andean Mountains between 2012 and 2014 (Table 1, Fig. 1 map).

Frogs were manually captured; anesthetized by submersion in a solution of benzocaine (5%) and bleed by heart or femoral puncture using sodium citrate as anticoagulant. All procedures were performed according to the recommendations of IBAMA (the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources; Permit Number: 10080-2). Specimens representing the different anuran species and geographical collecting sites were photographed, preserved in ethanol, deposited in the Zoology Museum of the University of São Paulo, and identified by Miguel T. Rodrigues (Department of Zoology, Biology Institute, USP). The works in Venezuela and Colombia were done with the permission of local institutions. Animal handling was performed in strict accordance with good animal practice, and approved by the Committees on the Ethics of Animal Experimentation of all universities involved in this work.

Anuran blood samples were examined for the presence of trypanosomes by microscopy of fresh blood samples and MH (microhaemocrit) capillaries (parasites concentrated by centrifugation in buffy coat) and by haemoculturing, with inoculation of variable volumes of frog blood, depending on the size of frogs, into vacutainer tubes containing a biphasic medium. Positive cultures were transferred into flasks containing inset cells Hi-5 as feeder cells using TC100 medium (= Grace's medium) as described previously (Ferreira et al. 2008; Viola et al., 2009; Fermino et al., 2013). All established cultures are cryopreserved in liquid

nitrogen at the Trypanosomatid Culture Collection (TCC) of the University of São Paulo.

For molecular surveys of trypanosomes, blood and liver tissue samples of frogs were preserved in ethanol (95%) and stored in our Blood and Tissue

Sample Collection, BSC and TSC, respectively (Table 2 and 3). Tissue liver samples preserved in 95% ethanol from the collection of Miguel T. Rodrigues (Department of Zoology, Biology Institute, USP) were also examined.

**Table 1.** Host and geographical origin of anuran trypanosome isolates obtained in this study.

Organism TCC*	Clades	Host species		Geographical origin		Year collection
		subfamily	species	Country/State/Locality	Biome	
306	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
316	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
317	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
324	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
326	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
327	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2001
365	An03	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2001
398	An03	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2002
401	An03	Leiuperinae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2002
402	An03	Leiuperinae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2002
405	An03	Leiuperinae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2002
407	An05	Leiuperinae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2002
408	An03	Leiuperinae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazonian	2002
436	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
438	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
439	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
440	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
443	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
444	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
445**	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
446	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
447	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
449	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
492	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2002
920	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/SP/Rio Claro	Cerrado	2004
928	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/SP/Rio Claro	Cerrado	2004
966	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	2005
2170	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2171	An06	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2174	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2175	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2010
2185	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2011
2186	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2011
2187	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2011
2262	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2011
2263	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2264	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2265	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2266	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2269	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2270	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2271	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	2012
2280	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus sp.</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	2012
2379	An01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus sp.</i>	VE/Zulia/ Santa Barbara	Tropical rainforest	2012
2380	An06	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus sp.</i>	VE/Zulia/ Santa Barbara	Tropical rainforest	2012
2392**	An06	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus sp.</i>	VE/Zulia/ Santa Barbara	Tropical rainforest	2012
2499	An05	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus sp.</i>	CO/Tolima/Ortega	Tropical dry forest	2013
2501	An02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus sp.</i>	CO/Tolima/Prado	Tropical dry forest	2013

<b>Espécie de referência</b>						
<i>Trypanosoma chattoni</i>	An05	Ranidae	<i>Rana pipiens</i>	USA/Minnesota	ATCC50294/EU A	

\*Trypanosomatidae Culture Collection; \*\*Mixed cultures;



**Figure 1.** Map indicating the geographical origins of anuran trypanosome isolates from Brazil, Venezuela and Colombia. The map indicates the localities (city) and Departments (Colombia) or States (Venezuela and Brazil) from where anurans were collected.

**Table 2.** Blood sample of leptodactylids anuran and geographical origin obtained in this study.

BSC*	Host species		Geographical origin	Biome	MH***	PCR***
	subfamily	species				
191**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
192**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
193**	Leiuperinae	<i>Pleurodema diploristris</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
194**	Leiuperinae	<i>Physalaemus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
195	Leiuperinae	<i>Physalaemus</i> sp.	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
196**	Leiuperinae	<i>Physalaemus albifrons</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
197**	Leiuperinae	<i>Physalaemus albifrons</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
198**	Leiuperinae	<i>Physalaemus cicada</i>	BR/RN/Angicos	Caatinga	N.D.	X
199	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus gr. podicipinus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	N.D.	X
200	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/BA/TO/Est. Ecol. Serra Geral BA/TO	Cerrado	N.D.	X
201**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/BA/TO/Est. Ecol. Serra Geral BA/TO	Cerrado	N.D.	X
202	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus troglodytes</i>	BR/BA/TO/Est. Ecol. Serra Geral BA/TO	Cerrado	N.D.	X
203**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus vastus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
204	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus vastus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
205	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus gr. podicipinus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
206	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus gr. podicipinus</i>	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
440	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D.	X
441	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D.	X
442	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D.	X
443	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D.	X
444	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/MT/Cáceres	Pantanal	N.D.	X
445	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Tropical rainforest	X	X
446	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Tropical dry forest	N.D.	
447	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Tropical dry forest	N.D.	
448	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Tropical dry forest	N.D.	
449	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Ortega	Tropical dry forest	N.D.	
450	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	CO/Tolima/Prado	Tropical dry forest	N.D.	

\*Blood Sample Collection; \*\*Blood sample mixed ; \*\*\*Microhaematocrit; \*\*\*\*Polymerase chain reaction.

**Table 3.** Tissue sample of leptodactylids anuran and geographical origin obtained in this study.

TSC*	Host species	Geographical origin	MH***	PCR****	
	subfamily	species	Country/State/Locality	Biome	
TSC01	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus spixi</i>	BR/SP/Iguape	Atlantic Forest	N.D. X
TSC02	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus spixi</i>	BR/SP/Iguape	Atlantic Forest	N.D. X
TSC074	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	BR/MG/Lagoa Santa	Cerrado	N.D. X
TSC075	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/MG/Lagoa Santa	Cerrado	N.D. X
TSC076	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/PE/Igarassu	Atlantic Forest	N.D. X
TSC077	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/ES/São José do Calçado	Atlantic Forest	N.D. X
TSC078**	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	BR/ES/São José do Calçado	Atlantic Forest	N.D. X
TSC079	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/BA/Serra do Teimoso, Jussari	Atlantic Forest	N.D. X
TSC080	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/BA/Serra do Teimoso, Jussari	Atlantic Forest	N.D. X
TSC081	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/ES/Parque Nacional do Caparaó	Atlantic Forest	N.D. X
TSC073	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC082	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC083	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC084	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC085	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC086	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC087	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC088	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	X
TSC089	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D. X
TSC090	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D. X
TSC091	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Amazonian	N.D. X
TSC092	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Tropical rainforest	X
TSC093	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Tropical rainforest	X
TSC094	Leiuperinae	<i>Physalaemus</i> sp.	VE/Yacui/San Felipe	Tropical rainforest	X
TSC0095	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus gr. podicipinus</i>	BR/SP/Castilho	Atlantic Forest	X
TSC096	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/SP/Castilho	Atlantic Forest	N.D. X
TSC097	Leiuperinae	<i>Pseudopaludicola</i> sp.	BR/SP/Castilho	Atlantic Forest	N.D. X
TSC098	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/SP/Castilho	Atlantic Forest	N.D. X
TSC099	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus spixi</i>	BR/SP/Iguape	Atlantic Forest	
TSC100	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/ES/Parque Nacional do Caparaó	Atlantic Forest	N.D.
TSC101	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus fuscus</i>	BR/BA/Trancoso	Atlantic Forest	N.D.
TSC102	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus spixi</i>	BR/BA/Camacan	Atlantic Forest	N.D.
TSC103	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus marmoratus</i>	BR/SP/Santo André	Atlantic Forest	N.D.
TSC104	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus latrans</i>	BR/PR/Pinhalão	Atlantic Forest	N.D.
TSC105	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/PR/Pinhalão	Atlantic Forest	N.D.
TSC106	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Cerrado/ Amazonian	N.D.
TSC107	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Cerrado/ Amazonian	N.D.
TSC108	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	BR/TO/Arapoema	Cerrado/ Amazonian	N.D.
TSC109	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal	
TSC110	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Tropical rainforest	
TSC111	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Tropical rainforest	
TSC112	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus</i> sp.	VE/Zulia/Santa Barbara	Tropical rainforest	
TSC113	Leptodactylinae	<i>Leptodactylus gr. podicipinus</i>	BR/SP/Castilho	Atlantic Forest	N.D.
TSC114	Leiuperinae	<i>Pseudopaludicola</i> sp.	BR/SP/Castilho	Atlantic Forest	N.D.

\*Tissue Sample Collection; \*\*Tissue sample mixed ; \*\*\*Microhaematocrit; \*\*\*\*Polymerase chain reaction.

## 2.2. Morphological characterization by light and electronic microscopy

In this study, trypanosome isolates from leptodactylid were cultivated in Hi-5/TC100 for the analyses of morphological and ultrastructural features. For light microscopy, logarithmic and stationary phase cultures of trypanosomes were smeared on glass-slides, fixed in methanol and stained with Giemsa. Flagellates from log-cultures were employed for

Scanning Electron Microscopy (SEM) as described previously (Viola et al., 2009; Lima et al., 2012).

## 2.3 DNA preparation, PCR amplification and sequencing.

DNA of trypanosomes cultivated in TC100 medium or infecting blood and liver samples preserved in ethanol were extracted by the classical phenol-chloroform method. The oligonucleotides and PCR conditions employed for amplification of V7V8 SSU rRNA and gGAPDH were previously described (Ferreira

et al., 2007; 2008; Borghesan et al., 2013). The PCR products were purified using SpinX (Costar) and cloned with TA cloning kit (Invitrogen) before sequencing 3 to 5 clones from each culture, blood and liver samples.

#### 2.4 Alignments and phylogenetic inferences using SSU rRNA, gGAPDH gene sequences.

The SSU rRNA and gGAPDH sequences determined in this study were aligned with sequences from anuran trypanosomes from GenBank (Table 1). The software CLUSTALX2 (Larkin et al., 2007) was used to produce the initial alignments, which were refined manually. We created diverse alignments for phylogenetic inferences. Alignments 1 and 2 consist of V7V8 rRNA and gGAPDH sequences, respectively, from cultured isolates of anurans, and alignment 3 consisted of concatenate V7V8 rRNA and gGAPDH sequences. Alignment 5 included gGAPDH sequences from cultured isolates and blood and tissue samples from leptodactylids. Alignments 6-9 were created using sequences restricted to the main clades identified using the alignments 1-5. The alignment 3 included available sequences of anuran trypanosomes (Accession numbers SSU rRNA/gGAPDH): *T. rotatorium* (B2-II) from *Rana catesbeiana* (AJ009161/AJ620256); *T. mega* from *Bufo regularis* (AJ223567/AJ620253); *T. fallisi* from *B. americanus* (AF119806/AJ620254), and *T. chattoni* from *R. pipiens* (AF119807). Other trypanosomes nested in the Aquatic clade were used as outgroup of the anuran trypanosomes: fish trypanosomes, *T. sp.* (CLAR) (AJ620555/AJ620251) and *T. boissoni* (U39580/AJ620245); *T. binneyi* from platypus (AJ132351/AJ620266), and *T. sp.* (K&A) from aquatic leech (AJ009167/AJ620252).

Phylogenograms were inferred by maximum likelihood (ML), and the phylogenetic tree inferred with concatenated sequences carried out using maximum likelihood (ML) and parsimony (P). Parsimony analyses

(tree search and bootstrap) were carried out using PAUP\* v4.0b10 (Swofford, 2003) running 500 RAS-TBR replicates as previously described (Ferreira et al. 2007). Bayesian analyses were done using MrBayes v3.2.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) using GTR+Γ+I. In all analyses, stability was achieved within the first quarter generations and 25% of the trees from the set of 10.000.000 generations used were discarded as burn-in. The ML analysis was performed using RAxML v. 8.0.22 (Stamatakis, 2014) with GTRGAMMAI and 300 maximum parsimony starting trees. Model parameters were estimated in RAxML over the tree swap. ML bootstrap was estimated with 100 replicates in RAxML and optimized in the best tree.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Survey of trypanosomes in leptodactylids

In this study, we surveyed for trypanosomes in leptodactylid and leiuperid frogs from the Brazilian biomes of Pantanal, Caatinga, Amazonia, Atlantic Forest and Cerrado. Trypanosomes could be detected by microscopy of fresh blood samples and by examination of the buffy coats of microhaematocrits (MH). However, these methods could not be widely used due to fieldwork difficulties and/or to the small amount of blood collected from the smaller frogs. Therefore, we inoculated the blood samples directly in culture media or preserved in ethanol by PCR surveys of trypanosomes. Trypanosomes were detected by haemocultures or PCR in various species of Brazilian Leptodactylinae and Leiuperinae and some Venezuelan leptodactylids (Tables 1, 2, 3).

Despite the large number of infected frogs, we could not get a precise prevalence of trypanosome infection because of the multiplicity of methods used in the survey. For samples positive by hemoculturing, we could determine a prevalence of ~20%. However,

nested-PCR surveys of blood samples yielded up to ~80% of infected frogs from the Pantanal and Caatinga. Therefore, actual prevalence can only be estimated through the use of sensitive methods applied to larger samples.

### 3.2. V7V8 SSU rRNA barcoding and phylogenetic relationships of cultured leptodactylid trypanosomes

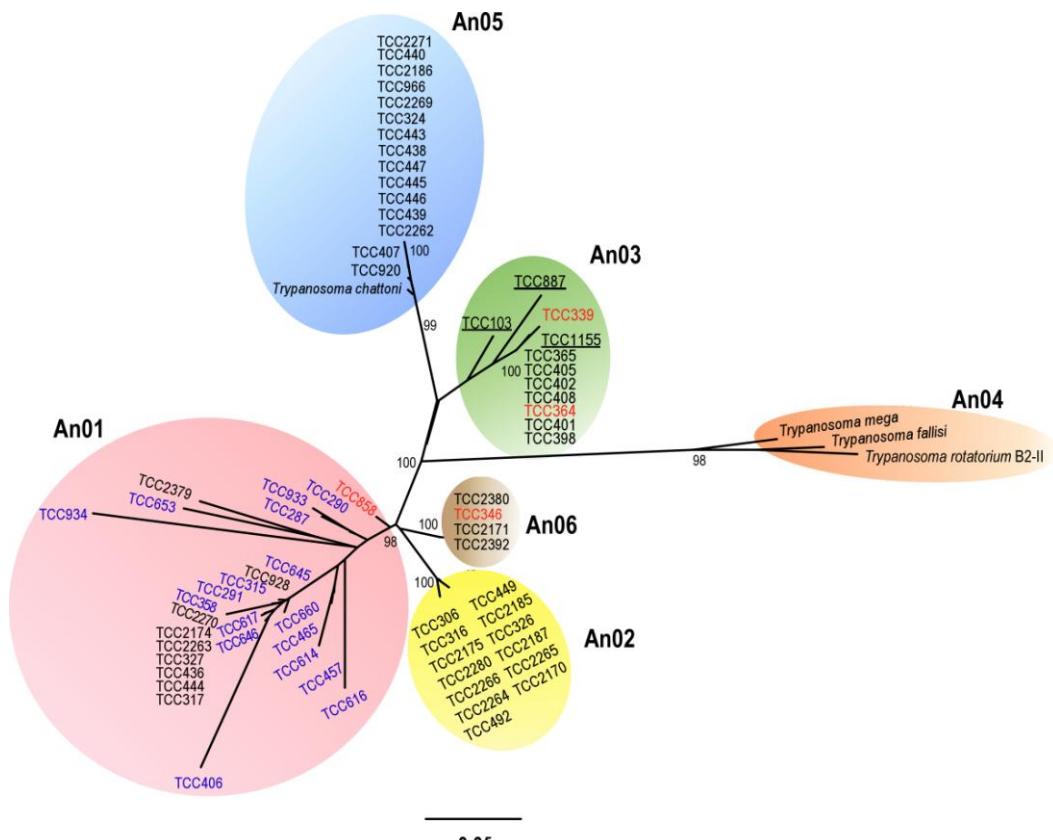
Most molecular and phylogenetic studies of anuran trypanosomes were carried out using SSU rRNA sequences (Martin and Desser, 2002; Ferreira et al., 2007, 2008). Barcoding by means of variable V7V8 SSU rRNA sequences permits to predict whether a given sample corresponds to a new species/genotype or to a previously known trypanosome (Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2008, 2009; Lima et al., 2012; Fermino et al., 2013). We previously barcoded four

Brazilian trypanosomes from leptodactylids (Ferreira et al., 2007).

Here, 21 additional trypanosome cultures from leptodactylids were similarly barcoded, and all sequences obtained were compared with those from the 4 named species of anuran trypanosomes, of the 6 species validated. (Fig. 2).

No sequences from trypanosomes found in South American frogs matched those of anuran trypanosomes of bufonids and ranids from Europe, Africa and North America. This analysis suggested the existence of candidates to new species within each clade of leptodactylid trypanosomes.

All V7V8 SSU rRNA sequences of leptodactylid trypanosomes were included in an alignment containing sequences of anuran trypanosomes from different families and geographical origin and submitted to phylogenetic analysis using fish trypanosomes as outgroups.



**Figure 2.** Unrooted dendrogram based on maximum likelihood analysis of V7V8rRNA sequences from anuran trypanosomes from clades An01-06. Host families of South American isolates are indicated by red (Bufonidae), black (Leptodactylidae) and blue colors (Hylidae). Phlebotomid isolates are indicated by underline. The numbers at branches correspond to bootstrap supports derived from 500 replicates.

Results confirmed the clustering together of all frog trypanosomes, forming a strongly supported monophyletic assemblage - the Anura clade. The inferred phylogram (Fig. 2) displayed the complex branching pattern of Brazilian isolates and the existence of the subclades An01-An06. This analysis also confirmed that trypanosomes of exotic frogs clustered into the separated clade An04, excepting *T. chattoni* that clustered into An03. Most clades were well-supported, however, the relationships among them were, in general, not well-resolved (Fig. 2). The analysis of divergences between SSU rRNA sequences showed high homogeneity within the clades An2 and An06 while heterogeneity was higher in An05 and, especially, in the weakly supported subclade An01. Small divergences (2.3 to 6.4%) of V7V8 SSU rRNA sequences separated the subclades of anuran trypanosomes.

### 3.3. Phylogenetic inferences based on gGAPDH and concatenated SSU rRNA and gGAPDH sequences

Previous phylogenetic studies of trypanosomes from mammals, snakes and crocodilians (Lima et al., 2012, 2013; Viola et al., 2009; Fermino et al., 2013) demonstrated that gGAPDH sequences are more polymorphic than SSU rRNA sequences. Moreover, single copy gGAPDH sequences yield highly consistent alignments free of ambiguities. In fact, despite relationships inferred using SSU rRNA and gGAPDH genes were largely congruent; gGAPDH sequences have produced more strongly supported phylogenetic inferences compared to SSU rRNA. In addition, the combination of these two sequences resulted in better resolved phylogenetic inferences (Hamilton et al., 2004; 2007; Lima et al., 2012, 2013; Fermino et al., 2013).

In this study, phylogenetic analyses based on gGAPDH sequences (Fig. 3) and concatenated SSU

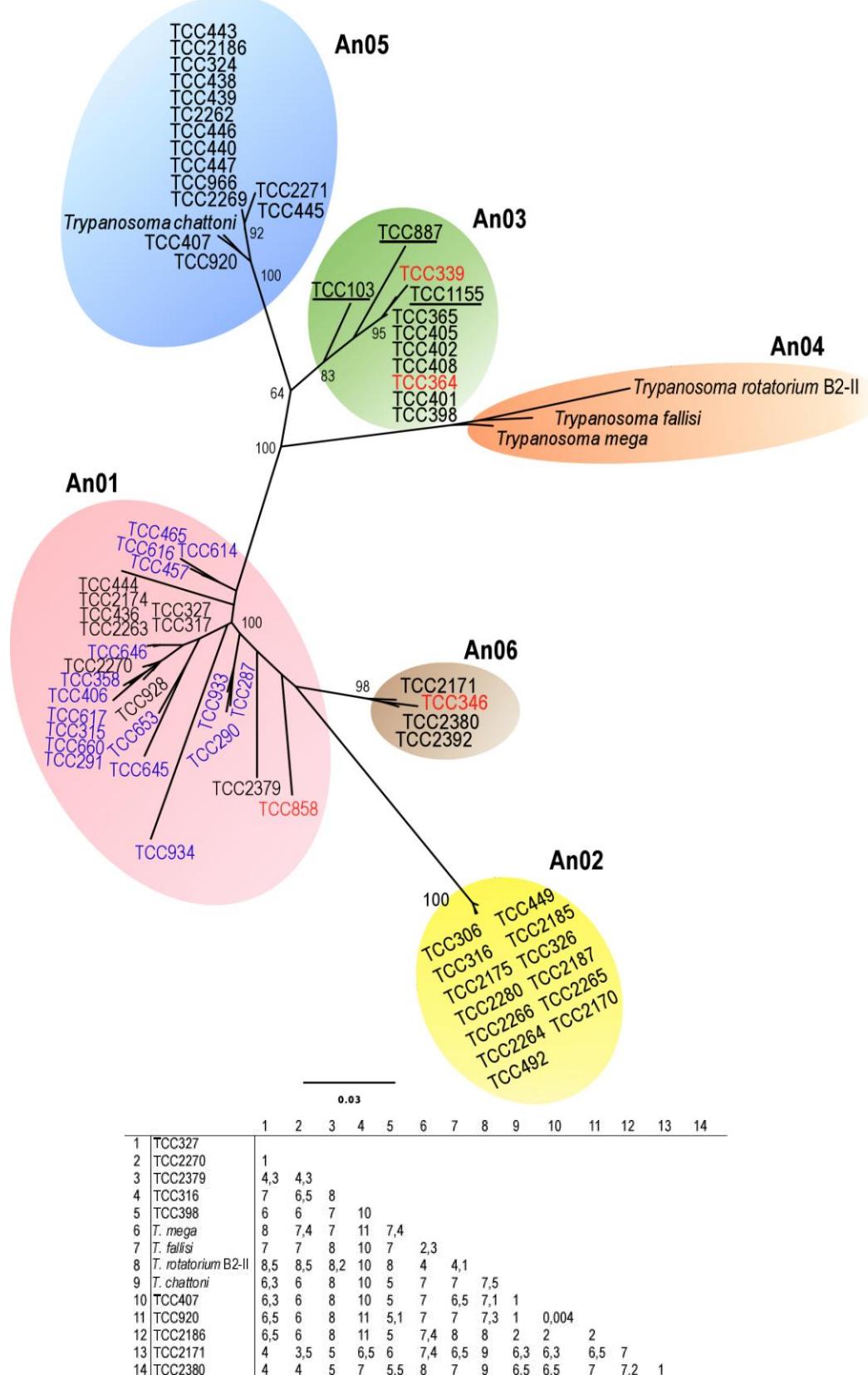
rRNA and gGAPDH sequences (Fig. 4) corroborated the clustering of frog trypanosomes into the major Anura clade, distributed into the main subclades previously evidenced by SSU rRNA and gGAPDH gene analyses (Figs 1, 2). The combined gene analysis resulted in better resolved and well-supported phylogenetic clades. This analysis supported the new clade An06, apparently associated with leptodactylids but also containing a bufonid isolate, as a separated clade, whereas AN01 remains a weakly supported clade (Fig. 4). The analysis of gGAPDH sequences among anuran trypanosomes revealed relevant divergences between the known species and the trypanosomes candidate to new species as suggested by barcoding analysis. The gGAPDH divergences within clades reached 3.3% in the most heterogeneous clades An01, was moderated in An03 (2.0 %), low in An05 (1.0%) and An06 (1.2%); trypanosomes nested into shared almost identical sequences. The gGAPDH divergences inter-clades ranged from 6.0 % between An01 and An06 to 14 % between An02 and An03. Concatenated analyses revealed that at least 12 trypanosomes.

Concatenated analyses revealed that at least 12 trypanosome isolates are candidates to new species, what will considerably increase the number of molecularly validate species of frog trypanosomes until now represented by 6 species (Martin et al., 2002; Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2007, 2008). Taken in account the number of leptodactylid species and localities that have so far been sampled, this work suggests that the species richness of trypanosomes from Leptodactylidae should be very large.

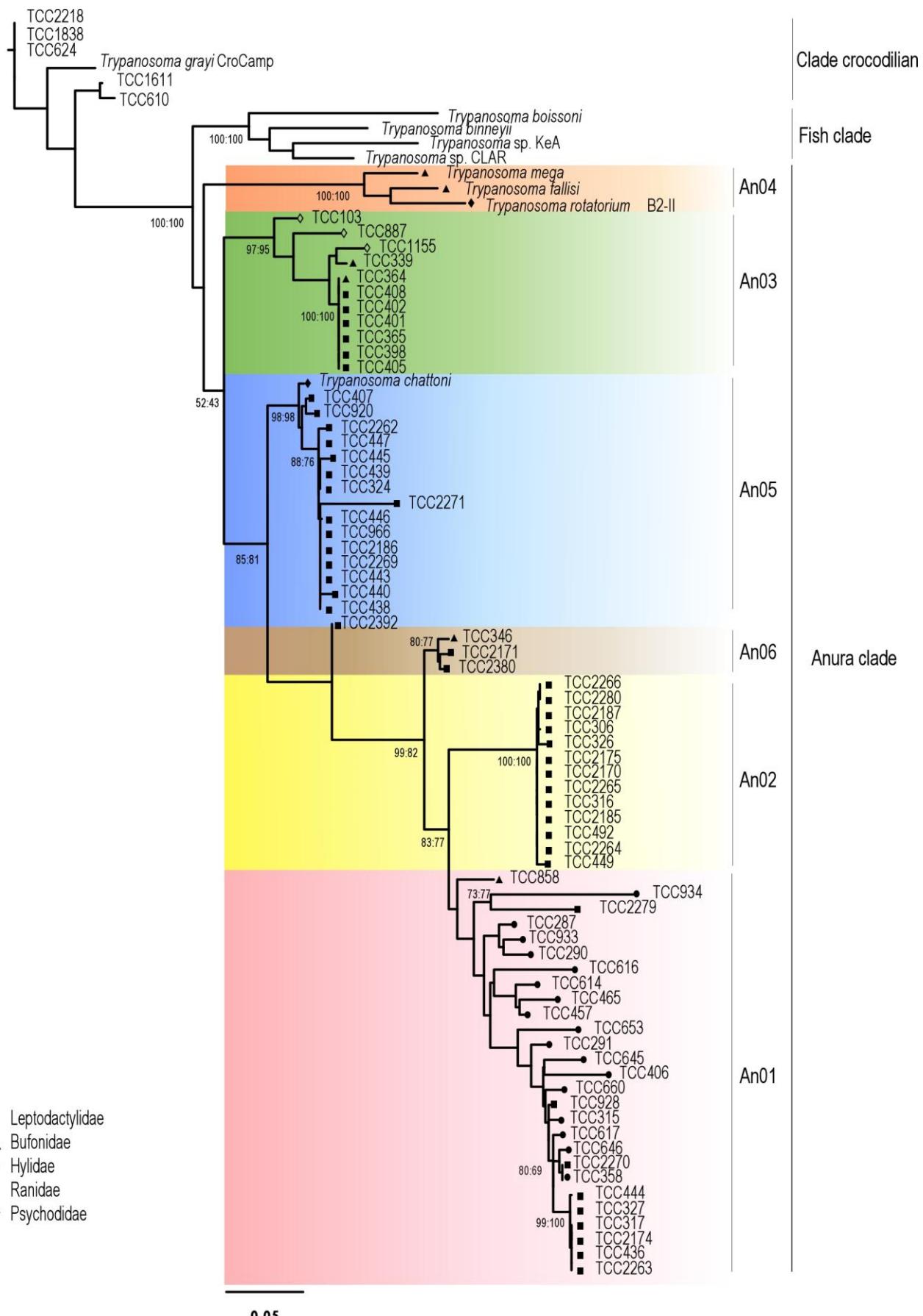
### 3.4. Barcoding by gGAPDH sequences of trypanosomes from archived blood/liver samples

In this study, we used a nested-PCR for the detection of trypanosome gGAPDH gene sequences

directly from DNA preparations from leptodactylid blood  
and tissue samples preserved in ethanol in order to



**Figure 3.** Dendrogram based on maximum likelihood analysis of gGAPDH sequences from anuran trypanosomes from clades An01-06. The colors and symbols are as indicated in Figure 2. The numbers at branches correspond to bootstrap supports derived from 500 replicates. Divergence matrix between trypanosomes candidates to new species and characterized morphologically.



**Figure 4.** Maximum likelihood inference of concatenated V7V8rRNA and gGAPDH of anuran trypanosomes. Trypanosomes of Fish and Crocodilian clades were used as outgroups for the Anuran clade. The numbers at branches correspond to bootstrap supports (ML:P).

uncover trypanosomes not detected by traditional hemoculturing procedures (Tables 2, 3). For surveys of trypanosomes in archived blood/liver samples, we examined 27 blood (Table 2) and 44 tissue (Table 3) samples. We tested blood samples positive for trypanosomes by microscopy and/or hemoculturing, and samples negative for these two methods or not previously examined (Table 2). The PCR tests revealed trypanosomes in 22 and 28 samples of blood and tissue from leptodactylids.

As expected, the nested PCR was more sensitive than haemocultures revealing trypanosome infection in culture-negative samples. Results demonstrated that both blood and liver samples from anurans preserved in ethanol could be used in surveys of trypanosomes. Two cultures and 10 blood/tissue samples showed more than one sequence by PCR-sequencing, which is indicative of mixed cultures with more than one trypanosome, as confirmed by the sequencing of additional clones. As the identification of mixed infections depends on the number of cloned sequences examined, probably more mixed samples could be detected by sequencing a larger number of clones. This finding showed larger diversity in blood samples than in cultures, confirming culturing selection against more fastidious or even non cultivable frog trypanosomes (Tables 2, 3).

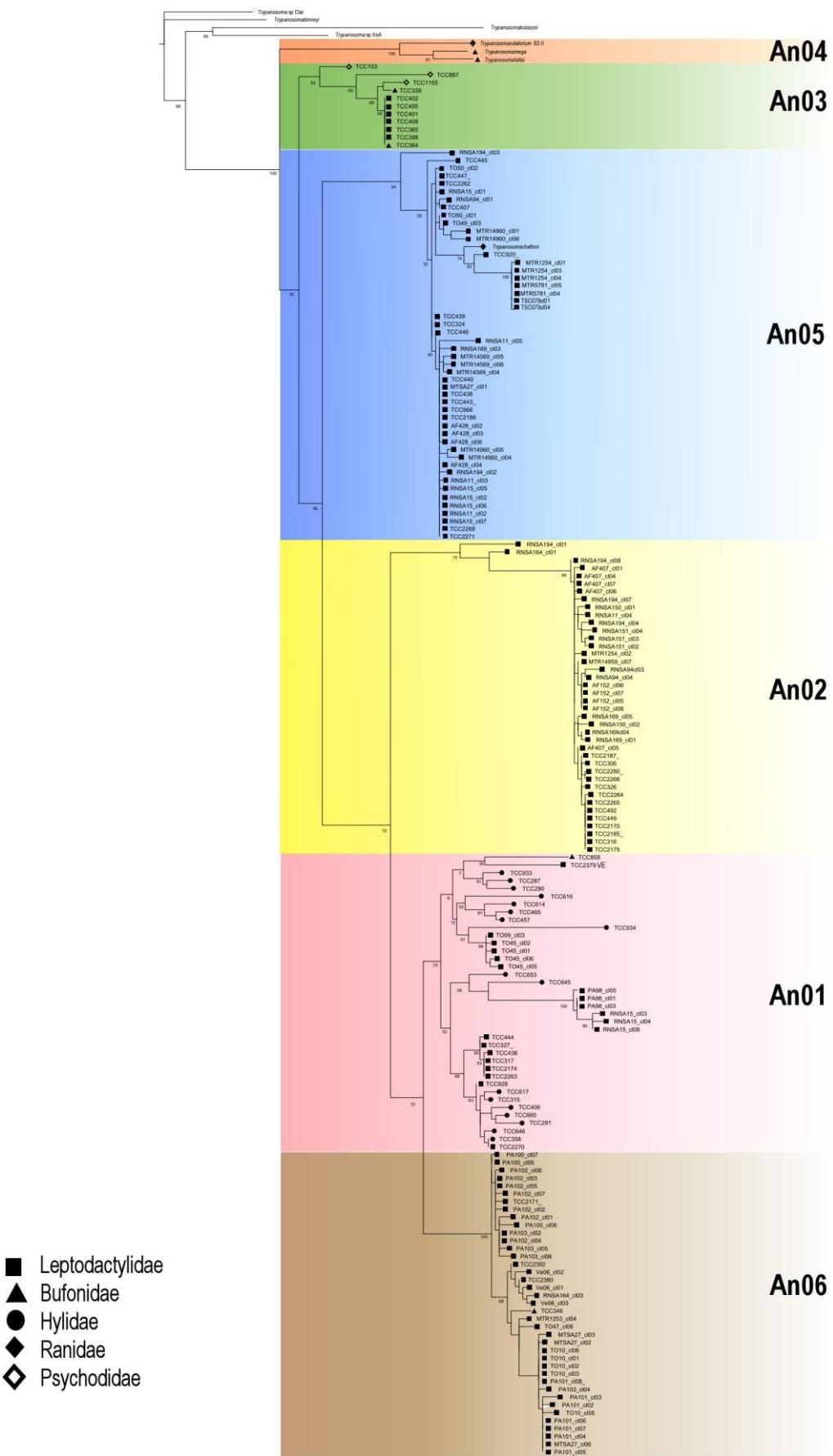
Analyses including all sequences from cultured and blood/tissue trypanosomes strongly enhanced the genetic repertoire of leptodactylid trypanosomes in all biomes investigated. As expected, new genotypes were disclosed by the analysis of PCR amplified samples, including samples from geographical localities not previously studied (Fig. 5). This analysis corroborated the distribution of all sequences from frog trypanosomes into the 6 main clades within the Anura clade of trypanosomes. The marked diversity of anuran trypanosomes disclosed by combining cultured and

uncultured samples from several Brazilian biomes indicates that South American hotspots for frog diversity are also hotspots of anuran trypanosome diversity. In addition, trypanosomes nested into different clades could be found infecting the same host species, sometimes in mixed infections, captured in distinct biomes, confirming that frogs are hosts of diverse trypanosomes lacking both host-species specificity and strong spatial structure.

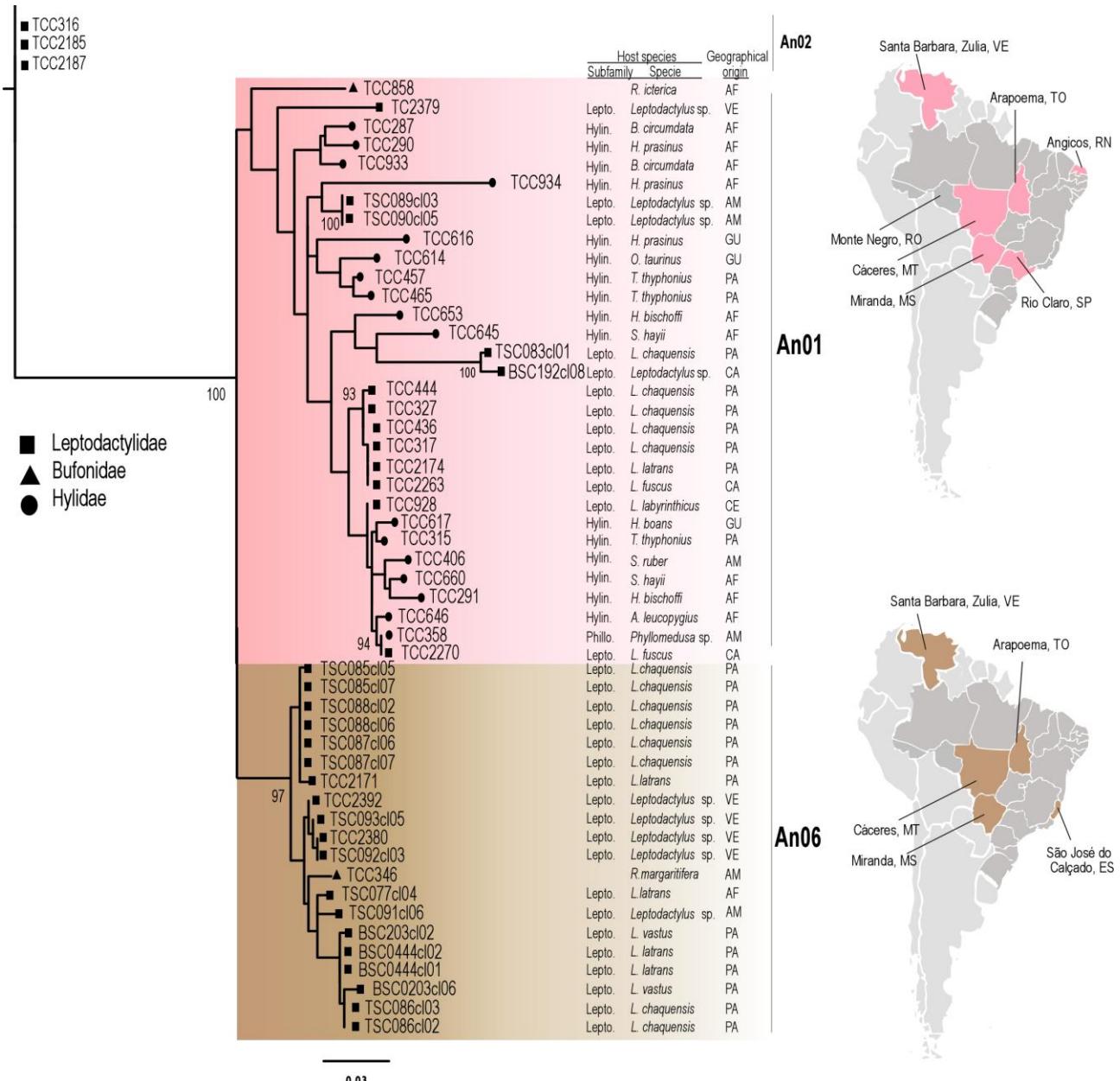
### **3.5. The heterogeneity of hylid, bufonid and leptodactylid trypanosomes forming the clade An01, and the split of the clade An06**

In a previous studies, the clade An01 was associated with trypanosomes of tree-frogs (Hylidae), but also included the isolate TCC444 and TCC928 from a leptodactylid frog (Ferreira et al., 2007). Here, 8 additional isolates of trypanosomes from leptodactylids plus four trypanosome sequences from tissue samples clustered into the clade An01, together with 17 hylid trypanosomes from several biomes (Ferreira et al., in preparation). The trypanosomes of leptodactylids that nested into the clade An01 came from frogs captured in all Brazilian biomes, from Amazonia to the Atlantic Forest and Caatinga (Fig. 6). One trypanosome from bufonid (TCC858) and one from a Venezuelan leptodactylid were placed at the edge of the An01 clade. In general, sequences of trypanosomes from different families branched separately, but some trypanosomes from different host families shared highly similar sequences (Fig. 6).

Therefore, the relationships within the highly heterogeneous clade An01 remains unresolved. This clade showed the most complex and weakly supported internal branching pattern (Fig. 6). The understanding of this clade requires more comprehensive studies of hylid trypanosomes. A large sampling of hylid trypanosomes has been characterized in our laboratory



**Figure 5.** General tree of gGAPDH sequences from all leptodactylid trypanosome isolates based on maximum likelihood. The diagram also includes the sequences obtained from nested PCR of leptodactylid tissues. The numbers at branches correspond to bootstrap supports derived from 300 replicates.



**Figure 6.** Phylogenetic analysis of trypanosomes of clades An01 and An06 based on maximum likelihood indicating isolate hosts and geographic origins. Trypanosomes representatives of clade An02 were used as outgroups. Geographical origins are indicated as: AF (Atlantic Forest), AM (Amazonia), GU (Guapóre), PA (Pantanal), CE (Cerrado) and CA (Caatinga) in Brasil and VE (Venezuela).

and results are corroborating a strong association of An01 and Hylidae (Ferreira et al., in preparation).

In spite of unresolved phylogenetic relationships, the clade An01 comprises several candidates to new species of leptodactylid trypanosomes (besides those from hylids), four of them available in culture. Leptodactylid trypanosomes separated by relevant genetic distances were selected

for morphological characterization: isolates TCC 2379 for morphological characterization: isolates TCC 2379 from *Leptodactylus* sp from Venezuela, TCC327 from *L. chaquensis* from the Pantanal, and TCC 2270 from *L. fuscus* from the Brazilian Caatinga (Results – 3.10).

The SSU rRNA and gGAPDH concatenated phylogenetic tree (Fig. 4), and the analysis of highly comprehensive sampling including trypanosomes from cultures and archived blood/tissues samples (Fig. 5)

supported the separation of 15 samples (4 cultures and 11 blood/tissues samples) clustering tightly together in a separated and strongly supported clade (An06). Contrasting to the large heterogeneity intra clade An01, the clade An06 was very homogeneous (Figs 4-6). This new clade comprises mostly leptodactylid isolates, plus one isolate from bufonid. All hylid trypanosomes remained in the clade An01, where some leptodactylid trypanosomes were dispersed sometimes forming subclades (Fig. 6).

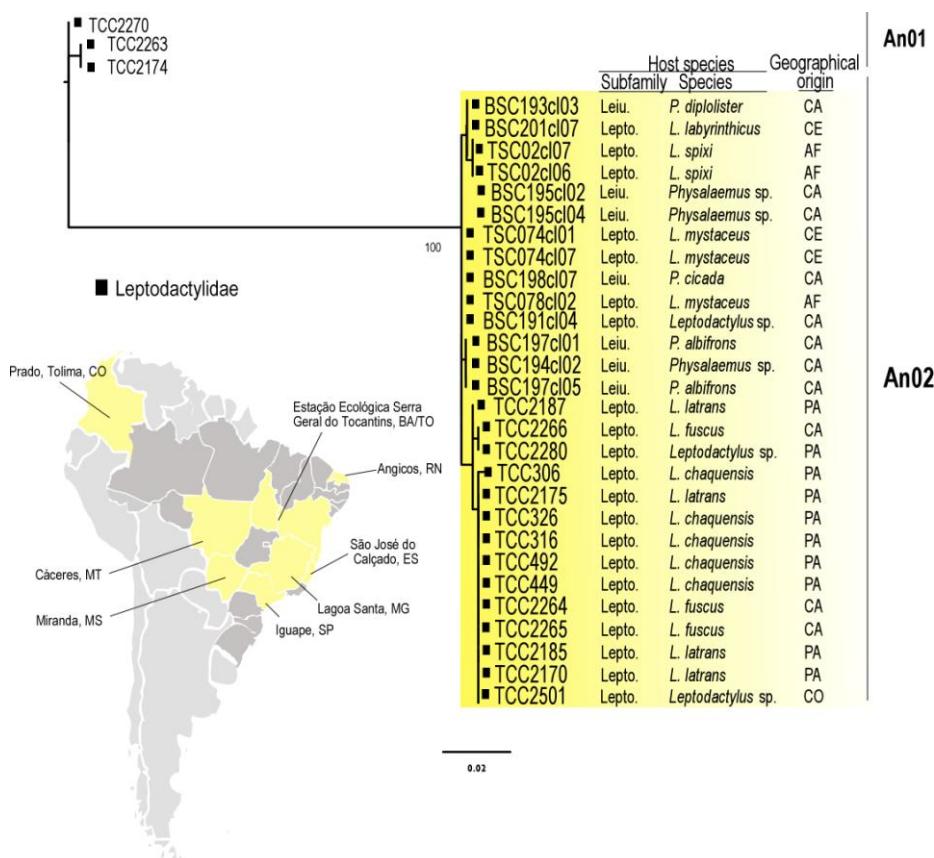
Several trypanosome sequences that nested into the clade An06 derived from blood and tissue samples, whereas only 4 out of 48 cultures of leptodactylid trypanosomes clustered into An06. The trypanosomes of An06 clade were found in diverse host species from the Pantanal and Amazonia, and in leptodactylids from Venezuela. This clade exhibits some degree of geographical structure, with genotypes

found in the Brazilian Pantanal (TCC2171) differing from those found in Venezuela (TCC2392 and TCC2380).

The leptodactylid isolates TCC2171 and TCC2380 are candidates to new trypanosome species selected for further morphological characterization (Results – 3.10).

### 3.6. The An02 clade comprises a single species of diverse host and geographical ranges

The strongly supported clade An02 comprises trypanosomes of six species of *Leptodactylus* from all biomes, except Amazonia. This clade also comprises trypanosomes found in blood samples of Leiuperinae species, all small frogs captured in temporary ponds in the Caatinga, detected exclusively by PCR (Fig. 7).



**Figure 7.** Phylogenetic analysis of trypanosomes of clade An02 based on maximum likelihood indicating isolate hosts and geographic origins. Trypanosomes representatives of clade An01 were used as outgroups. The codes of geographical origins are indicated in figure 6 with the exception of CO (Colombia).

Highly similar and even identical trypanosomes were found in leptodactylids of different subfamilies and species, captured in the Pantanal, Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest Brazilian biomes. In addition, one single trypanosome from Colombia nested into this clade.

The analyses of gGAPDH sequence divergences among the trypanosomes of An02 revealed highly homogeneity and indicated that it is formed by slightly different genotypes of a single species, apparently, widespread in South America. The isolate TCC316) of the clade An02 was selected to be morphologically characterized (Results – 3.10).

### 3.7. The clade An03 comprises a single trypanosome species from Amazonian leptodactylids and bufonids

The clade An03 was previously described by comparison of SSU rRNA sequences of 15 trypanosomes from Bufonidae, Hylidae and Leptodactylidae (4 isolates) from different biomes, besides reference-trypanosomes from Ranidae and Bufonidae from Europe, North America and Africa. An03 was formed by trypanosomes from anurans and sand flies sharing the same habitats in Amazonia. In this previous study, the clade An03 was composed of isolates from Bufonidae and one isolate from each Leiuperinae (TCC408) and Leptodactylinae (TCC 398) (Ferreira et al., 2008).

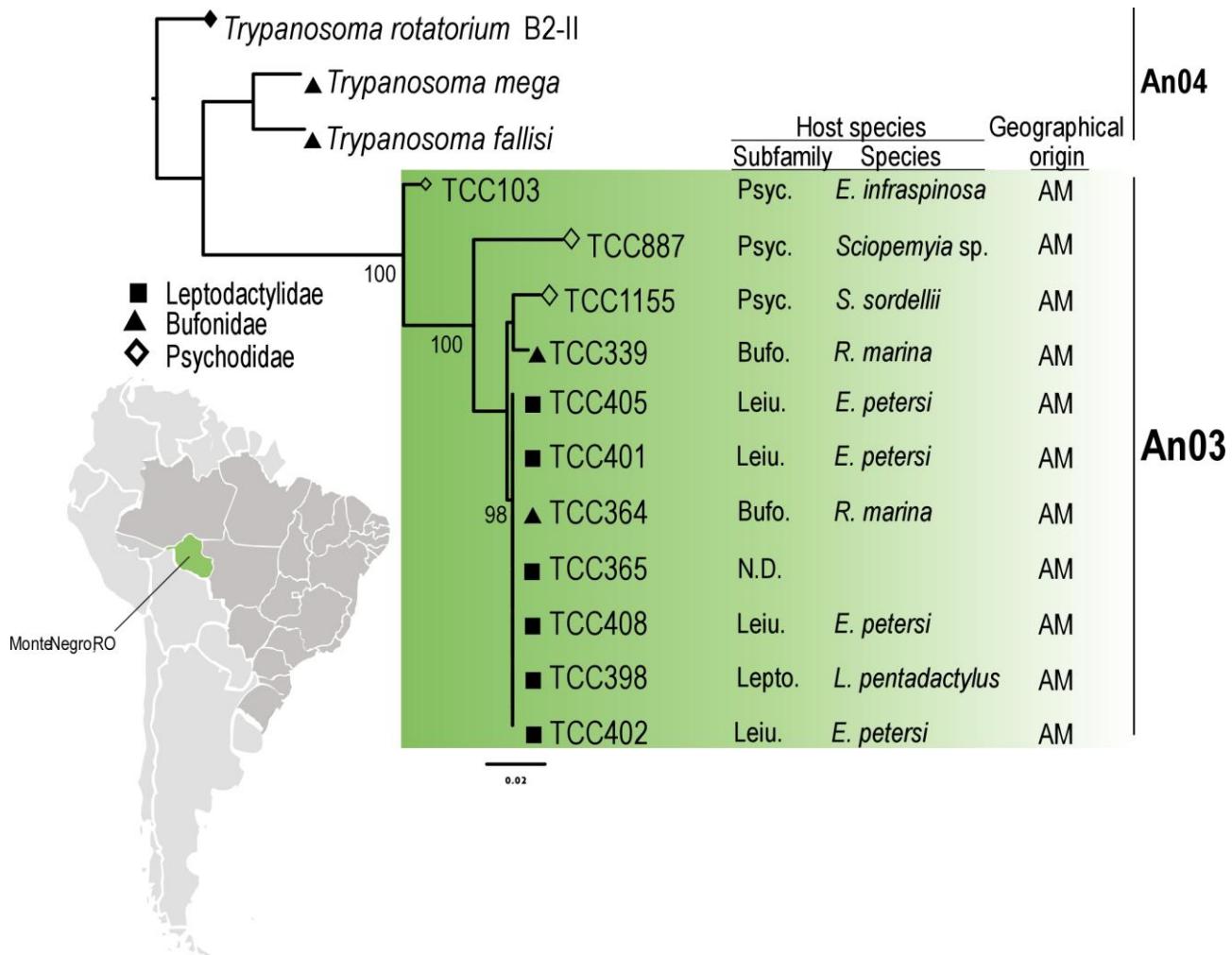
Here, we determined gGAPDH sequences from these isolates and compared their sequences with those of other leptodactylid trypanosomes. Phylogenetic analysis disclosed 5 additional isolates from leptodactylids clustering into the An03, all sharing highly similar sequences with one trypanosome isolated from a sand fly (Fig. 8). Trypanosomes of An03 were isolated from the leptodactylids *L. pentadactylus* and *Engystomops petersi* (Leiuperinae), and also from

bufonids captured in near sites at Western Amazon region, in the State of Rondonia. *Engystomops petersi* from the same collecting site was also found infected by trypanosomes of the clade An05 (Fig. 9).

The lack of trypanosomes of An03 clade infecting a large number of anurans examined from other biomes suggested that this clade may be restricted to the Amazon region (Fig. 8). This and previous studies (Ferreira et al., 2008) supported that closely related trypanosomes from bufonids and leptodactylids are probably transmitted by sand flies in Amazonian ground dwellings habitats.

Interesting, closest to An03 are the bufonid trypanosomes *T. fallisi* and *T. mega*, respectively from North America and Africa, both nested into the clade An04 (Fig. 5). Bufonid trypanosomes in North America were proved to be transmitted by sand flies (Anderson and Ayala, 1968), whereas culicids and frog biting flies (*Corethrella*) has been incriminated as vectors of trypanosomes among frogs (ranids) and tree-frogs (hylids), respectively (Desser et al., 1973; Ramos and Urdaneta-Morales, 1977; Johnson, 1993). Supporting different vectors, maybe determined by terrestrial or arboreal habitats, several specimens of *E. petersi* were found infected by the same trypanosomes, whereas we did not find this trypanosome in tree frogs captured in the same sites (Ferreira et al., 2008; 2015 in preparation).

The analyses of both V7V8 SSU rRNA and gGAPDH sequence divergence of trypanosomes of clade An03 revealed 6 isolates from leptodactylids, two from bufonids, and one from a sand fly sharing almost identical sequences (Fig. 9), hence corresponding to a single species. We selected the isolate TCC398 to be morphologically characterized (Results – 3.10).



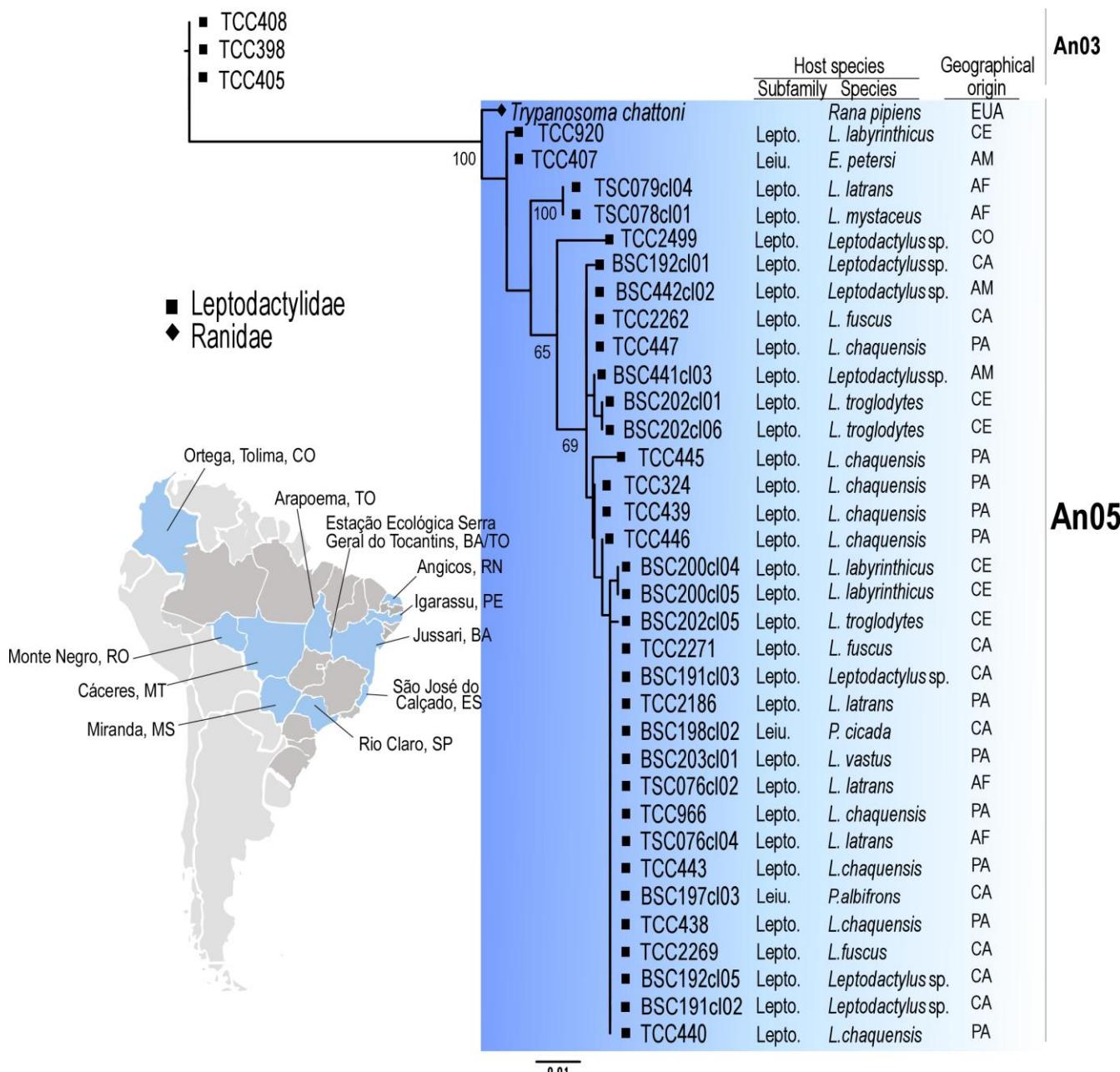
**Figure 8.** Phylogenetic analysis of trypanosomes of clade An03 based on maximum likelihood indicating isolate hosts and geographic origins. Trypanosomes representatives of clade An04 were used as outgroups. The codes of geographical origins are indicated in the legend of Figure 6.

### 3.8. The clade An05 comprises trypanosomes from leptodactylids related to *T. chattoni* from a North American ranid

The clade An05 was the second more heterogeneous clade after An01, comprising more than 10 genotypes (Fig. 9). In our previous study, *T. chattoni* was placed as an independent phylogenetic lineage (An05) closest to clade An03 (Ferreira et al., 2008). The problematic positioning of *T. chattoni* in phylogenetic trees based on SSU rRNA sequences (Martin et al., 2002, Gibson et al., 2005, Hamilton et al., 2007) was well-resolved here using both SSU rRNA

and gGAPDH sequences. Phylogenetic analyses permitted to add sequences from 30 samples of trypanosomes (small divergences revealing 5 genotypes) into the strongly supported An05 clade, with *T. chattoni* as the more basal species (Figs 4, 5, 9).

Two leptodactylid trypanosomes (TCC407 and TCC920, respectively, from *E. petersi* (Amazonia) and *L. labyrinthicus* (Cerrado) showed sequences highly similar (~1.0% GAPDH sequence divergences) to that of *T. chattoni* (Fig. 9). In addition, one isolate (TCC429) from Colombia showed a quite different sequence (Fig. 9).



**Figure 9.** Phylogenetic analysis of trypanosomes of clade An05 based on maximum likelihood indicating isolate hosts and geographic origins. Trypanosomes representatives of clade An03 were used as outgroups. The codes of geographical origins are indicated in the legends of figures 6 and 7.

Besides these trypanosomes, the clade An05 was mostly formed by a large assemblage of 13 cultured trypanosomes sharing similar gGAPDH sequences distributed into 5 closely related genotypes, plus three additional genotypes detected only by PCR. All these trypanosomes were obtained from 7 species of *Leptodactylus*, captured in all biomes investigated (Fig. 9). To compare growth behavior and morphological features, we selected two cultures, one

from a trypanosome closely related to *T. chattoni*, TCC 920, and the isolate TCC 2186 representing the larger assemblage within the clade An05 (Results – 3.10).

### 3.9 Species delimitations and cultures of candidates to new trypanosome species

For decades, few cultures of anuran trypanosomes were available in the American Type Culture Collection (ATCC): *T. rotatorium*, *T. chattoni*, *T.*

*fallisi*, *T. mega*, *T. neveulemairei* and *T. ranarum*. In the last decade, we isolated and adapted to continuous cultures a large number of trypanosomes from Brazilian frogs (described in this study) as well as from toads and tree frogs (Ferreira et al. 2007, 2008, in preparation).

For a consistent appraisal of the genetic diversity of anuran trypanosomes it is crucial that they be surveyed directly in host blood/tissues samples to avoid biases due to culture selection of species/genotypes. This approach disclosed a trypanosome diversity larger than that resulting from the analyses of cultured trypanosomes (Fig. 5). For example, several samples of the small frogs of Leiuperinae negative for trypanosomes by hemoculturing turned positive by nested-PCR. This approach also demonstrated a common occurrence of mixed infections in a single host species as well as in a single host specimen (Tables 2, 3).

To date, no trypanosomes recovered from leptodactylids and named by morphological comparison with existing anuran species, such as *T. leptodactyli*, *T. ocellati*, *T. celestinoi* and *T. arcei* were validated by molecular phylogenetic analysis. To our knowledge, they also are not cultivated and/or are not available in culture collections. In the absence of any DNA sequence, we could not compare these species with the candidates to new species identified in this study.

All candidates to new trypanosome species selected in this study were separated by at least 1% gGAPDH sequence divergences and well-supported phylogenetic positioning as independent evolutionary lineages. For comparison, ~2.0% gGAPDH sequence divergences separate two trypanosomes from bufonids captured in different continents: *T. mega* from Africa and *T. falisi* from Canada. The sequence divergence between *T. chattoni* from North America ranid and its closest relative trypanosomes (TCC 920 and TCC 407) from Brazilian leptodactylids is ~1% for both isolates.

Although the levels of divergence among the isolates selected as candidates to new species leave little doubt that they correspond to yet undescribed species, there is a certain distance between identifying the sequences attributable to a new species and the formal description of a new species. Currently, there is consensual recommendation that, desirably, the description of new trypanosomatid species requires culturing and documentation of morphological characteristics of a reliable type material. At our laboratory, information gathered from phylogenetic analyses, biogeography, hosts and vector range, and morphological/ultrastructural analyses of cultured trypanosomes have been used to identify evolutionary independent lineages as new species. This integrative approach were employed in the description of new trypanosomes species and genotypes infecting bats (Lima et al., 2012, 2013), snakes (Viola et al., 2009), crocodilians (Fermino et al., 2013) and fishes (Lemos et al., in preparation). We are pursuing the same goals for the future description of new species of anuran trypanosomes. The integration of data and the analysis of potential evolutionary scenario for the trypanosomes candidates to new species lies beyond the scope of this paper. However, to illustrate the morphological diversity showed by these trypanosomes, we report bellow some morphological features of 8 trypanosomes selected as representatives of the genetic diversity within each clade: An01 (TCC 327, 2270 and 2379); An02 (TCC 316); An03 (TCC 398); An05 (TCC 920 and TCC 2186); and An06 (TCC 2380 and TCC2171).

### 3.10. Development in cultures and morphological characterization of candidates to new trypanosome species

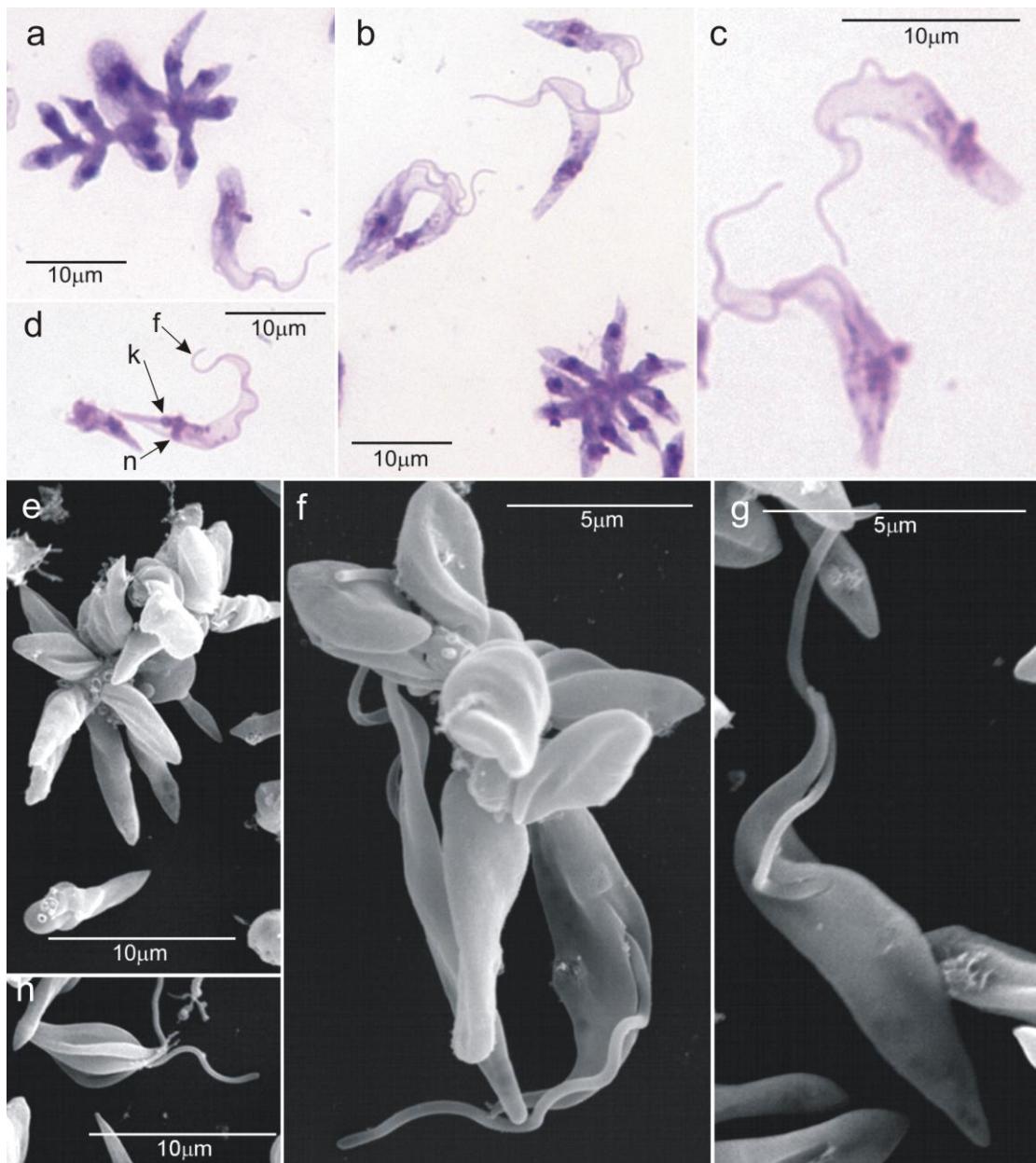
All the 48 cultures of trypanosomes from leptodactylid frogs molecularly characterized in this study are cryopreserved in the TCC-USP (Table 1).

The availability of cultures allows comparative analyses of culture behaviour, cell development, morphological and ultrastructural features, therefore, can much improve the description of new trypanosome species, and provide relevant insights for the understanding of phylogenetic relationships and evolution of anuran trypanosomes and of the whole genus *Trypanosoma*.

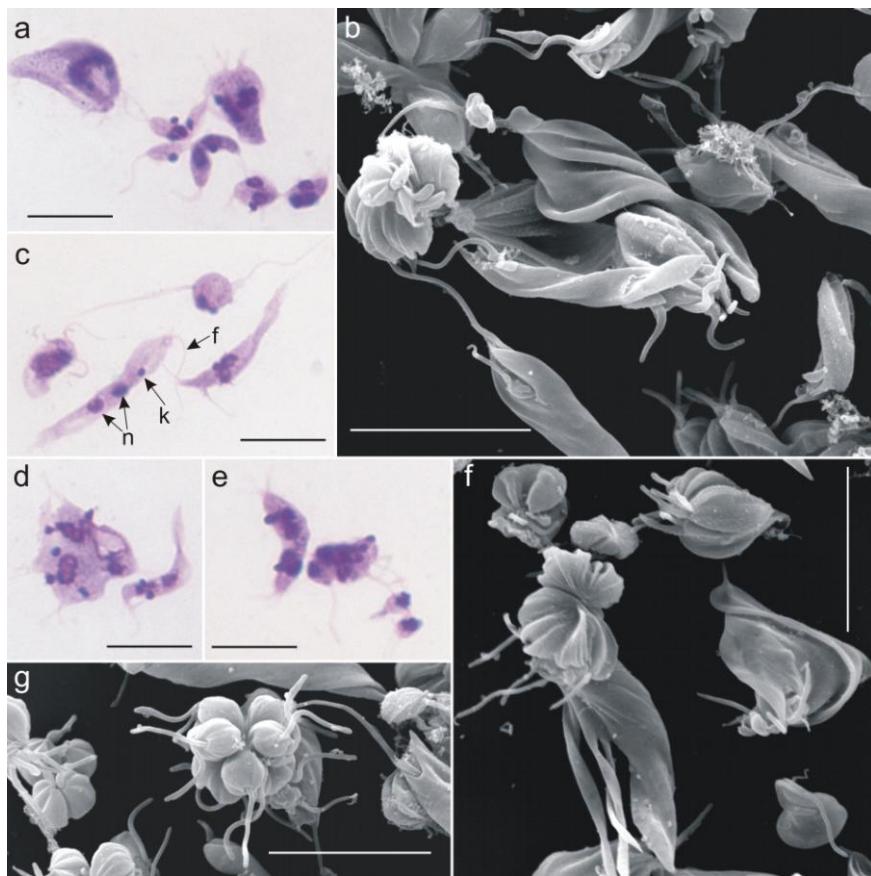
For the analysis of behavioural and cellular development on cultures, the trypanosomes selected for this study were co-cultivated with Hi-5 insect cells in TC100 medium at 25°C. Most trypanosomes could not be cultivated by successive passages for long time without feeder cells. The selected trypanosomes exhibited a general development in cultures. In the early phase, the cultures exhibited rounded small flagellates adhered by the anterior ends (flagellar region), forming small clusters that in general progress to clusters of gradually elongating epimastigotes attached by flagella (rosettes). Rounded, short and long epimastigotes multiply within clusters, before being released as free epimastigotes. logarithmic-cultures, epimastigotes of different cultures vary in shape, length and width of their bodies and in the length of free flagellum. A simple optical inspection of cultures, from logarithmic to stationary phase, either in phase-microscopy of fresh preparations or in Giemsa-stained smears, revealed remarkable morphological differences among the cultures examined (Figs. 10-14). The analyses of the selected isolates by Scanning Electron Microscopy (SEM) of cultures ranging from logarithmic and stationary phase corroborated general morphological features observed by light microscopy, and highlighted special features of each cultures, especially when flagellates from different clades were compared. Microphotographies of flagellates from each isolate were selected to illustrate their general

development in culture examined by light and SEM microscopy.

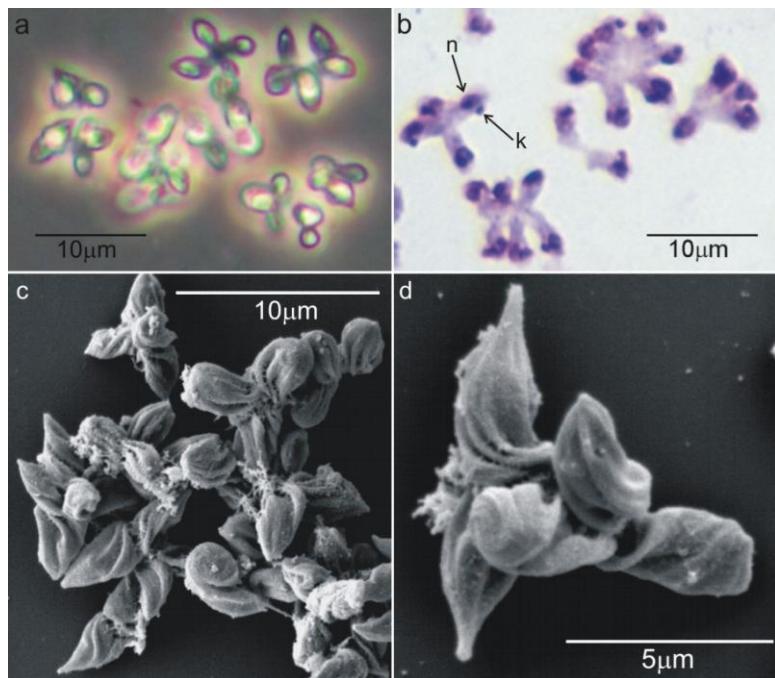
**Clade An01.** In agreement with the genetic distances separating the isolates, cell development and morphology of culture forms of the isolates TCC 327, TCC 2270 and TCC 2379 show remarkable differences, from early to stationary phase cultures. Interestingly, even cultures separated by small divergences such as TCC 327 and TCC 2270, show a set of morphological peculiarities. Although early cultures of the three isolates exhibit clusters of small forms, size and shape of the small forms vary as well as the arrangements maintaining the parasites united (Figs. 10-12). Flagellates of TCC 2270 are, in general, arranged in rosettes adhered by anterior ends, and free epimastigotes gradually develop to wide forms with many-folded undulant membranes. The kinetoplast is large and adjacent to the nucleus that is dislocated toward the posterior extremity (Fig. 10A). The isolate TCC 327 is very peculiar regarding the clustering of small dividing forms. Differing from all other isolates, this isolate show small rounded forms adhered by the posterior ends. These forms developed by multiple fissions into squash-like forms showing many flagella, which also multiply and become long forms with multiple ridges that give rise to free-swimming epimastigote forms (Fig. 10B). In early cultures, the isolate TCC 2379 show typical rosettes of small forms adhered by the anterior ends with pointed posterior ends and many grooves. These forms multiply giving origin to many small clusters that, in contrast to all other cultures, remain attached even in stationary phase cultures (Fig. 10C).



**Figure 10 A.** *Trypanosoma* sp. from *L. fuscus*, biome Caatinga - isolate TCC 2270 of the clade An01: Giemsa-stained culture forms (a, b, c, d) and scanning electron microscopy (e, f, g, h). Logarithmic cultures showing rosettes (a, b, e); epimastigotes (c, f, g) and trypomastigotes (d). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f).



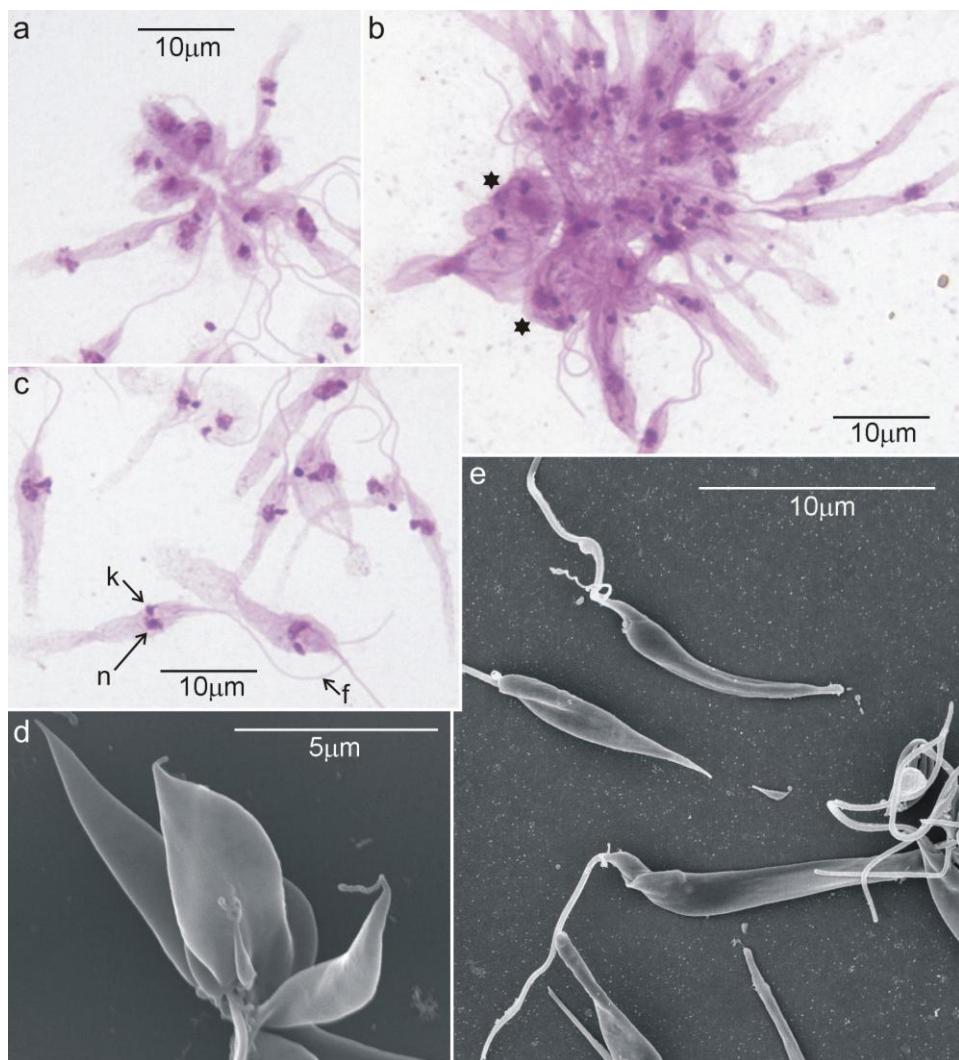
**Figure 10 B.** *Trypanosoma* sp. from *L. chaquensis*, biome Pantanal - isolate TCC 327 of the clade An01: Giemsa-stained culture forms (a, c, d, e) and scanning electron microscopy (b, f, g). Logarithmic cultures showing small clusters (a, e); rosettes of parasites adhered by the posterior ends (a, e, g), and multiple-fission forms with many kinetoplasts, nucleus and flagella (a, d, e); long epimastigotes dividing forms (b, f). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f). Bars=10  $\mu$ m.



**Figure 10 C.** *Trypanosoma* sp. from *Leptodactylus* sp., biome Tropical rainforest - isolate TCC 2379 of the clade An01: Logarithmic cultures observed by phase microscopy (a), Giemsa-stained smears (b) and scanning electron microscopy (c, d). Rosettes of pointed small flagellates adhered by the anterior ends (b, c, d). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f).

**Clade An02.** The clade An02 comprises a single species of trypanosome and the isolate TCC 316 was selected to represent this species in the comparative morphological analyses of frog trypansomes by light microscopy and SEM. In Giemsa-stained smears of log- cultures of TCC 316, small and oval forms are adhered by the anterior extremities and developed to large rounded forms with many nucleus and kinetoplasts (squash-like forms) that suffer multiple fissions giving origin to rosettes of slender epimastigotes that get longer still adhered by

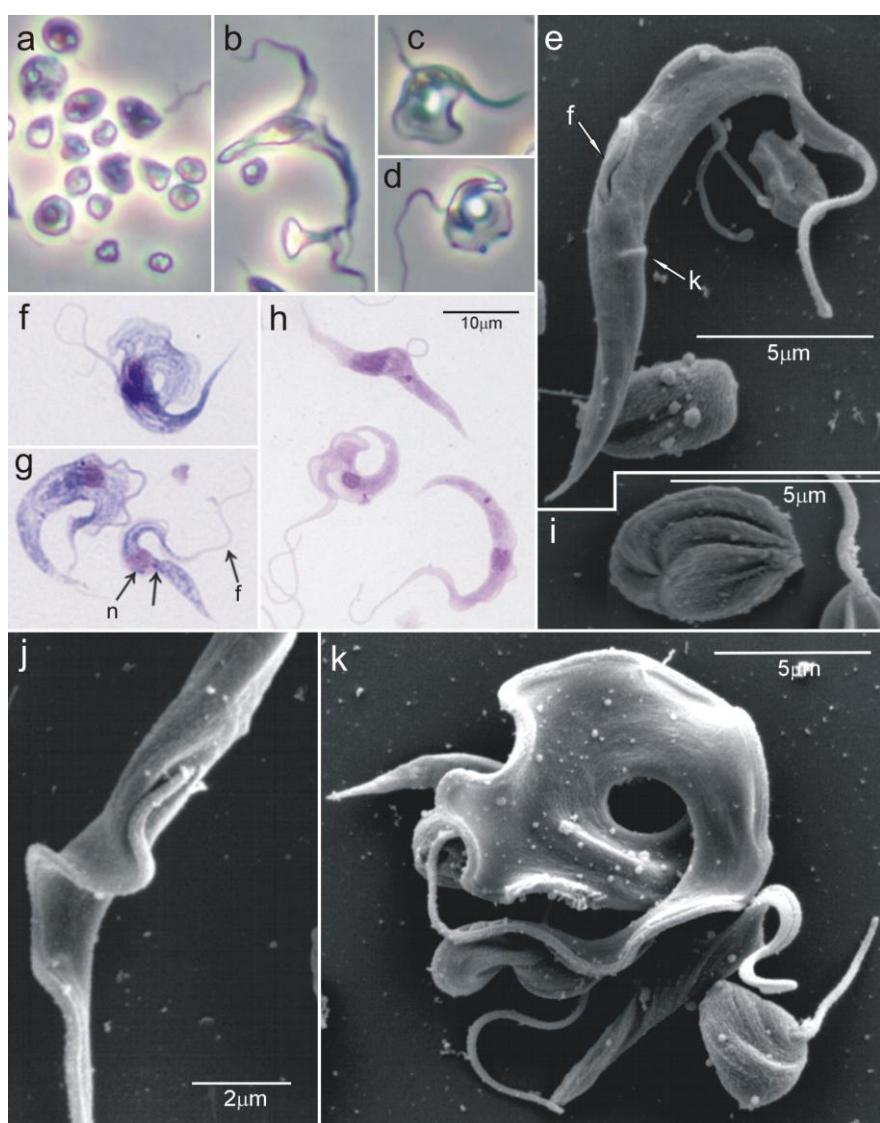
flagella; epimastigotes released from rosettes became large and broad. The small rod-shaped kinetoplasts occupy a marginal position adjacent to the nucleus that is, in general, dislocated toward the anterior end. The epimastigotes typically divide by binary fission while rounded flagellates divided by multiple fissions as squash-like forms. In mid-log cultures, slender epimastigotes many times exhibit twisted bodies, but trypomastigote forms were never observed in cultures of TCC 316 (Fig. 11)



**Figure 11. *Trypanosoma* sp. from *L. chaquensis*, biome Pantanal - isolate TCC 316 of the clade An02:** Giemsa-stained culture forms (a, b, c) and scanning electron microscopy (d, e). Logarithmic cultures showing rosettes of epimastigote forms attached by flagella (a, b) and multiple fissions (stars), clusters of pointed forms (d), and slender epimastigotes with long flagella (e). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f).

**Clade An03.** Optical and SEM electron microscopy of cultured trypanosomes of the isolate TCC 398 showed many peculiarities of this isolate that is extremely morphologically different from any other trypanosomes from leptodactylids examined in this study. Log-phase cultures showed small forms, many times in clumps, which are multiple-fission forms with many grooves as evidenced by SEM. Together with small forms with short free flagellum, some flagellates became very broad and large epi- and trypomastigotes, assuming a roll-shape with a markedly frilled undulating

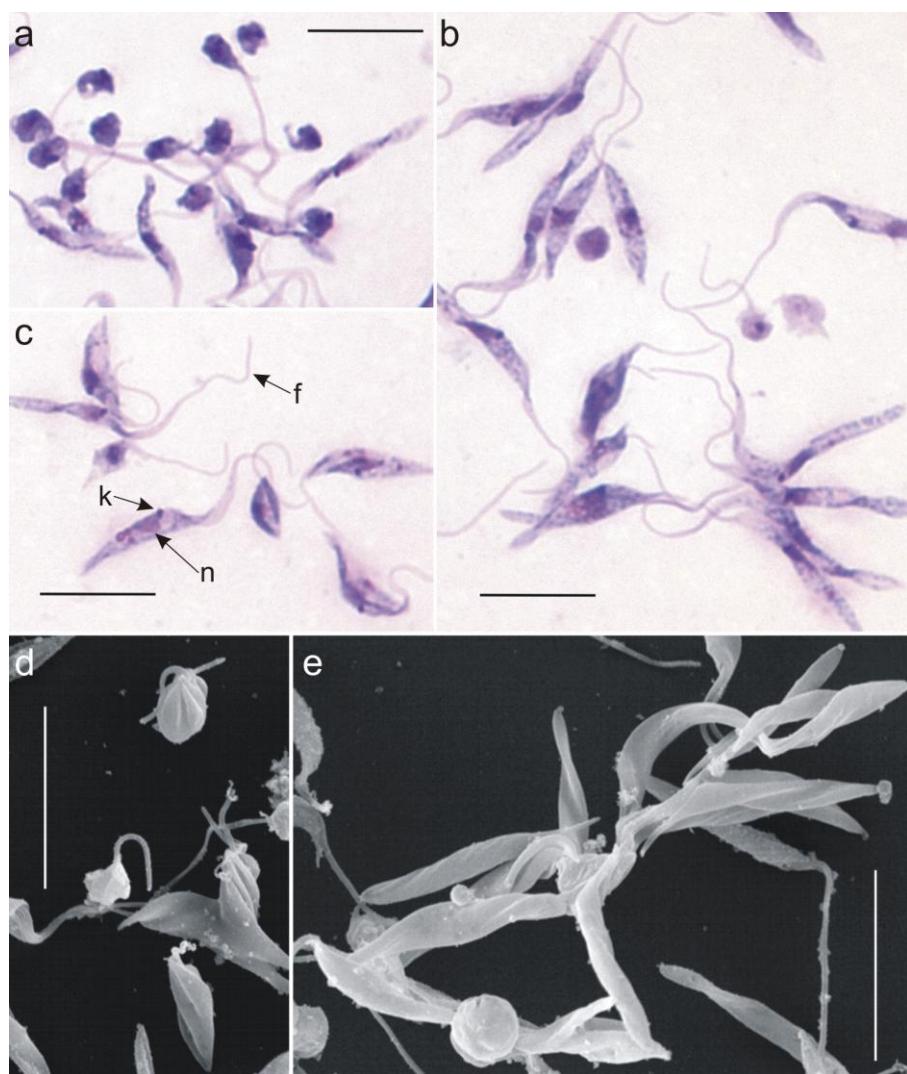
membrane, a pointed posterior extremity, long free flagellum and a very small kinetoplast adjacent to the central nucleus. The cultures of TCC 398 exhibited a large number of C-shaped slender trypomastigotes with a pointed posterior end and long free flagellum (Fig. 12). Interestingly, the broad and roll-shaped flagellates observed in cultures of the frog trypanosomes TCC 398 resemble very much culture forms from trypanosomes of snakes (Viola et al., 2009) and crocodilians (Fermino et al., 2013).



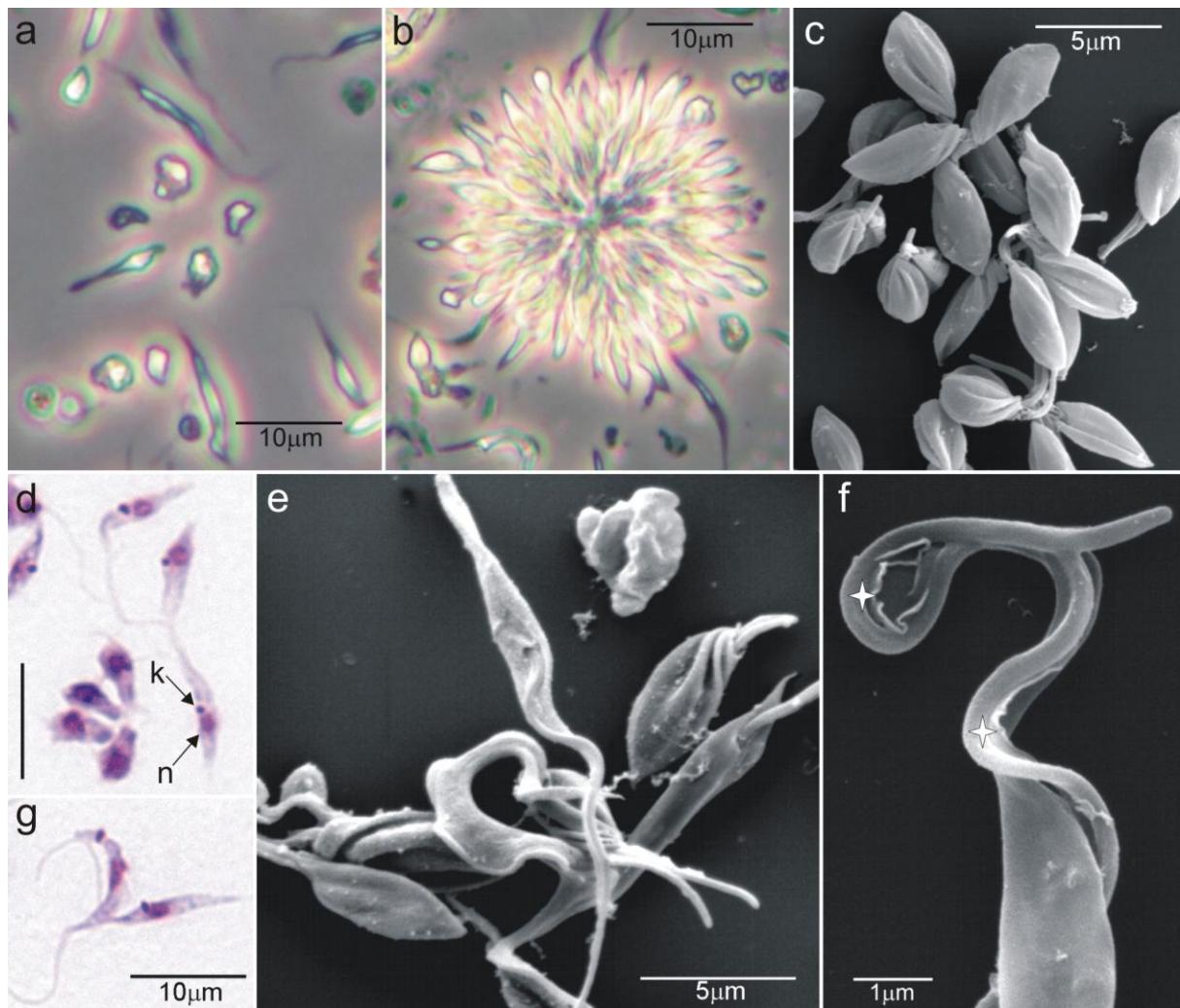
**Figure 12.** *Trypanosoma* sp. from *L. pentadactylus*, biome Amazonian - isolate TCC 398 of the clade An03: Logarithmic cultures showing clumps of rounded forms (a), dividing epimastigotes (b) and roll-shaped flagellates (c, d) observed by phase microscopy. Giemsa-stained smears showing broad flagellates with noticeable undulant membrane (f, g) and trypomastigote forms (g, h). Scanning electron microscopy showing slender trypomastigote (e), rounded forms without free flagellum (i), and the emergence of flagellum in epimastigote (j), broad, slender and rounded flagellates (k). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f).

**Clade An05.** The clade An05 comprises a large subclade of frog trypanosomes sharing highly similar gGAPDH sequences, which was separated from two isolates (TCC 920 and TCC 407 that represent a single species) more related to *T. chattoni*. For morphological analyses, we selected the isolate TCC 920 and one isolate (TCC 2186) representative of the major subclade. Both isolates exhibited in the early cultures, small and rounded flagellates, which do not form large clusters, especially in cultures of TCC 920. Log- cultures of TCC 920 show epimastigotes of variable length, with many slender epimastigotes that can be attached by the anterior end forming bouquets

of flagellates with long free flagella. These slender epimastigotes are observed by SEM as scrambled groups of flagellates (Fig. 13A). The isolates TCC 2186 show small oval forms forming rosettes with 4-5 flagellates. Flagellates detached from clusters are epimastigotes ranging from small to medium size, with short undulant membrane, punctual kinetoplast lateral and very close to the large circular nucleus. Besides typical epimastigotes, cultures of the isolate TCC 2186 show long and slender trypomastigote forms with noticeable undulant membrane and long flagellum (Fig. 13B).



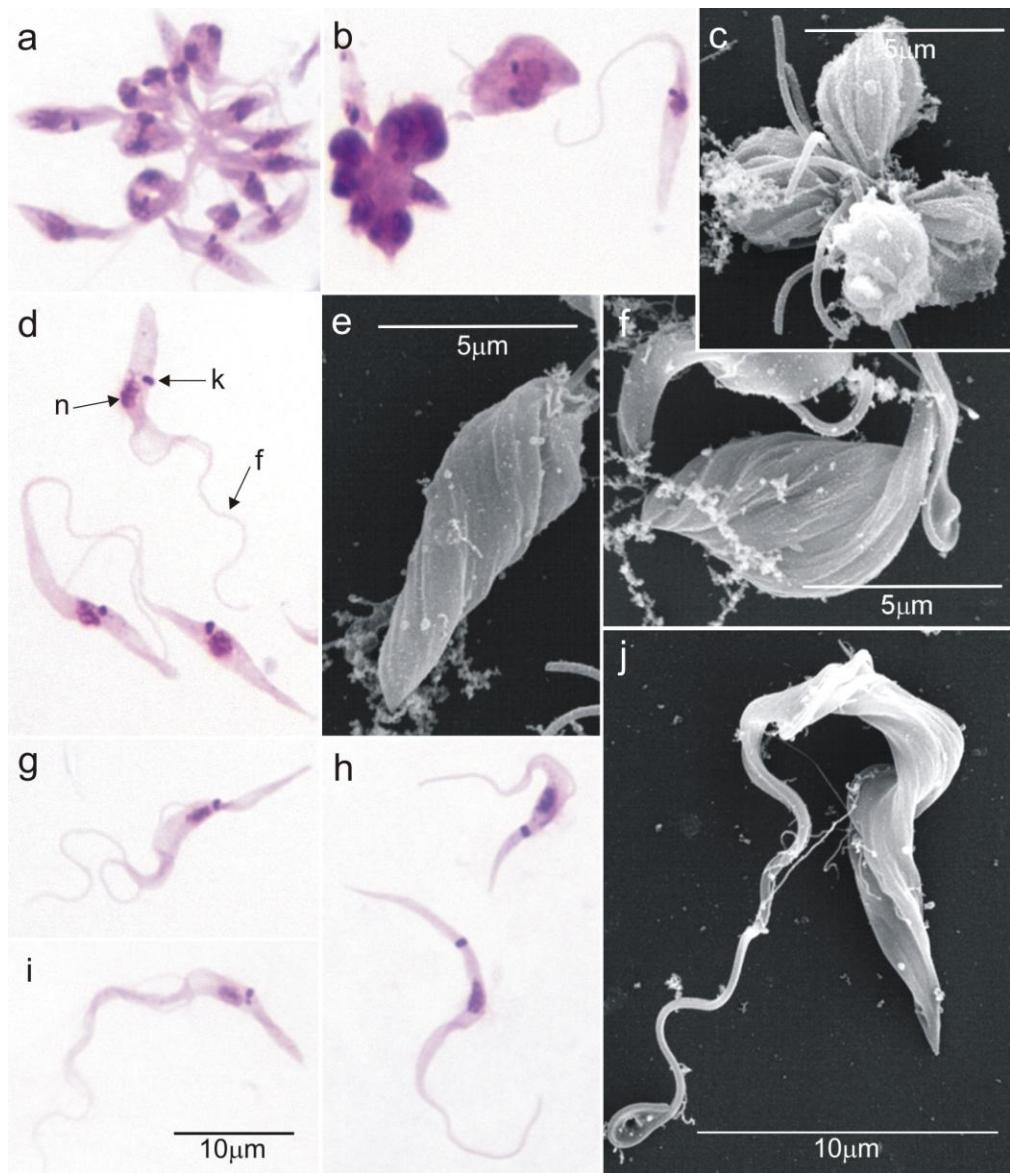
**Figure 13 A.** *Trypanosoma* sp. from *L. labyrinthicus*, biome Cerrado - isolate TCC 920 of the clade An05: Giemsa-stained smears of logarithmic culture (a, b, c) and scanning electron microscopy (d, e) showing rounded forms and short epimastigotes (a, d), epimastigotes (b, c, e), and clumps of epimastigotes (b, e). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f). Bars=10 um.



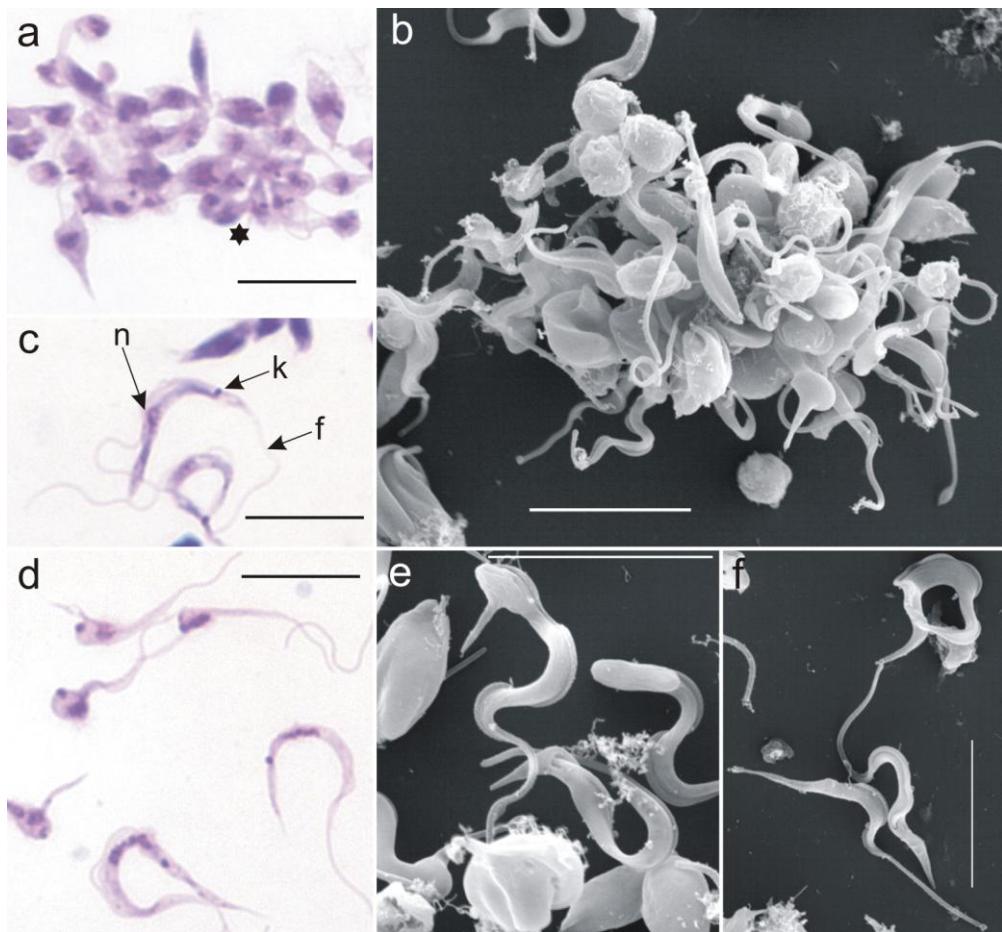
**Figure 13 B.** *Trypanosoma* sp. from *L. latrans*, biome Amazonia - isolate TCC 2186 of the clade An05: Logarithmic cultures observed by phase microscopy showing small forms (a) and rosettes of slender forms (b); Giemsa-stained culture smears showing epimastigotes (d). Scanning electron microscopy of clumps of small dividing forms (c), epimastigote with many grooves and long and slender trypomastigotes (e), and enlarged portion of anterior region with expanded membrane of flagellum (f, stars). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f).

**Clade An06.** Although the trypanosomes nested in the clade An06 were phylogenetic related to those of clade An01, the two isolates selected for morphological characterization in this study, TCC 2380 and TCC 2171, largely differ from the tree isolates examined from the clade An01 as well as from isolates from other clades. Cultures of the isolates show typical clusters of small forms, which develop to rosettes from which small epimastigotes are released. Cultures of

these two isolates show slender free-swimming epimastigotes with short undulant membrane, long free flagellum and punctual kinetoplast. However, in epimastigotes of TCC 2380 the kinetoplast is adjacent to the nucleus, whereas the kinetoplast of TCC 2171 is positioned at the anterior end. Interestingly, the two isolates exhibit large number of long, thin and pointed trypomastigote forms, even in logarithmic cultures (Fig. 14 A,B).



**Figure 14 A. *Trypanosoma* sp. from *Leptodactylus* sp., biome Tropical rainforest - isolate TCC 2380 of the clade An06:** Logarithmic cultures observed by Giemsa-stained smears showing rosettes of short epimastigotes (a) dividing forms, slender epimastigotes with noticeable undulant membrane (b, d,) and long and thin trypomastigotes (g, h, i). Scanning electron microscopy showing a cluster of small forms (c), short epimastigote (f), epimastigote (e) and trypomastigote (j). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f).



**Figure 14 B. *Trypanosoma* sp. from *L. latrans*, biome Pantanal - isolate TCC 2171 of the clade An06:** Logarithmic cultures showing clumps (\*) of rounded forms (a), epimastigote (c) and trypomastigotes (d) in Giemsa-stained culture smears. Scanning electron microscopy showing a cluster of rounded and slender forms (b), and trypomastigote forms (e, f). Kinetoplast (k), nucleus (n), flagellum (f). Bars=10 um.

### 3.11. Morphology of blood trypomastigotes in blood smears

Traditional taxonomic morphological parameters of blood trypanosomes morphology is handicapped by uncertainties posed by the existence of mixed infections. In frogs, mixed infections are frequent and blood trypanosomes exhibited the most remarkable morphological diversity, this parameter is indeed of little help to identify species of trypanosomes. In this study, the microscopy of Giemsa-stained blood smears revealed high polymorphism of trypomastigotes from different anuran species as well as in different individuals and even in a single specimen of frog (data not shown). These findings agreed with our previous

observation that anuran blood trypanosomes can be distributed into at least 12 major morphotypes (Ferreira et al., 2007; 2008). In this study, the morphotype resembling the blood trypomastigotes of *T. rotatorium* were the most common, followed by a range of forms including the morphotype resembling *T. chattoni*. However, the occurrence of *T. rotatorium* or, even any closely related species, was never molecularly confirmed in the South American anurans examined in this and in previous studies (Ferreira et al., 2007; 2008). This finding once again demonstrates that morphology of blood forms is not a reliable parameter to identify anuran trypanosomes.

It will be interestingly to investigate whether the isolates from leptodactylids closely related to *T.*

*chattoni* identified in this study, TCC 920 and TCC 407, have blood trypomastigotes similar to circular and aflagellated trypomastigotes typical of *T. chattoni*. These peculiar forms were never observed in cultures. However, the description of blood trypomastigotes requires experimental infections of laboratory-raised frogs with cultured flagellates, which is a very difficult task.

## CONCLUSIONS

The species richness and evolutionary history of anuran trypanosomes is complex and far from being understood. Better understanding of the genetic diversity, lineage segregation, phylogenetic relationships, and possible evolutionary scenarios that could account for clade divergence require the analysis of large samplings of anuran trypanosomes from wide host-species and eco-geographical ranges. In this study, we surveyed for trypanosomes in blood samples of more than 266 leptodactylids by microscopy, hemoculturing and PCR. Species richness and ecological and biogeographical patterns were assessed by comparing V7V8 SSU rRNA and gGAPDH sequences of trypanosomes from leptodactylids with available sequences from trypanosomes of other anuran families, captured in the Brazilian biomes of the Pantanal, Amazonia, Atlantic Forest, Cerrado and Caatinga and, in addition, from a few samples from Venezuela and Colombia.

Our comprehensive phylogenetic study of trypanosomes in cultures and archived blood/tissue samples strongly supported their distribution in 6 major clades (An01-An06), comprising trypanosomes of diverse leptodactylid species from different Brazilian biomes. The exception was the clade An04 lacking South American trypanosomes and composed of African, European and North American trypanosomes

from ranids and bufonids. The clade An01 comprises trypanosomes of leptodactylids and hylids from all biomes. Clade An03 includes trypanosomes from leptodactylids and bufonids. Clades An02, An05 (except for the North American *T. chattoni* from a ranid) and An06 (except for one bufonid isolate) harboured so far almost exclusively leptodactylid trypanosomes. Despite the lack of strong spatial structure, and wide spreading of trypanosomes from all clades, some clades, with the data gathered so far, could be related to some large areas: An03 was restricted to Amazonia; An02 consisted of samples from the Pantanal, Caatinga and Atlantic Forest, but not from Amazonia; An06 comprises mostly samples from the Pantanal. Interestingly, trypanosomes from leptodactylids captured in near sites of Venezuela clustered into An02 and An05 clades, whereas samples from Colombia clustered in An06 and An01. The samples from these countries were obtained from frogs captured west of the Andean Mountains.

Phylogeographic and eco- biogeographic patterns of leptodactylid trypanosomes suggest that host family and species, biome, hydrographic basins and specific ecological niches may all be determinants for the lineage distribution of anuran trypanosomes. The clades of leptodactylid trypanosomes revealed in this study showed different degrees of host association and spatial structure. Altogether, findings from this study suggest an evolutionary history shaped by South American landscapes evolving to present day hydrographic basins and biomes. The lack of host restriction suggested that many host switching occurred among leptodactylids and, sporadically, between these frogs and hylids or bufonids, probably mediated by leeches or dipteran vectors.

The isolates identified as candidates to new trypanosome species, up to 12 among the 48 cultures obtained from leptodactylids, are all maintained in our

culture collection. This high number of candidates to new species was found in a small number of frog species captured in a wide geographical range but in restricted localities and ecological niches representing only a fraction of the species richness of the

leptodactylid hosts. Therefore, the species richness of trypanosomes within the Leptodactylidae most likely remains largely underestimated. However, this study potentially increases by more than 100% the number of molecularly validated species of anuran trypanosomes.

## REFERENCES

- Anderson JR, Ayala SC. Trypanosome transmitted by Phlebotomus: first report from the Americas. *Science* (New York, NY). 1968;161(3845):1023-5.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of anura. *Advances in parasitology*. 1973; 11(0):1-73.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of Ranidae. I The effects of temperature and diurnal periodicity on the parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). *Canadian journal Zoology*. 1969; 47: 283-88.
- Bartlett-Healy K, Crans W, Gaugler R. Vertebrate hosts and phylogenetic relationships of amphibian trypanosomes from a potential invertebrate vector, *Culex territans* Walker (Diptera: Culicidae). *The Journal of parasitology*. 2009; 95(2):381-7.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MMG, Camargo EP: Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist* 2013, 164:129-152
- Botero A, Thompson CK, Peacock CS, Clode PL, Nicholls PK, Wayne AF, Lymberry AJ, Thompson RC. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). *Int J Parasitol Wildl*. 2013; 2:77-89.
- Desser SS. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *The Journal of parasitology*. 2001; 87(1):152-60.
- Desser SS, McIver SB, Ryckman A. *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *The Journal of parasitology*. 1973; 59(2):353-8
- Diamond LS. A study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of anura. *Wildlife disease*. 1965;44:1-85.
- Fernando BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodiliids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasites & vectors*. 2013; 6(1):313.
- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, et al. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 2008; 55(5):427-35.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*. 2007; 134(Pt 11):1623-38.
- Fouquet A.; Santana Cassini C.; Fernando Baptista Haddad C.; Pech N; Trefaut Rodrigues M. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *J Biogeography* 2014; 41, 855-870.
- Frost DR. 2014. Amphibian Species of the World: na Online Reference. Version 6.0 (09/01/2015). American Museum of Natural History, New York, USA. Eletronic Database: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, et al. The amphibian tree of life. *Bull American Museum Natural History*. 2006; 297: 1-370.
- Gibson WC, Lom J, Peckova H, Ferris VR, Hamilton PB. Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using ssu rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. *Parasitology*. 2005; 130(Pt 4):405-12.
- Grybchuk-Ieremenko A, Losev A, Kostygov AY, Lukes J, Yurchenko V. High prevalence of trypanosome co-infections in freshwater fishes. *Folia parasitologica*. 2014;61(6):495-504.
- Hamilton PB, Teixeira MM, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol*. 2012; 28(4):136-41
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007; 44(1):15-25.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology*. 2005; 35(4):431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International journal for parasitology*. 2004;34(12):1393-404.
- Hayes PM, Lawton SP, Smit NJ, Gibson WC, Davies AJ. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasites & vectors*. 2014; 7:50.
- Heinicke MP, Duellman WE, Trueb L, Means DB, MacCulloch RD, Hedges SB. A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa*. 2009. 2211, 1-35
- Johnson RN, Young DG, Butler JF. Trypanosome transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *Journal of medical entomology*. 1993 Sep;30(5):918-21.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGgettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2007 Nov 1;23(21):2947-8.

- Lemos M, Morais DH, Carvalho VT, D'Agosto M. First record of *Trypanosoma chattoni* in Brazil and occurrence of other *Trypanosoma* species in Brazilian frogs (Anura, Leptodactylidae). *The Journal of Parasitology*. 2008; 94(1):148-51.
- Lemos M, Souza CS, da Costa SC, Souto-Padron T, D'Agosto M. Isolation and in vitro culture of trypanosomes from *Leptodactylus ocellatus* from the Atlantic Forest in a new experimental culture medium. *The Journal of Parasitology*. 2013; 99(1):164-7.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MM. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit Vectors*. 2013;6(1):221.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, et al. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist*. 2012; 163(6):856-72.
- Lom L. Biology of trypanosomes and trypanoplasms of fish. In Lumsden, WHR, Evans DA (eds). *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press London. 2: 269-337
- Lukes J, Skalicky T, Tyc J, Votycka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. Molecular and biochemical parasitology. 2014; 195(2):115-22.
- Maia da Silva F, Marcili A, Ortiz PA, Epiphanio S, Campaner M, Catao-Dias JL, Shaw JJ, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. *Infect Genet Evol*. 2010; 10(4):522-9.
- Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D'Afonseca Neto JA, Naiff MF, Franco AM, Campaner M, Valente V, Valente SA, Camargo EP, Teixeira MM, Miles MA. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop*. 2008;107(2):168-73.
- Martin DS, Desser SS, Hong H. Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *The Journal of parasitology*. 1992;78(2):317-22.
- Martin DS, Wright AD, Barta JR, Desser SS. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *The Journal of parasitology*. 2002; 88(3):566-71.
- Netherlands EC; Coo, CA; Kruger D JD; du Preez, Louis H. Smit NJ. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, in press.
- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM: TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol* 2012, 12:1328-1332.
- Pyron RA, Wiens JJ. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2011; 61(2):543-83.
- Ramos B, Urdaneta-Morales S. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. *Revista de biología tropical*. 1977; 25(2):209-17.
- Rodrigues AC, Neves L, Garcia HA, Viola LB, Marcili A, Da Silva FM, Sigauque I, Batista JS, Paiva F, Teixeira MM. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. *Parasitology*. 2008; 135: 1317-28.
- Roelants K, Gower DJ, Wilkinson M, Loader SP, Biju SD, Guillaume K, et al. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104(3):887-92.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. *Bioinformatics*. 2003 Aug 12;19(12):1572-4.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014; 30(9):1312-3.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2001; 1(2):143-50.
- Swofford DL. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony: and other methods. Version4. Sunderland MA: Sinauer Associates; 2003.
- Telford RS. *The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles*. New York: Academic. 1995.
- Thomson RC, Plachetzki DC, Mahler DL, Moore BR. A critical appraisal of the use of microRNA data in phylogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(35):E3659-68.
- Truc P, Buscher P, Cuny G, Gonzatti MI, Jannin J, Joshi P, et al. Atypical human infections by animal trypanosomes. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(9):e2256.
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, et al. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (Caiman yacare) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology*. 2009; 136(1):55-65.
- Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, et al. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascalvelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 2009; 56(6):594-602.
- Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 2008; 135(5):595-605.
- Woo PT, Bogart JP. *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distribution and prevalences. *Canadian Journal Zoology*. 1984; 62:820-24