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

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 dípteros, 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: Hemoprotozoários, *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.

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, Crithidia, 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 cromossômica 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 (tripanossomas 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).

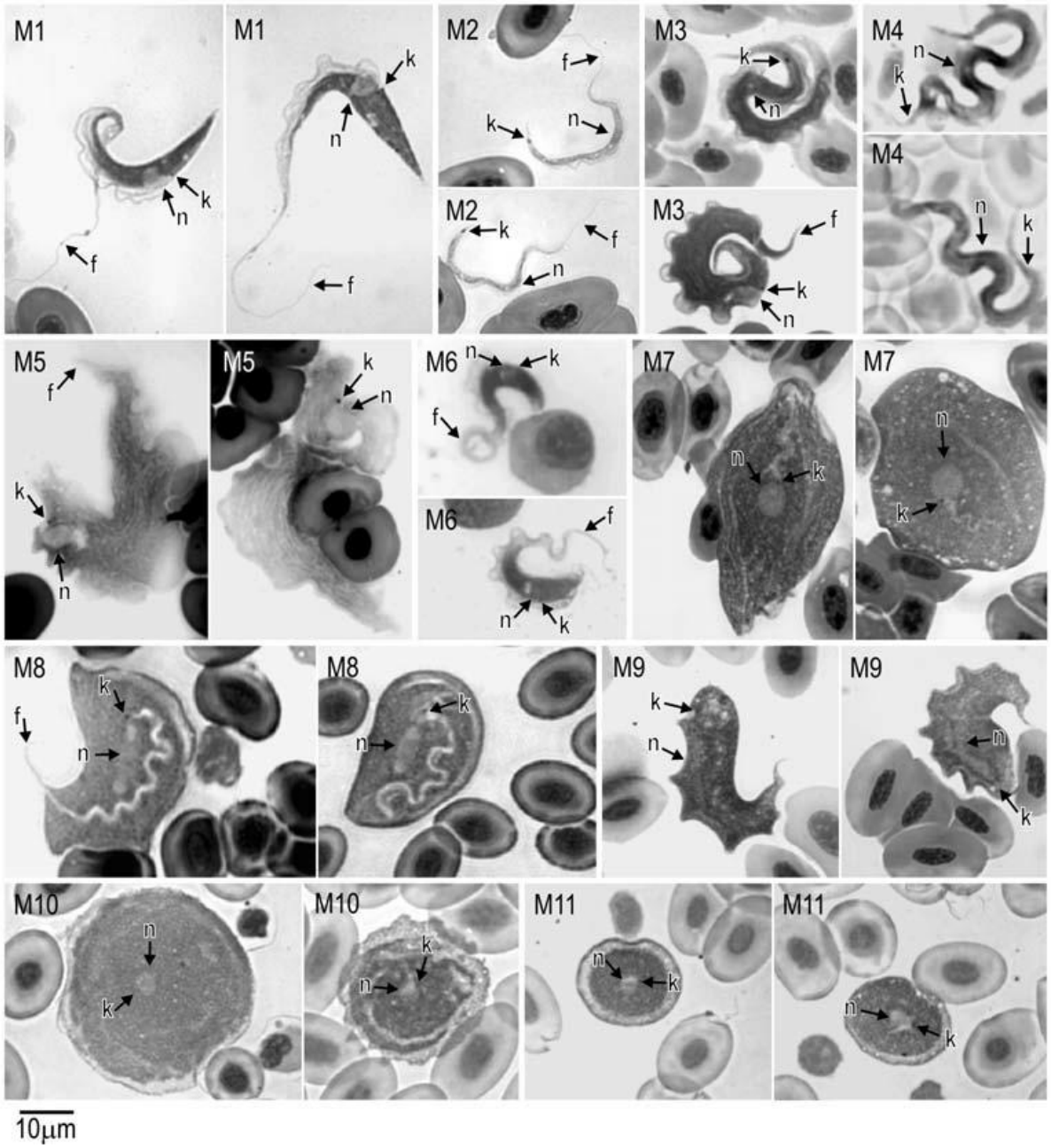

Figura 1. Estágios morfológicos de tripanossomas encontrados no sangue de anuros

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. leptodactily*-like); M5 (*T. fallisi*-like); M7 (*T. loricatum*-like); M8 (*T. rotatorium*-like), M10 (*T. chattoni*-like); e M11 (*T. tsunezomiytai*-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).

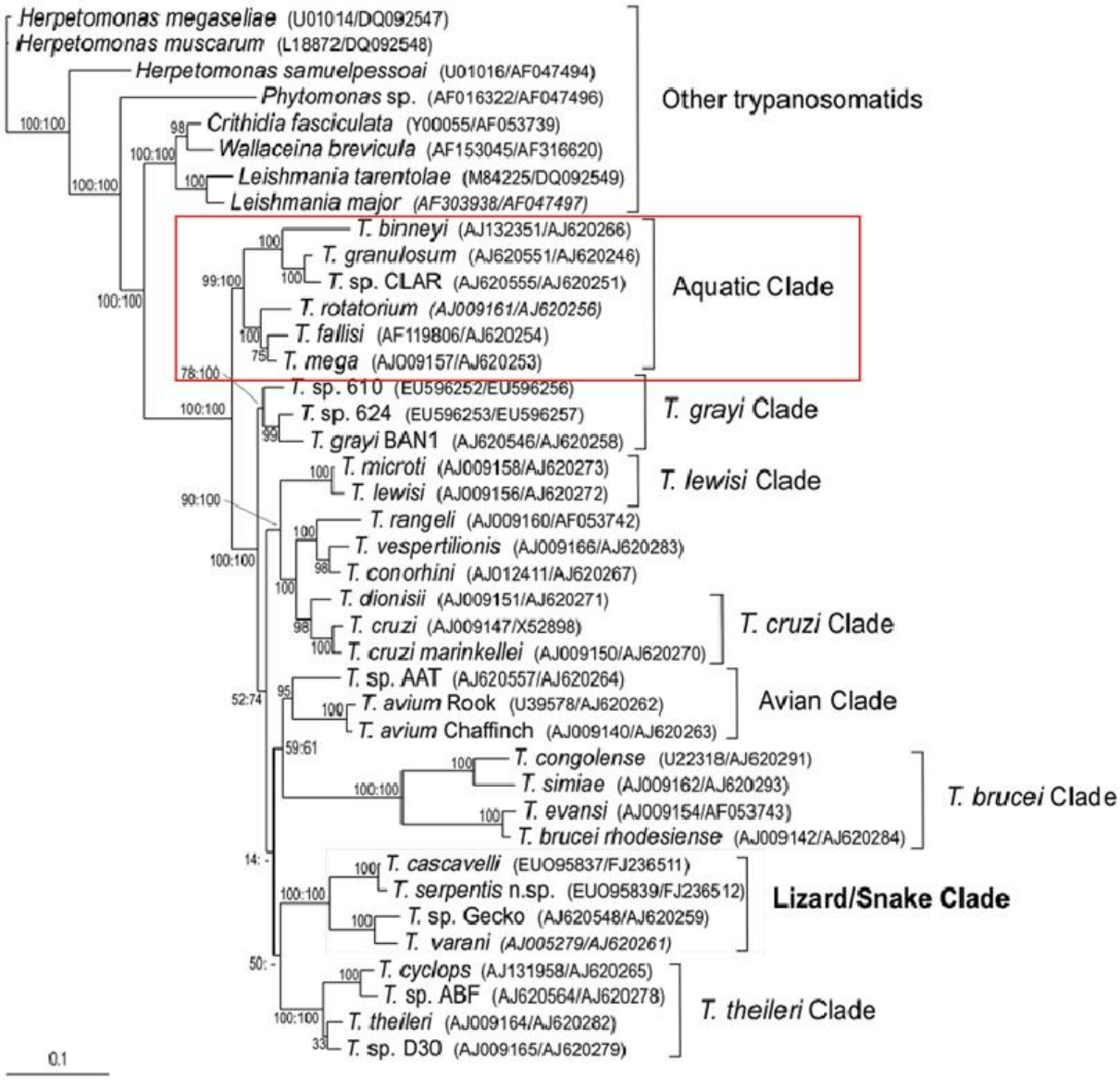

Figura 2. Relacionamento filogenético entre os clados do gênero *Trypanosoma.*

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. triglae* 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) corroboram 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 Africa 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).

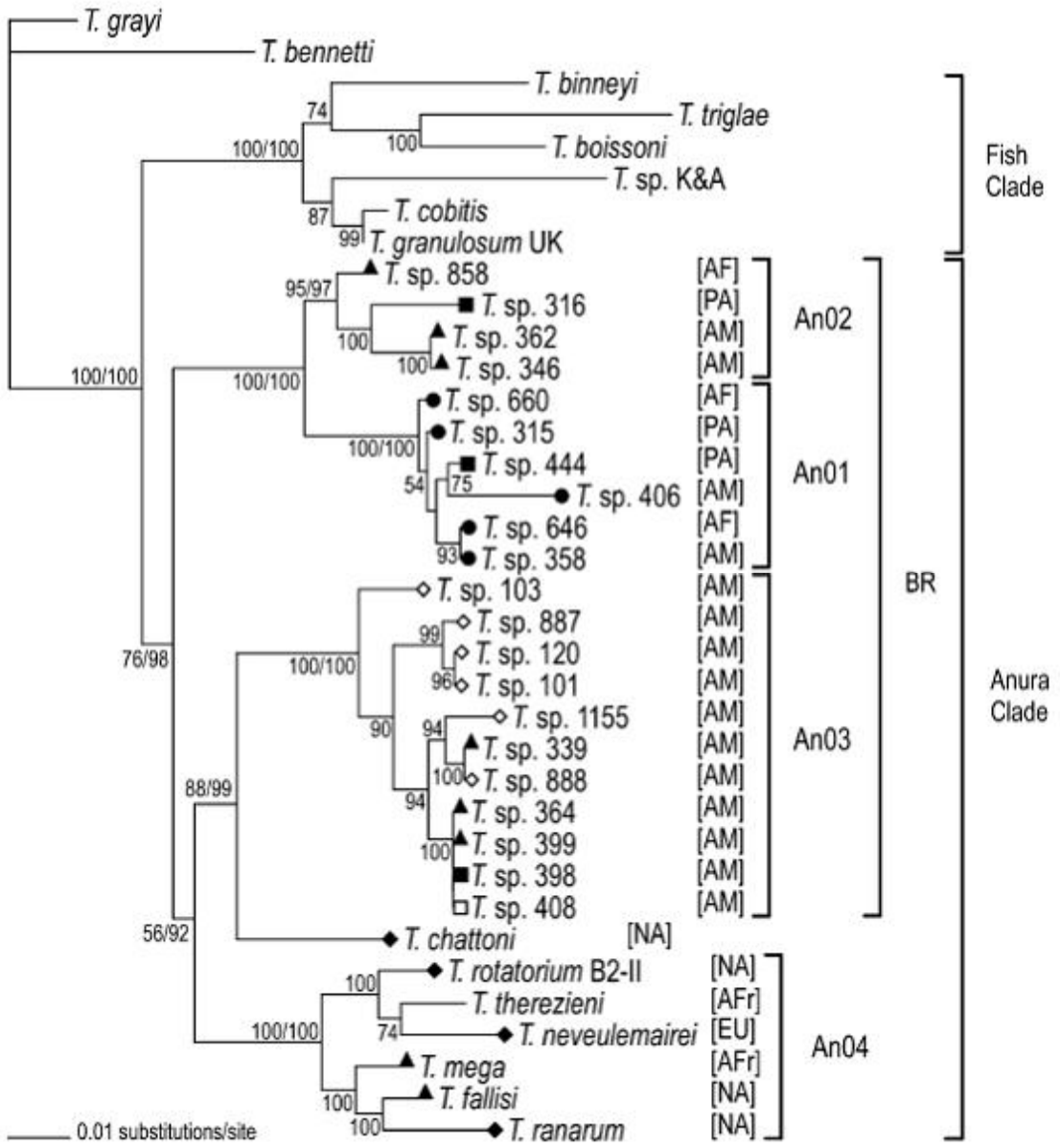

Figura 3. Relacionamento filogenético entre tripanossomas de anuros.

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 tetrápodas 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 ápodas 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 sáculo 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 umas 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 (estação 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 leptodactilídeos 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 leptodactilídeos 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 leptodactilídeos 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 pequeninos 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. melanonotus* (Sá et al., 2014).

Os leptodactilídeos 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 e 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.

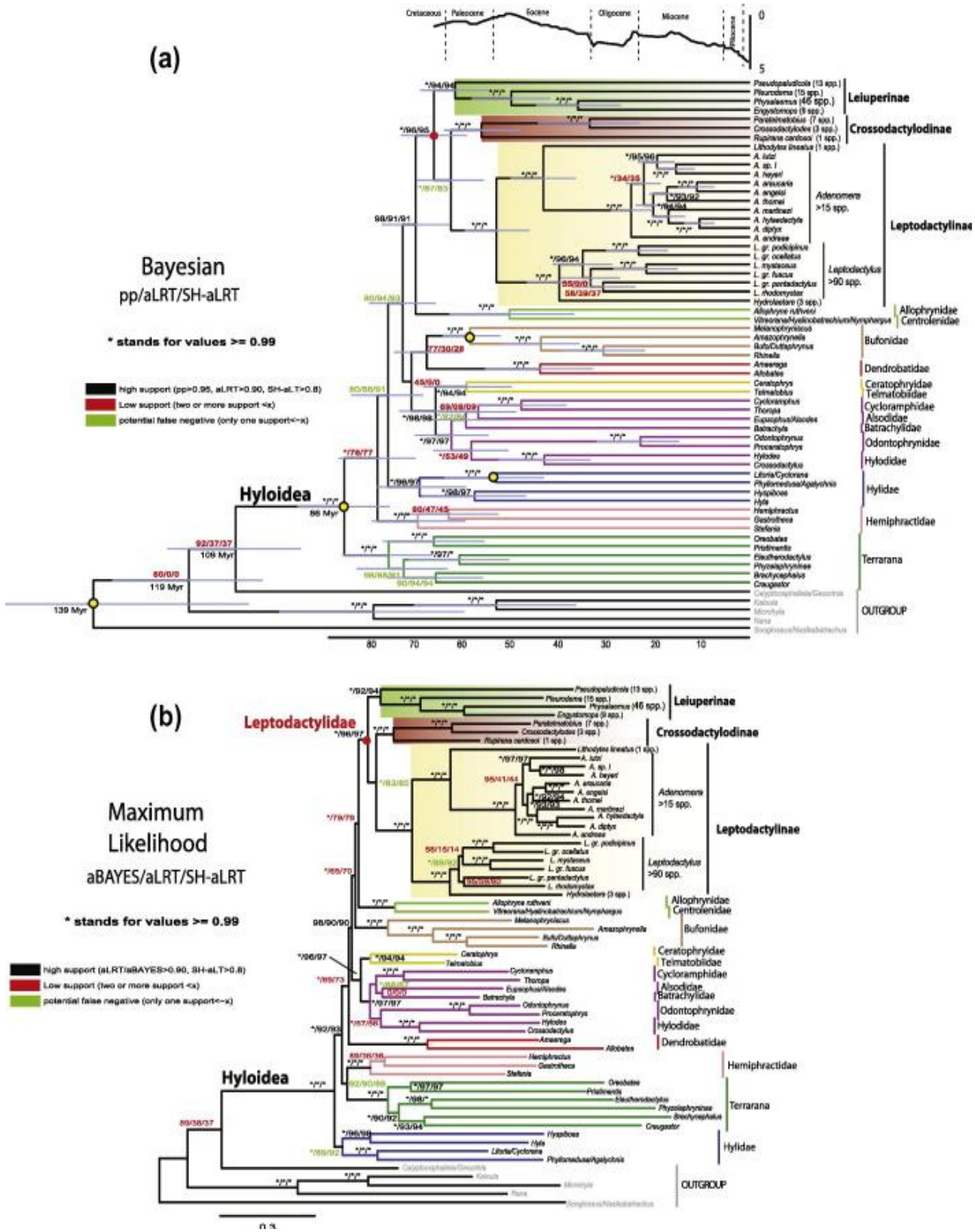

Figura 5. Filogenia da família Leptodactylidae (Fouquet et al., 2013).

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 ºC, 22 ºC e 30 ºC 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 ºC (até 20 dias) e 30 ºC (até 50 dias) e muito pouco a 10 ºC. *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 ºC 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 ºC houve grande concentração de tripanossomas em órgãos como o fígado, rins e coração; variações circadianas foram observadas a 26 ºC, mas não a 10 ºC. 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 hipóstese 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 monofilétido (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. *Lutzomiya 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 ºC, 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 sequencias 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).

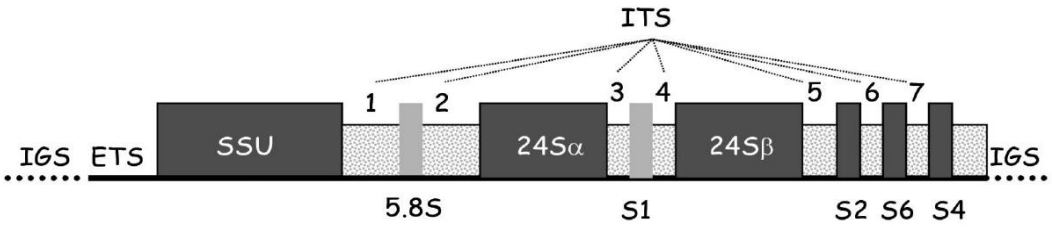

Figura 6. Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos.

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 morfologicamente 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 simpátricas 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).

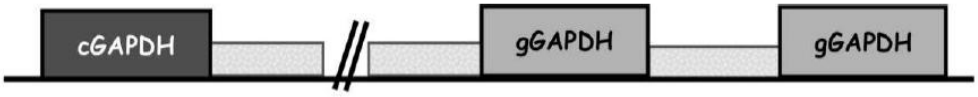

Figura 7. Representação esquemática dos genes GAPDH.

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 ontogénetique possible de ce trypanosome aves 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, Kamyingkird 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: Dendrobatidae). 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, Njiokou 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, Immunitatsforschung 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 Sao Paulo and Mato Grosso do Sul States - Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 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, Brigido 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, Poliszczak 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 diplonemids: 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 Rhabdomonadales (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 Biologia 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 12;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 Publicatons; 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; 4th 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.