Robson Cavalcanti Ferreira

DIVERSIDADE E FILOGENIA DE TRIPANOSSOMAS DE ANUROS

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.**

**São Paulo
2007**

Robson Cavalcanti Ferreira

DIVERSIDADE E FILOGENIA DE TRIPANOSSOMAS DE ANUROS

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração:
Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro**

**Orientadora:
Prof. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira**

**São Paulo
2007**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Robson Cavalcanti Ferreira.

Tese: Diversidade e Filogenia de Tripanossomas de Anuros.

Orientadora: Marta Maria Geraldês Teixeira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado**

() **Reprovado**

Examinador (a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador (a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador (a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador (a) Assinatura
Nome
Instituição

Presidente (a) Assinatura
Nome
Instituição

AGRADECIMENTOS:

À Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, por confiar este trabalho a mim, pela orientação, ensinamentos e exemplos de profissionalismo.

Ao Prof. Dr Erney Camargo pelas valiosas contribuições a este trabalho.

À Profa. Dra. Gentilda Takeda, pelos ensinamentos e pela colaboração nos estudos morfológicos deste trabalho.

À Marta Campaner, pelo trabalho indispensável no isolamento e manutenção dos parasitas utilizados neste estudo e pelos valiosos ensinamentos.

À Carmen Takata, pelos ensinamentos, dedicação e colaboração em todos os trabalhos.

Ao Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues, pela colaboração na identificação dos anuros.

À Profa. Dra. Sandra Favorito, pela colaboração na coleta dos anuros.

Ao Prof. Dr. Fernando Paiva (UFMS), pela colaboração nas coletas do Pantanal.

Ao Prof. Dr. Carlos Jared, pela inestimável contribuição em disponibilizar seu laboratório e sua coleção de anuros para este trabalho.

Ao Laerte Viola, pelos isolados do Guaporé, pela colaboração nas coletas e pelo companheirismo durante todos esses anos no laboratório.

Ao Arlei Marcili, pela colaboração nas coletas e pelo companheirismo durante todos esses anos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Toby Barrett e ao Prof. Dr. Jeffrey Shaw, pela colaboração com culturas de tripanossomas de flebotomíneos.

Ao Prof. Dr. Luis da Neves, pela contribuição em disponibilizar amostras de anuros Africanos.

Ao pessoal do laboratório, Manzélio, Márcia, Adriana Fuzato, Adriana Martins, Flávia, Heracles, Luciana e Paola pelo companheirismo durante todos esses anos no laboratório.

À Ciça pelo amor, compreensão e carinho em todos esses anos e á Clarice, minha filhinha e principal fonte de alegria.

“Mande um barco que transporte a mim, a meus filhos e a meus livros.” Hergedef, filho de Queóps II – 4ª dinastia (2613 a.C. a 2494 a.C.).

Este trabalho contou com o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

RESUMO

Ferreira, R. C. Diversidade e filogenia de tripanossomas de anuros (Tese). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Anfíbios da ordem Anura há muito tempo são conhecidos, em todo o mundo, como portadores de tripanossomas transmitidos por sanguessugas e insetos (mosquitos e flebotomíneos). Esses tripanossomas têm sido classificados de acordo com a morfologia das formas sanguíneas, hospedeiro de origem, origem geográfica e experimentos de infecções cruzadas. Contudo, esses parâmetros tradicionais são insuficientes para a classificação dos tripanossomas de anuros e não há consenso sobre quais espécies são válidas. Até esse trabalho, os estudos desses tripanossomas se restringiam a apenas seis espécies, nenhuma da América do Sul. Assim, as relações parasita-hospedeiro e o relacionamento filogenético entre tripanossomas de anuros são pouco compreendidos, com controvérsias quanto à monofilia desse grupo, e ausência de parâmetros taxonômicos eficientes. Novos estudos precisam ser realizados comparando uma grande coleção de isolados de anuros, de espécies e origens geográficas distintas, assim como isolados de vetores, que vivem em diferentes ecótipos e nichos. A fim de avaliar a diversidade de tripanossomas de anuros e entender melhor sua filogenia, assim como rever e definir parâmetros taxonômicos, capturamos anuros de várias espécies dos seguintes biomas brasileiros: Amazônia, Floresta Atlântica e Pantanal. Avaliamos a prevalência geral de infecções por tripanossomas nos anuros desses biomas, isolamos e cultivamos tripanossomas, comparamos suas características morfológicas e moleculares e inferimos relacionamentos filogenéticos entre os isolados. A prevalência de tripanossomas no sangue dos anuros foi alta (45%). As famílias Leptodactylidae, Hylidae, Leiuperidae e Bufonidae tiveram índices de infecção decrescentes, variando de 81% a 28%. Os anuros brasileiros apresentaram uma grande variedade de tripanossomas no sangue, com pelo menos 11 morfotipos e significativo pleomorfismo das formas de cultura. Análises moleculares revelaram que a mesma espécie de anuro pode ser infectada por tripanossomas distintos, e que uma mesma espécie de tripanossoma pode infectar espécies mais de uma espécie de anuro, confirmando que a taxonomia tradicional não é suficiente para avaliar a diversidade e classificar os tripanossomas de anuros. Os resultados mostraram uma grande diversidade molecular entre os 82 isolados brasileiros avaliados por polimorfismo de ITS rDNA, revelando 11 grupos principais (A-K), que compreendem 29 genótipos. A análise de 7 novos isolados de anuros africanos também revelou significativo polimorfismo e quatro genótipos.

Os relacionamentos filogenéticos entre tripanossomas de anuros do Brasil, África, Europa e América do Norte baseados em análises de seqüências separadas e combinadas dos genes

SSUrDNA, gGAPDH e α Tubulina confirmaram estudos filogenéticos prévios, posicionando os tripanossomas de anuros próximos de tripanossomas de peixes, formando o clado Aquático. Apesar da monofilia, o clado formado por tripanossomas de anuros é bastante complexo, com várias linhagens filogenéticas. Os padrões de ramificação das árvores filogenéticas revelaram 5 clados principais (linhagens) de isolados (An01-An05) que podem ser associados com padrões biogeográficos e filogeográficos dos hospedeiros. Os isolados brasileiros foram distribuídos em 4 clados (An01, 02, 03, 05) enquanto os de anuros exóticos constituíram o clado AN04. A única exceção foi o clado An05, composto por isolados do Brasil e E.U.A. Os clados An01 e An02 compreendem exclusivamente isolados brasileiros, aparentemente, associados com hilídeos e bufonídeos, respectivamente. O clado An03 representou uma linhagem contendo isolados de anuros e de flebotomíneos, indicando flebotomíneos como hospedeiros e potenciais vetores de tripanossomas de anuros terrestres.

Os resultados desse estudo revelaram considerável grau de concordância entre filogenia, biogeografia e filogeografia dos anuros com as linhagens de tripanossomas, sugerindo uma longa e contínua associação desses parasitas com seus hospedeiros vertebrados e um padrão de codivergência parasita-hospedeiro. Contudo, incongruências demonstraram que os anuros e seus tripanossomas compartilham com seus vetores uma história evolutiva complexa, com uma estrutura geral biogeográfica e ecológica. As análises sugerem várias trocas de hospedeiro (host-switching), provavelmente mediadas por vetores, e com eventos de adaptação biológica (host fitting) de alguns tripanossomas a diferentes espécies de anuros, proximamente relacionados. Todos esses processos evolutivos parecem ter desempenhado um papel importante na evolução dos tripanossomas de anuros.

Palavras-chave: *Trypanosoma*, Amphibia, Genes ribossômicos, Filogenia, Flebotomíneos, Biomas.

ABSTRACT

Ferreira, R. C. Diversity and phylogeny of anuran trypanosomes (Thesis). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Amphibians belonging to the orders Anura (frogs and toads) have long been known to be infected with trypanosomes worldwide, infecting frogs and toads and transmitted by leeches and insects (mosquitoes and sand flies). Anuran trypanosomes have been classified according to the morphology of blood trypanosomes, host and geographical origin, and cross-infection experiments. However, this traditional approach is insufficient for identification and classification of anuran trypanosomes and no consensus currently exists as to which species are valid. However, so far studies of anuran trypanosomes have included only six species. No surveys were carried out in South America and isolates from this region were never characterized. Thus, host-parasite and phylogenetic relationships of anuran trypanosomes remain far from understood, and a reliable taxonomy of these organisms is still badly needed. Dealing properly with these questions requires comparative analysis of a large number of trypanosomes from anuran of distinct species and geographical origins.

Aiming to assess the diversity of anuran trypanosomes and better understand their phylogeny as well as to evaluate their current taxonomy, we captured anuran of various frog and toad species from distinct Brazilian biomes (Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal). We evaluated overall prevalence of anuran trypanosome infection in these biomes, isolated trypanosomes in cultures, compared their morphological and molecular characteristics and inferred their phylogenetic relationships. The prevalence of blood trypanosomes in anurans was high (45%). The families Leptodactylidae, Hylidae, Leuperidae and Bufonidae had decreasing infection indices ranging from 81% to 28%. Brazilian anurans showed a large variety of bloodstream trypanosomes showing at least 11 distinct morphotypes, and significant pleomorphism of cultured flagellates. Molecular analysis revealed that the same anuran species could be infected by distinct trypanosomes and that the same species could infect distinct anuran species, confirming that the traditional taxonomy is not sufficient to properly address the genetic diversity of anuran trypanosomes. Results showed high molecular diversity among the 82 Brazilian isolates evaluated by polymorphisms of ITS rDNA, disclosing 11 major groups (A-K) comprising 29 genotypes. Analysis of 7 new isolates from African anurans also disclosed marked polymorphism and 4 genotypes.

Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes, from Brazil, Africa, Europe and North America, inferred in this study based on separated or combined analysis of sequences from SSUrDNA, gGAPDH and α Tubulin genes confirmed previous phylogenetic studies that positioned anuran

trypanosomes closest to fish trypanosomes in the Aquatic clade. However, in spite of its monophyly, the clade formed by anuran trypanosomes is undoubtedly a complex taxon comprising distinct phylogenetic lineages. Overall, the branching pattern of phylogenetic trees disclosed 5 major clades (lineages) of anuran isolates (An01-An05) separated each other by significant genetic distances, which appear to be associated with host phylogeny, biogeographic and phylogeographic patterns. Brazilian trypanosomes were distributed in 4 clades (An-01, 02, 03, 05) whereas trypanosomes from exotic anurans composed the clade An04. Exception was clade An05, which comprises isolates from Brazil and one isolate from USA. Clades An01 and An02 were constituted exclusively by Brazilian isolates and could be primarily associated to hylids or bufonids, respectively. Clade An03 represented a lineage containing anuran and sand fly isolates, pointing to phlebotomines as hosts and potential vectors of trypanosomes among terrestrial toads and frogs.

Overall, data from this study revealed a considerable degree of concordance between the phylogeny, biogeography and phylogeography of anurans and lineages of trypanosomes, suggesting long and continuous association of these parasites and some patterns of host-parasite codivergence. However, closer examination disclosed incongruences between lineages of parasites and anuran phylogenies, demonstrating that anuran and their trypanosomes share with their vectors a complex evolutionary history, with several events of host-switching, probably mediated by vectors, and biological adaptation of some trypanosome lineages to closely related hosts (host fitting) within an overall biogeographic and ecologic framework. All these evolutionary processes appear to have played important role in the evolution of the anuran trypanosomes.

Keywords: *Trypanosoma*, Amphibia, Ribosomal genes, Phylogeny, Phlebotomines, Biomes.

ABREVIATURAS

BAB	Blood Agar Base
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dTTP	Desoxitimidina-trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
Kb	Quilobase
LIT	Liver Infusion Tryptose
MH	Microhematócrito
HE	Hemocultura
ml	mililitros
mM	milimolar
Nº	Número
PBS	Salina em tampão fosfato
SFB	Soro fetal bovino
UV	Luz ultravioleta
µl	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O gênero <i>Trypanosoma</i>	18
1.2 Taxonomia dos tripanossomas	20
1.3 Evolução e filogenia dos tripanossomatídeos	22
1.4 Tripanossomas de anuros	26
1.4.1 Morfologia	27
1.4.2 Hospedeiros vertebrados e distribuição geográfica	31
1.4.3 Ciclo Biológico	32
1.4.3.1 Desenvolvimento no hospedeiro vertebrado	32
1.4.3.1.1 Patogenia	34
1.4.3.2 Hospedeiros invertebrados	34
1.4.3.2.1 Sanguessugas	34
1.4.3.2.2 Insetos hematófagos	36
1.4.4 Filogenia dos tripanossomas de anuros	39
1.5 Parâmetros taxonômicos e métodos utilizados na classificação e caracterização de tripanossomas de anuros	41
1.5.1 Morfologia	41
1.5.2 Hospedeiro e origem geográfica	42
1.5.3 Características biológicas	42
1.5.4 Zimodemas (padrões de isoenzimas)	43
1.5.5 Métodos baseados em análises de ácidos nucleicos	43
1.5.5.1 Sequências do gene ribossômico	43
1.5.5.2 Sequências do gene “spliced leader”	44
1.5.5.3 Padrões de RAPD, sequências polimórficas de DNA amplificadas aleatoriamente (Random Amplification of Polymorphic DNA)	46
1.5.5.4 DNA do cinetoplasto – kDNA	46
1.5.5.5 Caracterização cromossômica – Cariotipagem	48
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Áreas de captura dos anuros	53
3.2 Captura e identificação dos anuros	53
3.3 Isolamento de tripanossomas	53
3.3.1 Isolamento de tripanossomas de anuros	53
3.3.2 Obtenção de tripanossomas de flebotomíneos	54
3.4 Condições de cultivo e manutenção dos tripanossomas	54
3.5 Caracterização morfológica	56
3.6 Extração de DNA dos parasitas	56
3.7 Reações de amplificação - PCR	56
3.8 Digestão de DNA com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose (RFLP)	56
3.9 Purificação, clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR	57
3.10 Alinhamento das sequências obtidas e inferências filogenéticas	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Relacionamento filogenético, diversidade morfológica e molecular de tripanossomas de anuros dos biomas brasileiros, Amazônia, Floresta Atlântica e Pantanal	59
4.2 Uma nova linhagem monofilética de tripanossomas de anuros (Bufonidae e Leptodactylidae) e flebotomíneos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) da Amazônia brasileira	60
4.3 Filogenia de tripanossomas de anuros sul americanos e africanos baseada na análise de três loci gênicos	61
4.3.1 Introdução	61
4.3.2 Materiais e Métodos	64

4.3.2.1 Locais de coleta e isolamento de tripanossomas de anuros	64
4.3.2.2 Amplificação, por PCR, dos genes ITS1/5.8S/ITS2 rDNA, SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina	64
4.3.2.3 Sequenciamento e inferências filogenéticas	64
4.3.3 Resultados e Discussão.....	66
4.3.3.1 Diversidade genética de tripanossomas de anuros Africanos avaliada por polimorfismo de tamanho de ITSrDNA.....	66
4.3.3.2 Análises filogenéticas de tripanossomas de anuros baseadas em seqüências dos genes SSUrDNA (V7-U4-V8), gGAPDH e Alfa Tubulina	67
4.3.3.2.1 Análises filogenéticas de tripanossomas de anuros com seqüências combinadas dos genes SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina	67
4.3.3.2.2 Análises filogenéticas de tripanossomas de anuros com seqüências isoladas dos genes SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina	69
4.3.3.3 Relacionamento filogenético entre tripanossomas de bufonídeos sul americanos (brasileiros) e africanos (Moçambique e Congo).....	71
4.3.3.4 Relacionamento filogenético entre tripanossomas de leptodactilídeos e leiuperídeos.....	73
4.3.3.5 Relacionamento filogenético entre tripanossomas de hilídeos da América do Sul.	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* foi originalmente proposto por Gruby (1843) para classificar um hemoflagelado de rã que foi denominado *Trypanosoma sanguinis* (Figura 1). Como o organismo observado por Gruby (1843) apresentava uma estrutura similar a de um parasita descrito alguns meses antes com o nome de *Amoeba rotatoria* (Mayer, 1843), essa espécie passou a ser classificada como *Trypanosoma rotatorium*.

Figura 1. *Trypanosoma sanguinis*, sinônimo de *T. rotatorium* (Gruby, 1843).

Os protozoários do gênero *Trypanosoma* são flagelados do Filo Euglenozoa classificados tradicionalmente na ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963) que pertence ao reino Protozoa (Cavalier-Smith, 1981; 1998; 2004). De acordo com os parâmetros taxonômicos tradicionais (características morfológicas e ciclos de vida), os cinetoplastídeos foram classificados em duas subordens: Bodonina e Trypanosomatina. As espécies da subordem Bodonina apresentam 2 flagelos localizados em lados opostos, sendo habitantes de ambientes aquáticos de água doce ou salgada (vida livre), ectoparasitas ou endoparasitas de animais aquáticos. A Subordem Trypanosomatina compreende protozoários uniflagelados, endoparasitas obrigatórios e classificados em apenas uma família, Trypanosomatidae. Os membros dessa família apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando plantas e animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, com ampla distribuição nos diferentes continentes (Vickerman, 1976; Dolezel *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006).

Com o aumento do número de espécies descritas e o advento de novos parâmetros taxonômicos, características morfológicas, biológicas e moleculares têm alterado o posicionamento taxonômico dos membros do filo Euglenozoa. Cavalier-Smith (1981) posicionou os euglenídeos e cinetoplastídeos no filo Euglenozoa, que mais tarde passou a incluir os diplomonídeos (Preisfeld *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Cavalier-Smith, 1988; 2004). Os organismos do filo Euglenozoa foram reclassificados com base em estudos filogenéticos moleculares em três classes: Kinetoplastea, composta por parasitas e comensais de plantas e animais; Euglenoidea, que compreende apenas organismos de vida livre e Diplonemea, que compreende organismos de vida livre e ocasionalmente parasitas facultativos. A classe Kinetoplastea compreende duas subordens, Tripanosomatina e Bodonina (Dolezel *et al.*, 2000; Preisfeld *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Simpson e Roger, 2004; Von der Heyden *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2007; Breglia *et al.*, 2007).

Os organismos da classe Kinetoplastea se caracterizam pela presença do cinetoplasto, que é uma região especializada da única mitocôndria destes organismos, constituída por moléculas de DNA circular concatenadas, localizada na base flagelar e que contém o DNA mitocondrial (Vickerman, 1976). Um estudo recente baseado em filogenia molecular dividiu a classe Kinetoplastea em duas subclasses: a) Prokinetoplastina, contendo as espécies basais *Ichtyobodo necator* e *Perkinsiella amoebae*; b) Metakinetoplastina, compreendendo a ordem Tripanosomatida e três novas ordens, Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida (Figura 2). De acordo com esta classificação a ordem Tripanosomatida passou a abrigar 11 gêneros da família Trypanosomatidae: a) *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Trypanosoma*, que possuem um ciclo de vida heteroxênico; b) *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Rynchoidomonas*, que são monoxênicos (Moreira *et al.*, 2004). Entretanto, estudos bastante abrangentes, de um conjunto de características biológicas, celulares, bioquímicas e moleculares, de um maior número de flagelados do filo Euglenozoa, estão sendo realizados a fim de validar, ou não, as novas proposta de classificação dos cinetoplastídeos, inclusive de alguns gêneros de tripanossomatídeos ainda bastante controversos.

Embora a infecção pela maioria dos tripanossomatídeos não cause danos aparentes aos seus hospedeiros, algumas espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são responsáveis por patologias de grande importância médica humana e veterinária e algumas espécies de *Phytomonas* também podem ser patogênicas (Hoare, 1972; Camargo, 1999).

Figura 2. Relacionamento filogenético entre organismos da classe Kinetoplastea. Modificado de Moreira *et al.* (2004).

1.2 Taxonomia dos tripanossomas

A diversidade de hospedeiros de espécies do gênero *Trypanosoma* é imensa, com centenas de espécies descritas em um grande número de hospedeiros vertebrados, abrangendo répteis, anfíbios, peixes, aves e todas as ordens de mamíferos (Stevens *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2006). As espécies do gênero *Trypanosoma* são parasitas obrigatórias que apresentam ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados hematófagos. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens e famílias, exceto algumas espécies parasitas de anfíbios, répteis e peixes, que são também transmitidas por sanguessugas (Hoare, 1972). Algumas

espécies de tripanossomas africanos são apenas mecanicamente veiculadas porque não apresentam mitocôndria funcional (Gardiner e Mahmoud, 1992).

Diferentes espécies deste gênero podem apresentar os estágios amastigota, epimastigota, promastigota e tripomastigota, presentes em diferentes combinações, no sangue e/ou tecidos, nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Antes da utilização de marcadores moleculares, a classificação de tripanossomas de mamíferos era baseada na combinação dos seguintes critérios: Hospedeiro(s) vertebrado(s) e invertebrado(s) de origem; distribuição geográfica; morfologia; ciclo de vida; patologia; características bioquímicas e fisiológicas.

De acordo com o desenvolvimento no vetor, Hoare (1972) classificou os tripanossomas de mamíferos em duas Secções: Stercoraria e Salivaria. Os tripanossomas da Secção Salivaria (tripanossomas africanos) são todos transmitidos pela mosca tsétsé por inoculação de formas metacíclicas junto com a saliva do vetor (exceto *T. equiperdum* e *T. evansi* cuja transmissão ocorre apenas mecanicamente; *T. vivax*, na África é transmitido pela mosca tsetse, contudo, também pode ser transferido de um hospedeiro a outro mecanicamente). A multiplicação dos tripanossomas dessa Secção no hospedeiro vertebrado se dá sob a forma tripomastigota.

A Secção Stercoraria engloba parasitas cujo estágio final no hospedeiro invertebrado ocorre no intestino posterior, sendo que as formas metacíclicas eliminadas com as fezes contaminam o hospedeiro vertebrado por meio de solução de continuidade na pele (transmissão contaminativa). Nos vertebrados, dependendo da espécie, a multiplicação dos flagelados ocorre sob as formas amastigota, epimastigota, promastigota ou tripomastigota.

Ao contrário dos tripanossomas de mamíferos, não existem parâmetros taxonômicos claramente definidos e utilizados pela comunidade científica para a classificação de tripanossomas de anfíbios, répteis, aves e peixes. Estes tripanossomas têm sido classificados arbitrariamente, como novas ou antigas espécies, adotando o hospedeiro de origem e/ou a origem geográfica como critério taxonômico. Esta conduta gerou dezenas de espécies de anuros descritas sem critérios confiáveis e sem estudos comparativos. Uma das primeiras tentativas de classificar os tripanossomas de anfíbios foi proposta por Doflein (1901) que dividiu o gênero *Trypanosoma* em três subgêneros: *Trypanomona*, *Herpetosoma* e *Trypanosoma*, sendo que o último continha o flagelado de anuro *T. rotatorium*. Porém, na última revisão do gênero *Trypanosoma* esta classificação foi abandonada e foi proposta uma classificação restrita aos tripanossomas de mamíferos (a espécie-tipo do gênero não foi incluída), que foram agrupados em 8 subgêneros, um deles, o subgênero *Megatrypanum*, apresentando afinidades morfológicas com tripanossomas de anfíbios e répteis (Hoare, 1964).

1.3 Evolução e filogenia dos tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens. Estes organismos, depois dos nematóides, são os eucariotos que apresentam a maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (Vickerman, 1976; 1994; Stevens *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2006). Estudos de inferências filogenéticas baseados em seqüências dos genes de DNA ribossômico (rDNA) e dados biogeográficos dos hospedeiros revelaram que os kinetoplastídeos estão entre os eucariontes mais antigos que divergiram, provavelmente, muito antes do aparecimento dos animais, plantas e até mesmo dos fungos (Fernandes *et al.*, 1993).

Os tripanossomatídeos apresentam inúmeras diferenças em sua biologia e em diversos aspectos estruturais e funcionais. Algumas espécies de tripanossomatídeos possuem endossimbiontes bacterianos e virais, com alguns isolados podendo, desta forma, junto com os genomas nuclear e mitocondrial, apresentar até quatro genomas distintos. O aparato nuclear destes flagelados apresenta uma série de peculiaridades, incluindo a ausência de condensação da cromatina durante a mitose, a persistência da membrana nuclear durante a divisão celular e a presença de unidades de transcrição policistrônicas. O genoma dos tripanossomatídeos está organizado em diversos cromossomos, cujo número e tamanhos variam de acordo com espécies, isolados, etc. Esses organismos apresentam ainda como principais características: o cinetoplasto; a composição do citoesqueleto; os glicossomas; proteínas de membrana ancorada por GPI; a endocitose e exocitose de macromoléculas via bolso flagelar, o nucleotídeo denominado base J em seu DNA nuclear; variação antigênica; etc. Algumas destas características são compartilhadas com os diplomonídeos e euglenídeos (Vickerman, 1994; Dooijes *et al.*, 2000; Gull, 2001; Simpson *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2003; Uliel *et al.*, 2004; von der Heyden *et al.*, 2004; Lukes *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2006).

Os tripanossomatídeos, principalmente os de ciclo heteroxênico, vivem em diferentes hospedeiros e ambientes durante seu desenvolvimento. Esse comportamento exige rápidas adaptações frente a profundas alterações de temperatura, nutrientes disponíveis, componentes do hospedeiro e da célula hospedeira, resposta imune do hospedeiro, etc. A rápida adaptação e diferenciação destes organismos depende de uma grande reprogramação de sua expressão gênica, gerando repertórios diferentes de genes expressos durante seus ciclos de vida. Os mecanismos de ativação e regulação da expressão gênica dos tripanossomatídeos ainda são pouco conhecidos. Dentre os fenômenos funcionais, os mecanismos mais interessantes e estudados do ponto de vista evolutivo são os mecanismos de variação antigênica (Taylor e Rudenko, 2006) e de processamento de mRNAs por "trans-splicing" e edição. Os transcritos nos tripanossomatídeos são policistrônicos e os mRNAs unitários são gerados por "trans-splicing". Além dos cinetoplastídeos, os euglenídeos e diplomonídeos também apresentam este mecanismo. A maioria dos mRNAs dos kinetoplastídeos é

processado por trans-splicing, porém, o processamento por "cis-splicing" tem sido identificado em alguns genes (Simpson e Maslov, 1999; Mair *et al.*, 2000; Lukes *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2003; Uliel *et al.*, 2004; Siegel *et al.*, 2005; Jager *et al.*, 2007).

Os membros da ordem Kinetoplastida apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto, constituída por moléculas dupla-fita circulares, minicírculos e maxicírculos, concatenadas em uma única rede. Aparentemente, estes organismos divergiram dos demais eucariotos logo que o ancestral desta linhagem incorporou bactérias aeróbicas simbiotes que deram origem às mitocôndrias. Os cinetoplastídeos modificaram sua única mitocôndria, alterando o conteúdo de DNA e sua organização, gerando o cinetoplasto. As reconstruções filogenéticas sugerem que a origem evolutiva da rede concatenada de kDNA ocorreu no ancestral da família Trypanosomatidae (Simpson e Maslov, 1999; Simpson *et al.*, 2002; Lukes *et al.*, 2002; 2005; Roy *et al.*, 2007). Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos, codificando as proteínas para a atividade mitocondrial, porém, a expressão gênica é bastante complexa e depende de processamento por edição de RNA, que gera mRNAs mitocondriais com códons de iniciação e de terminação corretos e com fases abertas de leitura. Neste processo, os minicírculos de kDNA são transcritos em pequenas moléculas de RNA, denominadas RNA guias (gRNA), que dirigem inserções e deleções de uridinas nas moléculas transcritas de maxicírculo para a edição de mRNA. (Hadkuk e Sabatini, 1996; Simpson *et al.*, 2002; Lukes *et al.*, 2002; Worthey *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que recombinações genéticas (reprodução sexuada) são eventos raros entre os tripanossomatídeos que, em geral, se propagam na natureza como populações clonais. Porém, a formação de híbridos foi demonstrada para *T. brucei* durante seu desenvolvimento em moscas tsetse (Gibson e Stevens, 1999) e já foi sugerida em *T. cruzi* (Gaunt e Miles, 2000). Entretanto, em geral, os estudos de diversidade genética demonstram que a estrutura populacional dos tripanossomatídeos é basicamente clonal e que, se existentes na natureza, recombinações são muito esporádicas para interromper um padrão prevalente de propagação clonal (Tibayrenc, 1995).

O fato dos tripanossomatídeos terem, provavelmente, evoluído dos bodonídeos de vida livre, e não de bodonídeos parasitas de peixes transmitidos por sanguessugas como *Trypanoplasma* (Simpson *et al.*, 2002; Simpson e Roger, 2004; Moreira *et al.*, 2004), levou a hipótese de um bodonídeo aquático ter sido ingerido por insetos, se adaptado ao parasitismo no intestino, dando origem aos tripanossomatídeos de insetos que foram transmitidos para vertebrados e se adaptaram ao parasitismo, passando a circular entre insetos e vertebrados terrestres, sendo a origem dos tripanossomas de peixes, anfíbios e sanguessugas um evento secundário (Hoare, 1972; Hamilton *et al.*, 2004; 2007). As relações filogenéticas entre os tripanossomatídeos inferidas em diferentes estudos sugeriram que a adoção dos ciclos de vida heteroxênico ocorreu, independentemente, várias vezes ao

longo da evolução (Vickerman, 1994; Maslov e Simpson, 1995; Haag *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; 2007).

Em um dos primeiros estudos filogenéticos utilizando seqüências dos genes de SSUrDNA, Sogin *et al.* (1986) posicionaram *T. brucei* em relação a diversos organismos representantes dos reinos Protista, Fungi, Plantae e Animalia. Este estudo posicionou *T. brucei* próximo de *Euglena gracilis*, que é um euglenóide. Várias teorias tentam explicar a diversidade e a origem do parasitismo na família Trypanosomatidae, isto é, se os organismos mais ancestrais eram parasitas de invertebrados que, com o surgimento do comportamento hematófago, tornaram-se parasitas de vertebrados, ou se estes organismos eram originalmente parasitas de vertebrados que passaram a infectar insetos hematófagos (Baker, 1963; 1994; Wallace, 1966; Hoare, 1972; Vickerman, 1994; Maslov e Simpson, 1995; Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; 2007). Contudo, todos os estudos sugerem que, provavelmente, espécies heteroxênicas divergiram, independentemente, várias vezes ao longo da evolução deste grupo.

As análises filogenéticas iniciais baseadas em seqüências da SSUrDNA (subunidade menor da versão nuclear dos genes ribossômicos) sugeriram uma origem parafilética dos tripanossomas, separando *T. brucei* dos demais (Gomez *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 1993; Landweber e Gilbert, 1994; Maslov *et al.*, 1994; 1996, Maslov e Simpson, 1995). Entretanto, com a inclusão de taxa adicionais, a origem monofilética do gênero *Trypanosoma* tornou-se a hipótese mais apoiada: Análises posteriores baseadas em seqüências da SSUrDNA (Stevens *et al.*, 1998; 1999; 2001; Briones *et al.*, 1999; Haag *et al.*, 1998, Wright *et al.*, 1999) e da LSUrDNA (subunidade maior da versão nuclear dos genes ribossômica) (Lukes *et al.*, 1997), sugeriram a monofilia do gênero *Trypanosoma*.

O estudo de Merzlyak *et al.* (2001), sugere que os tripanossomas sejam o grupo irmão dos demais tripanossomatídeos. Nesses trabalhos o grupo irmão de *Trypanosoma* pode ser dividido em dois grupos: Um contendo as espécies que albergam endossimbiontes bacterianos dos gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* e um grande grupo composto por *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Leptomonas*, *Crithidia* e *Blastocrithidia*. Portanto, esses estudos sugerem que os tripanossomas sejam um grupo monofilético que se originou dos bodonídeos de vida livre e cujo grupo basal seja constituído por tripanossomas da secção Salivaria (Haag *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2002) ou, como posteriormente proposto, os tripanossomas de peixes e anfíbios (Stevens *et al.*, 1999; 2001). Estes dados contrariam a hipótese inicial de que as espécies heteroxênicas se originaram das monoxênicas e que essas últimas deveriam ser as mais relacionadas com os kinetoplastídeos de vida livre (Lake *et al.*, 1988).

A questão da monofilia do gênero *Trypanosoma* foi novamente colocada sob disputa com a publicação de dois outros trabalhos (Hughes e Piontkivska, 2003a, b). Esses autores questionaram as hipóteses anteriores sugerindo que os parasitas da secção Salivaria não são proximamente

relacionados aos demais tripanossomas. Para esses autores, a monofilia do gênero *Trypanosoma* obtida nos trabalhos anteriores seria um artefato devido à utilização de grupos externos inadequados. Hamilton *et al.* (2004), a fim de refutar os resultados de Hughes e Piontkivska (2003a, b), analisaram dois loci gênicos (SSUrDNA e gGAPDH) para inferências filogenéticas de um grande número de tripanossomatídeos. Esse trabalho corrobora estudos anteriores (Stevens *et al.*, 1999; 2001; Stevens e Gibson, 1999a, b) que suportavam a monofilia do gênero *Trypanosoma*. A análise do gene de gGAPDH sugere ainda, diferentemente dos trabalhos anteriores, que os parasitas do gênero *Trypanosoma* tenham surgido a partir de ancestrais monoxênicos parasitas de insetos hematófagos (*Blastocrithidia*), pois, o clado de tripanossomas aparece como grupo apical dentro do grupo de tripanossomatídeos predominantemente parasita de insetos. Análises realizadas com seqüências de HSP90 (Lukes *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2003) geraram filogenias congruentes com as obtidas com seqüências de SSUrRNA e gGAPDH, indicando a monofilia de *Trypanosoma*.

Diversas análises de inferências filogenéticas definiram vários cladogramas no gênero *Trypanosoma* (Figura 3):

Clado *T. brucei*, formado pelos tripanossomas de mamíferos da Secção Salivaria, cuja distância filogenética dos demais tripanossomas sugere uma história evolutiva distinta, confinada à África e associada com a mosca tsetse. Tripanossomas isolados de répteis (*T. grayi* e *T. varani*) e de anfíbios (*T. mega*) africanos foram posicionados em grupos muito distantes do clado *T. brucei*. Estes dados junto com evidências paleogeográficas sugerem que a divergência do clado *T. brucei* dos outros tripanossomas data do período médio-Cretáceo, há cerca de 100 milhões de anos, quando a África se isolou dos outros continentes (Stevens *et al.*, 1999; 2001).

Clado *T. cruzi*, constituído por tripanossomas de mamíferos americanos transmitidos por triatomíneos (*T. cruzi* e *T. rangeli*), por tripanossomas exclusivos de morcegos do Novo e Velho Mundo e por um isolado de canguru, indicando que este grupo se originou antes da separação da América do Sul e Austrália, após a separação da África (Stevens *et al.*, 2001).

Clado Aquático, formado predominantemente por tripanossomas isolados de anuros e peixes (esse grupo será discutido com maiores detalhes no item 4.4).

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

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. 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.*, 2005a)

Clados *T. avium* e *T. corvi* (Votýpka *et al.* 2004), formados por tripanossomas de aves e artrópodes de vários grupos, aparentemente, sem restrição a espécie de aves (Sehgal *et al.*, 2001).

Figura 3. Relacionamento filogenético entre organismos da ordem Trypanosomatida. Modificado de Hamilton *et al.* (2007).

1.4 Tripanossomas de anuros

Cerca de sessenta espécies de tripanossomas de anuros já foram relatadas no mundo inteiro até 1974, data da última revisão deste grupo de tripanossomas (Bardsley e Harmsen, 1973). Destas 60 espécies, Diamond (1965) em uma detalhada revisão reconheceu apenas 26 (Tabela 1, Figura 4). Esta confusão se deve ao fato de que estas espécies foram identificadas com base em descrições morfológicas de formas do sangue. Ainda hoje, estudos sobre a diversidade destes tripanossomas têm se baseado neste parâmetro (Desser, 2001; Zickus, 2002).

Poucos estudos foram realizados com tripanossomas cultivados, sendo a maioria do Canadá e Estados Unidos. Quando inciamos este trabalho, apenas 7 isolados de tripanossomas de anuros

havia sido cultivados, 5 isolados do América do Norte, um isolado da África e um da Europa e nenhum isolado da América Latina havia sido isolado e mantido em cultura (Clark *et al.*, 1995, Tabela 1). Cinco espécies de tripanossomas de anuros foram descritas no Brasil: quatro em *Leptodactylus ocellatus* (*T. ocellati*, *T. leptodactyli*, *T. celestinoi* e *T. rotatorium*) e uma em *Scinax ruber* (*T. borrelli*) (Bardsley e Harmsen, 1973). Contudo, além de terem sido identificadas apenas por critérios morfológicos, não foram cultivadas ou criopreservadas.

Atualmente, das mais de sessenta espécies de tripanossomas descritas nesses hospedeiros (Bardsley e Harmsen, 1973), apenas 7 podem ser consideradas espécies válidas (Tabela 1) baseado em estudos de isoenzimas (Martin *et al.*, 1992a,b), riboprinting (Clark *et al.*, 1995), filogenias baseadas no gene ribossômico (Haag *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2002) e caracterização dos genes de mini-exon (Gibson *et al.*, 2000). As demais espécies descritas não foram isoladas em cultura, ou estas foram perdidas, o que impossibilita a validação das mesmas.

1.4.1 Morfologia

A análise morfológica de tripanossomas de anuros por microscopia de luz revelou uma grande diversidade de formas dos tripanossomas de anuros. Muitos trabalhos publicados sobre esses tripanossomas se restringem a extensas descrições morfológicas das formas presentes no sangue dos anuros. A descrição de novas espécies tradicionalmente está baseada no reconhecimento de tipos morfológicos, muitas vezes definidos com base em diferenças extremamente sutis. Não sabemos se os tipos morfológicos (morfotipos) correspondem a diferentes espécies ou a diferentes estágios de uma mesma espécie.

Anuros infectados por tripanossomas, tanto experimental quanto naturalmente, normalmente podem apresentar mais de um morfotipo. Desser (2001), em um estudo de diversidade de parasitas em anuros da Costa Rica, encontrou, em um único indivíduo de *Rana vaillanti*, cinco espécies de tripanossomas. É interessante notar que Barta e Desser (1984) e Desser (2001) observaram que espécies de anuros com hábitos mais aquáticos são mais suscetíveis a infecções por tripanossomas, talvez pelo contato com vetores aquáticos como sanguessugas, e apresentam uma maior diversidade de formas no sangue. Vários trabalhos sobre a diversidade de tripanossomas sugerem que esses parasitas sejam inespecíficos com relação à espécie ou mesmo à família do hospedeiro vertebrado (Werner e Walewski, 1976; Werner, 1993; Woo e Bogart, 1984; Barta e Desser, 1984). Esses autores interpretam a variedade de formas encontradas no sangue de anuros como infecções mistas por várias espécies, sugerindo que tripanossomas de anuros podem normalmente romper a barreira de espécie do hospedeiro vertebrado. Essa questão levou Scorza e Boyer (1958) a estudar o papel do hospedeiro vertebrado sob a morfologia de tripanossomas de anuros. A inoculação de *T. leptodactyli* (de

Leptodactylus bolivianus) em *Hyla crepitans* deu origem a infecções por parasitas similares a *T. borrelli*, porém, quando esse parasita foi inoculado em *L. bolivianus*, as formas observadas eram semelhantes a *T. costatum* e *T. leptodactyli* e em *Phyllomedusa bicolor*, os flagelados no sangue eram similares a *T. arcei*. *Trypanosoma rotatorium*, em ranídeos, é considerado uma espécie polimórfica e foram agrupados no complexo *T. rotatorium*, que pode albergar diferentes morfotipos (Bardsley e Harmsen, 1969). De fato, existem muitas dúvidas se esse polimorfismo representa a expressão fenotípica de um mesmo genoma, infecções por várias linhagens de tripanossomas ou se ambos os fenômenos podem ocorrer.

Os tripanossomas de anuros apresentam desenvolvimento extremamente pleomórfico (Bardsley e Harmsen, 1973). Martin e Desser (1991a) observaram que a morfologia dos flagelados em *B. americanus* experimentalmente infectado com um clone de *T. fallisi* varia em função da estação do ano, com duas fases de infecção. No final da primavera e durante todo o verão são observadas formas tripomastigotas largas, provavelmente um indício de início de infecção. Formas mais curtas e finas são observadas em todas as épocas do ano. Esses experimentos mostram uma alteração da forma tripomastigota curta para larga após períodos de frio, sugerindo que esses flagelados sofram alterações morfológicas sazonais dependentes da temperatura ou da redução da resposta imunológica do hospedeiro devido ao abaixamento da temperatura. Reilly e Woo (1982b) também observaram variações morfológicas relacionadas com tempo de infecção e temperatura em outros dois tripanossomas.

Poucos são os trabalhos sobre ultra-estrutura de tripanossomas de anuros. Com exceção do tamanho do cinetoplasto, as demais estruturas celulares nesses organismos parecem não diferir significativamente das descritas em tripanossomas de mamíferos (Reilly e Woo, 1982c; Martin e Desser, 1990). Steinert e Novikoff (1960) observaram uma depressão na superfície da membrana plasmática, próxima da base flagelar de formas de cultura de *T. mega*, que forma um canal levando ao interior da célula. Essa estrutura também foi caracterizada em *T. fallisi*, formas de cultura e formas encontradas no vetor, a sanguessuga *Desserobdella picta* (Martin e Desser, 1991a). Essa estrutura é análoga ao citóstoma dos ciliados e está presente em tripanossomas de peixes e em algumas espécies de tripanossomas de mamíferos. *T. fallisi* apresenta microorganismos intracelulares semelhantes aos observados no tripanossoma de peixe *T. cobitis* (Martin e Desser, 1990; 1991a).

Diamond (1965) em sua extensa revisão taxonômica de tripanossomas de anuros reconheceu 26 espécies com ampla distribuição e definiu os morfotipos presentes no sangue desses hospedeiros (Figura 4, Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de tripanossomas de anuros depois de Diamond (1965).

Tripanossoma	Hospedeiros	Origem Geográfica	Referência
<i>T. ampanense</i>	<i>Rana blythi</i>	Malásia	Miyata e Yong, 1994
<i>T. andersoni</i>	<i>Hyla versicolor</i>	América do Norte	Reilly e Woo, 1982a
<i>T. arcei</i> *	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Argentina e Brasil	Mazza <i>et al.</i> , 1927
<i>T. belli</i> *	<i>Rana temporaria</i>	China	Nabarro, 1907
<i>T. bocagei</i> *	<i>Bufo gargarizans</i> , <i>B. melanostictus</i> , <i>B. regularis</i>	África e Ásia	França, 1911
<i>T. borrelli</i> *	<i>Scinax ruber</i>	Brasil	Marchoux e Salimbeni, 1907
<i>T. boylii</i>	<i>Rana boylii boylii</i>	América do Norte	Lehmann, 1959
<i>T. bufophlebotomi</i>	<i>Bufo boreas halophilus</i>	América do Norte	Ayala, 1970
<i>T. bulat</i>	<i>Rana blythi</i>	Malásia	Miyata e Yong, 1994
<i>T. canadensis</i>	<i>Rana pipiens</i>	América do Norte	Woo, 1969a
<i>T. chalconotae</i>	<i>Rana chalconota</i>	?	Miyata <i>et al.</i> , 1994
<i>T. chattoni</i> *¶	<i>Bufo arenarum</i> , <i>B. melanostictus</i> , <i>Ceratophrys ornata</i> , <i>Hyla arborea</i> , <i>H. raddiana</i> , <i>Leptodactylus ocellatus</i> , <i>Phyllomedusa salvagii</i> , <i>Rana catesbiana</i> , <i>R. clamitans</i> , <i>R. pipiens</i> , <i>R. sphenoccephala</i>	África, América do Norte, América do Sul (Argentina), Ásia e Europa	Mathis e Léger, 1911
<i>T. clamatae</i> *	<i>Rana clamitans</i>	América do Norte	Stebbins, 1907
<i>T. clelandi</i> *	<i>Limnodinastes ornatus</i> , <i>L. tasmaniensis</i>	Austrália	Johnston, 1916
<i>T. diamondi</i>	<i>Rana pipiens</i>	América do Norte	Pérez-Reyes, 1969a
<i>T. fallisi</i> ¶	<i>Bufo americanus</i>	América do Norte	Martin e Desser, 1991
<i>T. galba</i>	<i>Rana montezumae</i> , <i>R. pustulosa</i> , <i>R. palmipes</i>	América do Norte	Pérez-Reyes, 1968
<i>T. gaumontis</i> *	<i>Bufo americanus</i>	América do Norte	Fantham <i>et al.</i> , 1942
<i>T. grandis</i>	<i>Rana pipiens</i>	América do Norte	Pérez-Reyes, 1969a
<i>T. grylli</i> *	<i>Acris gryllus</i>	América do Norte	Nigrelli, 1945
<i>T. hosei</i>	<i>Rana hosei</i>	Malásia	Miyata e Young, 1990
<i>T. inopinatum</i> *	<i>Rana esculenta</i> , <i>R. hexadactyl</i> , <i>R. temporaria</i> , <i>R. tigrina</i>	América do Norte, Ásia e Europa	Sergent e Sergent, 1904
<i>T. ishigakiense</i>	<i>Rana limnocharis limnocharis</i>	Japão	Miyata, 1978
<i>T. karyozeukton</i> *	<i>B. regularis</i> , <i>R. mascarensis</i> , <i>R. occipitalis</i> , <i>R. oxirhynchus</i>	África	Dutton e Todd, 1903
<i>T. kuhlii</i>	<i>Rana kuhlii</i>	?	Miyata <i>et al.</i> , 1995
<i>T. lavalia</i> *	<i>Bufo americanus</i>	América do Norte	Fantham <i>et al.</i> , 1942
<i>T. leptobranchii</i>	<i>Leptobranchium hendricksoni</i>	?	Miyata <i>et al.</i> , 1995
<i>T. leptodactyli</i> *	<i>Ceratophrys ornata</i> , <i>Hyla raddiana</i> , <i>Leptodactylus bufonius</i> , <i>L. ocellatus</i>	Argentina e Brasil	Carini, 1910
<i>T. loricatum</i> *	<i>Rana esculenta</i> , <i>R. guntheri</i> , <i>R. limnocharis</i> , <i>R. nigromaculata</i> , <i>R. plancyi</i> , <i>R. tigrina</i>	Ásia e Europa	(Mayer, 1843) França e Athias, 1906
<i>T. maleisiense</i>	<i>Rana blythi</i>	Malásia	Miyata e Yong, 1994
<i>T. mega</i> *¶	<i>B. regularis</i> e <i>R. oxirhynchus</i>	África	Dutton e Todd, 1903
<i>T. melanosticti</i>	<i>Bufo melanostictus</i>	?	Miyata <i>et al.</i> , 1995
<i>T. midaii</i>	<i>Rana blythi</i>	Malásia	Miyata e Yong, 1994
<i>T. miyagii</i>	<i>Rana namiyai</i> , <i>Rana narina</i> , <i>Rana holsti</i> , <i>Rana ishikawae</i> , <i>Rana subaspera</i>	Japão	Miyata, 1978
<i>T. montezumae</i>	<i>Rana montezumae</i> , <i>R. pustulosa</i> , <i>R. palmipes</i>	América do Norte	Pérez-Reyes <i>et al.</i> , 1960
<i>T. montrealis</i> *	<i>Bufo americanus</i>	América do Norte	Fantham <i>et al.</i> , 1942
<i>T. nagasakiense</i>	<i>Hyla arborea japonica</i>	Japão	Miyata, 1978
<i>T. nelspruitense</i> *	<i>Rana angolensis</i>	África	Laveran, 1904
<i>T. neveulemairei</i> *¶	<i>Rana esculenta</i>	Córsega	Brumpt, 1928
<i>T. oitaense</i>	?	Oeste asiático	Miyata <i>et al.</i> , 1994
<i>T. panjang</i>	<i>Polypedates leucomystax</i>	Oeste asiático	Miyata <i>et al.</i> , 1994
<i>T. parroti</i> *	<i>Discoglossus pictus</i>	Argélia	Brumpt, 1923
<i>T. parvum</i> *	<i>Rana clamitans</i>	América do Norte	Kudo, 1922
<i>T. pipientis</i> *	<i>Rana pipiens</i> , <i>R. sylvatica</i>	América do Norte	Diamond, 1950
<i>T. prominani</i>	<i>Rhacophorus prominans</i>	Oeste asiático	Miyata <i>et al.</i> , 1994
<i>T. pseudomiyagii</i>	<i>Rana ridibunda</i>	Iraque	Miyata <i>et al.</i> , 1989
<i>T. pseudopodium</i>	<i>Bufo americanus</i>	América do Norte	Werner e Walewski, 1976
<i>T. raksasa</i>	<i>Rana erythraea</i>	?	?
<i>T. ranarum</i> *¶	<i>Rana clamitans</i> , <i>R. esculenta</i> , <i>R. mugiens</i> , <i>R. pipiens</i>	América do Norte, Ásia e Europa	(Lankester, 1871) Danilewsky, 1885
<i>T. rotatorium</i> *¶	<i>Bufo arenarum</i> , <i>B. regularis</i> , <i>Ceratophrys ornata</i> , <i>Hyla arborea</i> , <i>H. raddiana</i> , <i>Lepidobatrachus asper</i> , <i>Leptodactylus bufonius</i> , <i>L. ocellatus</i> , <i>Phyllomedusa sauvagii</i> , <i>Rana esculenta</i> , <i>R. guntheri</i> , <i>R. limnocharis</i> , <i>R. mascarensis</i> , <i>R. nigromaculata</i> , <i>R. occipitalis</i> , <i>R. plancyi</i> , <i>R. tigrina</i> , girino de <i>Rana rugosa</i>	Ásia, África, Europa e América do Sul (Argentina e Brasil)	(Mayer, 1843) Laveran e Mesnil, 1901
<i>T. rugosae</i>	girino de <i>Rana rugosa</i>	Japão	Miyata, 1978
<i>T. schimdti</i> *¶	<i>Rana pipiens</i> , <i>R. sphenoccephala</i>	América do Norte	Diamond, 1965
<i>T. sembeli</i>	?	Oeste asiático	Miyata <i>et al.</i> , 1994
<i>T. sergenti</i> *	<i>Discoglossus pictus</i>	Argélia	Brumpt, 1923
<i>T. terbesar</i>	<i>Bufo asper</i>	Malásia	Miyata e Poon, 1992
<i>T. tsukamotoi</i>	<i>Rana namiyai</i>	Japão	Miyata, 1978
<i>T. tsunozomiyatai</i>	<i>Rana rugosa</i> , <i>Rana limnocharis limnocharis</i>	Japão	Miyata, 1978
<i>T. tumida</i> *	<i>Rana nutti</i>	África	Averintsev, 1916
<i>T. wallacei</i>	?	Oeste asiático	Miyata <i>et al.</i> , 1994
<i>T. yongi</i>	<i>Bufo asper</i>	Malásia	Miyata e Poon, 1992

*espécies consideradas válidas por Diamond, (1965).

¶espécies consideradas válidas baseado em estudos moleculares.

Figura 4. Exemplos de espécies de tripanossomas de anuros consideradas válidas por Diamond (1965) e proposta de classificação de tripanossomas de anuros baseada em marcadores morfológicos de formas sanguíneas: Grupo A: Corpo achatado e em forma de folha; Grupo B: Corpo, em visão frontal, achatado, mas não em forma de folha; lateralmente apresenta região anterior larga, a partir do cinetoplasto, que vai se estreitando posteriormente; Grupo C: Corpo robusto; frontalmente comprimido e ovóide; lateralmente robusto, elíptico, cerca de duas vezes mais comprido do que largo; Grupo D: Corpo alongado, extremidades estreitas; D1: Cinetoplasto mais próximo do núcleo do que da extremidade posterior; D2: Cinetoplasto mais próximo da extremidade posterior do que do núcleo; Grupo E: Corpo piriforme; Grupo F: Corpo esférico.

1.4.2 Hospedeiros vertebrados e distribuição geográfica

A classe Amphibia é constituída por descendentes dos mais antigos vertebrados terrestres, sendo o primeiro grupo de cordados a viver fora da água. Os grupos atuais dessa classe pertencem a subdivisão Lissamphibia (Triássico recente) e estão distribuídos em três ordens: Anura (sapos, rãs e pererecas), Gymnophiona (cobras-cegas) e Caudata (salamandras). Por ser um grupo basal nos tetrápodes, grupo que engloba o último ancestral comum dos amniotas, anfíbios e seus descendentes, a ordem Anura tem grande importância nos estudos evolutivos dos tetrápodes (Laurin *et al.*, 2000) e de outros vertebrados (Graybeal, 1997; Bossuyt e Milinkovith, 2001).

Anfíbios vivem principalmente na água e em ambientes úmidos, mas nunca no mar. A diversidade de espécies de anfíbios excede a reconhecida para mamíferos (Glaw e Köhler, 1998) e mais da metade dessa diversidade está concentrada na região neotropical (cerca de 68% das espécies). A ordem Anura é constituída por 45 famílias, com cerca de 5362 espécies (que corresponde a cerca de 88% da diversidade de anfíbios) dispersas por todos os continentes, com exceção da Antártica, sendo mais comuns em regiões temperadas úmidas, embora algumas habitem o círculo polar ártico e outras vivam em desertos (Frost, 2006; Pough *et al.*, 1996). Duellman (1988) observou que a região neotropical abriga a maior diversidade de anuros, aproximadamente 44% do número das espécies reconhecidas até então. O Brasil concentra a maior riqueza de espécies de anuros do planeta, representada por 747 espécies (SBH 2005) com uma taxa de endemismo de 64% (IUCN 2004).

Até o começo deste século o relacionamento filogenético entre os anuros era muito controverso ou pouco resolvido (Ford e Cannatella, 1993). Haas (2003) apresentou o primeiro trabalho de filogenia de anuros baseado em um grande número de espécies de anuros (81) e diversos marcadores (136 caracteres larvais, 6 de biologia reprodutiva e 14 de morfologia dos animais adultos).

Faivovich *et al.* (2005), em um trabalho muito mais detalhado com 276 espécies (~5100pb de nove genes mais 37 marcadores anatômicos) cujo enfoque principal era a família Hylidae, propôs a revisão taxonômica da família Hylidae devido à merofilia de diversos gêneros desse grupo. Um resultado interessante dessa revisão foi o desmembramento do gênero *Hyla*, cuja maior diversidade se localizava na América do Sul e, após essa revisão, ficou restrito à América do Norte, em diversos gêneros.

Embora os dois trabalhos citados acima tenham representado um grande avanço para o estudo da sistemática e evolução de anuros, diversos pontos, como o relacionamento entre as três ordens de anfíbios e a monofilia de diversas famílias e gêneros de anuros, ainda permaneciam controversos. Em relação a esses pontos, uma grande contribuição foi dada por Frost *et al.* (2006) que analisaram marcadores moleculares e morfológicos de 522 anfíbios, representantes das três ordens de

Lissamfibia. Os resultados desses autores sugerem que Lissamfibia é um grupo monofilético, tendo as cecílias como grupo basal. Além disso, esse trabalho corrobora estudos anteriores no que se refere à parafilia de determinados gêneros (por exemplo, *Bufo*, Graybeal, 1997) e famílias (como Leptodactylidae, Haas, 2003). Uma nova classificação para Anura foi proposta com base nesse extenso estudo (Frost, 2006).

Na revisão de Bardsley e Harmsen (1973) foram listadas 88 espécies de anuros encontradas com tripanossomas. Essas espécies pertencem a nove famílias representativas da ordem Anura. Contudo, o número de espécies de anuros em que foram observados tripanossomas é bastante diferente para cada família. A família “Ranidae” representa 44% dos tripanossomas descritos (38 espécies do gênero “*Rana*” e uma espécie do gênero *Ptychadena*), seguida da família “Hylidae” (19 espécies, 22%) e Bufonidae (16 espécies do gênero “*Bufo*”, 18%).

Todos os estudos realizados até o momento sugerem que tripanossomas são parasitas ubíquos em anuros e dada a diversidade de espécies, características ecológicas e de ambientes observadas nesse grupo de vertebrados, é provável que a diversidade desses parasitas suplante a observada para tripanossomas de mamíferos.

1.4.3 Ciclo Biológico

1.4.3.1 Desenvolvimento no hospedeiro vertebrado

O ciclo biológico melhor estudado de um tripanossoma de anuro foi o de *T. fallisi*, isolado de *Bufo americanus* (Martin e Desser, 1990). Martin e Desser (1991a) analisaram o desenvolvimento dos flagelados observados no sangue de *B. americanus* (criado em laboratório) experimentalmente infectado com um clone de *T. fallisi*. A infecção experimental apresentou dois estágios, de 8 a 10 dias após a infecção, as formas tripomastigotas metacíclicas dão origem aos tripomastigotas sangüícolos, com o corpo largo e membrana ondulante bem desenvolvida, essas formas são gradualmente substituídas por formas tripomastigotas curtas e finas. Esses autores observaram também que formas tripomastigotas largas são observadas apenas no verão (Martim e Desser, 1991a).

Espécimes de *Hyla versicolor*, criadas em laboratório, inoculadas com *T. andersoni* e *T. grylli* e aclimatadas a 10°C, 22°C e 30°C por cinquenta dias também apresentaram variações de acordo com tempo de infecção e temperatura (Reilly e Woo, 1982b). Ambas as espécies apresentaram formas epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas, contudo o local de ocorrência dos tripanossomas diferiu: Formas de *T. andersoni* foram encontradas principalmente no fígado enquanto que as de *T. grylli* foram observadas na circulação geral. As três formas foram encontradas em divisões binárias ou múltiplas em *T. grylli*, que apresentou aumento no número e tamanho dos parasitas nas três temperatura (até 10 dias a 22°C e 50 dias nas demais temperaturas), mas sofreu pequenas diferenças

de tamanho com o tempo e temperaturas testadas. *T. andersoni* não apresentou formas em divisão e aumentou em número e tamanho a 22°C (até 20 dias) e 30°C (até 50 dias), mas pouco a 10°C.

Bardsley e Harmsen (1969) testaram o efeito da temperatura sob a parasitemia periférica de *T. rotatorium* em *Rana catesbeiana*, revelando forte correlação entre temperatura e parasitemia. Sob a menor temperatura testada (10°C) foi observada grande concentração de tripanossomas em órgãos como fígado, rins e coração. Variações circadianas foram observadas a 26°C, mas não a 10°C. Esses autores sugerem que as variações de temperatura não são as causas diretas da variação da parasitemia. Em um estudo posterior (Bardsley e Harmsen, 1970) outros fatores como excitação e adrenalina foram associados com a liberação para a circulação periférica de tripanossomas estocados em órgãos como o fígado e os rins. Johnson *et al.* (1993) observaram variação circadiana na parasitemia periférica de um tripanossoma de anuro em *Hyla cinerea*. A parasitemia nesse vertebrado, que é baixa das 8h às 16h, sofre um incremento dramático até às 21h mantendo seu pico até às 1h. Neste horário de pico de parasitemia também é observado um pico de ocorrência de *Corethrella wirthi* (díptera) se alimentando em machos adultos de *H. cinerea*, que ao contrário das fêmeas, apresentam infecção por tripanossoma (Ver item 4.3.2.2). McKeever e French (1991), demonstraram que *C. wirthi* é atraída pelo canto de machos de anuros. Esses machos interrompem seu canto ao entrarem em contato físico com as fêmeas de forma que estas raramente entram em contato com o inseto, o que explicaria a suposta ausência de tripanossomas nas mesmas.

Variações circadianas na parasitemia periferia de tripanossomas de anuros também foram correlacionadas com a luminosidade (Southworth *et al.*, 1968). Em tripanossomas do complexo *T. rotatorium* em *R. clamitans* observou-se um incremento no número de tripanossomas no sangue em períodos de luminosidade e retenção desses parasitas nos rins na ausência de luz, mesmo em fotoperíodos invertidos. Os mesmos resultados foram observados para animais sem os olhos. Animais mantidos na escuridão por 24h apresentaram tripanossomas apenas nos rins e com 24h de luminosidade apresentaram o ciclo natural do tripanossoma.

O aparecimento e o aumento de infecções por tripanossomas em anuros aparentemente está relacionado à idade do hospedeiro (Bardsley e Harmsen, 1973). Barta e Desser (1984), notaram que a prevalência de *T. ranarum* em *B. americanus* aumenta exponencialmente em indivíduos acima de 50mm de comprimento (medida correlacionada à idade em que se alcança a maturidade sexual).

O local de multiplicação de tripanossomas de anuros no hospedeiro vertebrado não está restrito à circulação sanguínea: *T. inopinatum* multiplica-se em células da medula óssea e do baço (Buttner e Bourcart, 1955), *T. karyozeukton*, *T. leptodactyli* e *T. sp* em hemácias (Carini, 1910) e *T. parroti* em células do fígado (Brumpt, 1936).

1.4.3.1.1 Patogenia

Tripanossomas de anuros são comumente reportados como não patogênicos para seus respectivos hospedeiros vertebrados (Bardsley e Harmsen, 1973). Contudo, esses tripanossomas podem vir a ser patogênicos para girinos ou para anuros adultos quando a infecção atinge altos níveis de parasitemia (Bardsley e Harmsen, 1973). Brumpt (1906) demonstrou que a linhagem algeriana de *T. inopinatum*, que não é patogênico para *R. esculenta* da mesma região, é letal para anuros europeus da mesma espécie. O comportamento diferencial de *T. inopinatum* em diferentes populações do hospedeiro foi posteriormente investigado por Buttner e Bourcart (1955). Esses autores postularam que a dieta da população algeriana de *R. esculenta* é o fator responsável pela sua resistência a *T. inopinatum* e que a patogenia no anuro ocorre devido a incapacidade de destruir os tripanossomas nos primeiros estágios de desenvolvimento. Diamond reportou que tripanossomas de *R. sphenoccephala* do Estado da Florida (E.U.A.) são letais para *R. pipiens* de Minnesota (Bardsley e Harmsen, 1973). Esses dados sugerem a existência de imunidade dos anuros frente às espécies simpátricas de tripanossomas, com as infecções por anuros mantidas em equilíbrio enzoótico apenas nos seus habitats naturais.

1.4.3.2 Hospedeiros invertebrados

Os hospedeiros invertebrados e vetores de tripanossomas de anuros estão, aparentemente, relacionados com o habitat destes animais. No ambiente aquático, os vetores são principalmente sanguessugas. No ambiente terrestre, a transmissão pode ser realizada por diversos artrópodes hematófagos.

1.4.3.2.1 Sanguessugas

Sanguessugas, classe Hirudinea, filo Anellida, são um dos ectoparasitas mais prevalentes de anuros (Bardsley e Harmsen, 1973). Essa classe contém cerca de 500 espécies marinhas, terrestres e de água doce (Ruppert e Barnes, 1994) divididas em três subclasses: Branchiobdellida, Achantobdellida e Euhirudinea. Euhirudinea, que compreende a maioria das sanguessugas, possui duas ordens: Rhynchobdellida e Arhynchobdellida. Dos grupos mencionados acima, apenas a ordem Rhynchobdellida não é corroborada em inferências filogenéticas moleculares (Siddall e Burreson, 1998; Siddall *et al.*, 2001).

As sanguessugas terrestres e de água doce estão distribuídas em dez regiões e sub-regiões zoogeográficas. Na América do Sul predominam espécies endêmicas da família Glossiphoniidae (Rhynchobdellida) e da sub-ordem Hirudiniformes (Arhynchobdellida) (Sawyer, 1986). Muitas espécies de sanguessugas são predadoras, porém, a maioria é ectoparasita sugadora de sangue de uma grande variedade de hospedeiros. Apesar de serem raramente restritas a uma espécie de hospedeiro,

usualmente parasitam apenas uma classe de vertebrados. Apenas as ordens Rhynchobdellida e Arhynchobdellida possuem espécies que se alimentam em anuros. Algumas espécies da ordem Rhynchobdellida são vetoras de tripanossomas de anuros. As espécies da ordem Arhynchobdellida parasitas de anuros são onívoras sugadoras de sangue facultativas como, por exemplo, *Helobdella algira* parasita de *Rana* spp (Sawyer, 1986). Outras espécies, por exemplo, *Hirudo medicinalis*, se alimentam em anuros e mamíferos.

A transmissão de tripanossomas por sanguessugas é o mecanismo aceito para as espécies que parasitam peixes (revisado em Molyneux, 1977). Anfíbios (Bardsley e Harmsen, 1973; Molyneux, 1977), répteis (Siddall e Desser, 1992; Molyneux, 1977) e mamíferos (Hoare, 1972) são parasitados por tripanossomas transmitidos por sanguessugas ou artrópodes. Nesses modelos não observamos apenas ciclos “aquáticos” já que determinadas espécies de sanguessugas implicadas na transmissão de tripanossomas possuem hábitos terrestres: Haemadipsídeos dos gêneros *Micobdella*, *Philaemon*, *Haemadipsa* e *Leiobdella*, por exemplo, foram implicados na transmissão de tripanossomas australianos do grupo *T. cyclops*, que contêm isolados de “wallaby” e de anuros (*Myxophyes fleayi*) (Hamilton *et al.*, 2005a).

Sanguessugas das famílias Glossifoniidae, Piscicolidae e Hirudinidae foram incriminadas como supostas vetoras de tripanossomas de anuros (Bardsley e Harmsen, 1973). Billet (1904) foi o primeiro a avaliar o papel de sanguessugas na transmissão de tripanossomas de anuros, encontrando uma diversidade de formas de *T. inopinatum* em *Helobdella algira*. Esse autor, tendo em vista que sanguessugas são comuns em *Rana esculenta* postulou que elas seriam vetoras de *T. inopinatum*, o que foi corroborado por Brumpt (1906), que mostrou a transmissão desse tripanossoma para *R. esculenta* usando como vetor *H. algira*. Após esses estudos, várias espécies de sanguessugas foram apontadas como hospedeiras de uma grande diversidade de tripanossomas de anuros (Bardsley e Harmsen, 1973).

Porém, na maioria desses trabalhos foram utilizados anuros e ou sanguessugas naturalmente infectados coletados na natureza. Animais coletados do campo podem apresentar resultados contraditórios quando analisados por métodos tradicionais de detecção de tripanossomas como esfregaços em lâmina, microhematócrito e hemocultura (Woo, 1983; Jones e Woo, 1989). A detecção de tripanossomas baseada em esfregaço de sangue pode não revelar infecções crípticas (Buttner e Boucart, 1955) invalidando, assim, resultados de infecções experimentais. Embora infecções por tripanossomas tenham sido observadas em girinos (Bardsley e Harmsen, 1973) não encontramos nenhum relato similar para ovos de anuros. O trabalho de Diamond (1965) foi o primeiro a utilizar anuros criados em laboratório a partir de ovos, tendo sido seguido por outros (Pérez-Reyes, 1968; Reilly e Woo, 1982a).

Nos trabalhos da segunda metade do século passado, normalmente foram empregadas sanguessugas jovens retiradas de fêmeas coletadas no campo, ou de vertebrados, para as infecções de anuros em laboratório. Portanto, a mesma questão discutida acima para os anuros é observada em relação às sanguessugas (Reilly e Woo, 1982b). Além disso, Brumpt (1907) sugeriu a transmissão transovariana de *T. inopinatum* em *H. algira* por até 4 gerações. Barrow (1953) não encontrou evidências de transmissão transovariana em *Desserobdella picta* infectada por *T. diemyctyli*, tripanossoma de salamandra. Porém, devido à alta taxa de infecção o autor sugeriu outros meios de infecção além da alimentação em vertebrados contaminados, como o canibalismo de jovens sanguessugas aderidas à mãe infectada.

O desenvolvimento de tripanossomas de anuros em sanguessugas parece ter um padrão geral nos casos estudados: desenvolvimento inicial no ceco ou no estômago dos invertebrados com formas epimastigotas em divisão, seguido de migração anterior para a probóscide onde formas metacíclicas podem ser encontradas (Molyneux, 1977; Martin e Desser, 1991a). É interessante notar que no estudo de Reilly e Woo (1982b), embora tenha havido desenvolvimento de *T. andersoni* em *D. picta*, não houve migração de formas metacíclicas do estômago para a probóscide e essas formas não infectaram *H. versicolor* por inoculação intraperitoneal. Aparentemente, a migração de formas infectivas para a região anterior é pré-requisito para transmissão desses tripanossomas por sanguessugas.

O comportamento alimentar de sanguessugas está relacionado à ecologia dos anuros: *D. picta* alimenta-se em *R. catesbeiana* apenas durante o estágio aquático desse anuro, o que coincide com o pico anual de parasitemia do tripanossoma nesse vertebrado (Bardsley e Harmsen, 1973), sugerindo que a estimulação ambiental ou produzida pela sanguessuga tenha efeito na liberação, para a circulação periférica, de tripanossomas armazenados em órgãos. Martin e Desser (1991a), observam que *T. fallisi* permanece em adultos grandes de *D. picta* por cerca de 6 meses. Os autores sugerem que esse longo tempo de desenvolvimento possa ser uma adaptação ao comportamento do hospedeiro vertebrado que entra em contato com a sanguessuga apenas durante o período de reprodução.

1.4.3.2.2 Insetos hematófagos

A participação de insetos hematófagos na transmissão de tripanossomas a hospedeiros vertebrados é um fenômeno bem conhecido para tripanossomas de mamíferos (Molyneux, 1977; Hoare, 1972). Uma grande variedade de artrópodes hematófagos foi também descrita como possível vetora de tripanossomas de aves (Molyneux, 1977; Votýpka *et al.*, 2002; Desser *et al.*, 1975) e répteis (Molyneux, 1977; Ayala, 1970; Ayala e McKay, 1971; Adler e Theodor, 1935; Shortt e Swaminath, 1931; Minter-Goedbloed *et al.*, 1993).

Diversos estudos apontaram artrópodes como vetores de tripanossomas de anuros, incluindo dípteros e mosquitos (Molyneux, 1977; Bailey, 1962; Anderson e Ayala, 1968; Ayala, 1970; Ayala,

1971; Desser *et al.*, 1973; 1975; Ramos e Urdaneta-Morales, 1977; Johnson *et al.*, 1993; Feng e Chung, 1940). Embora alguns desses trabalhos tenham demonstrado que artrópodes podem ser infectados com tripanossomas de anuros quando se alimentam do sangue de anuros infectados, e que essas infecções envolvem o desenvolvimento do tripanossoma no tubo digestivo do invertebrado, mas não em glândulas salivares ou túbulos de Malpighi, nenhum trabalho demonstrou a capacidade desses supostos vetores de infectar esses hospedeiros por via inoculativa ou contaminativa. Para os tripanossomas de anuros supostamente transmitidos por insetos, a transmissão foi demonstrada, experimentalmente, via ingestão de artrópodes infectados e via inoculação intraperitoneal dos tripanossomas obtidos dos tubos digestivos dos insetos *Lutzomyia vexator* (Anderson e Ayala, 1968) e *Aedes aegypti* (Ramos e Urdaneta-Morales, 1977), ou apenas por ingestão de *Phlebotomus squamirostris* (Feng e Chung, 1940) ou inoculação de *Corethrella winthi* (Johnson *et al.* 1993).

Os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) constituem um grupo bastante diverso de artrópodes com cerca de 400 espécies descritas nas Américas (Young e Duncan, 1994). Esses insetos são comumente conhecidos como vetores de tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* (Grimaldi e Tesh, 1993), e *Endotrypanum* (Shaw, 1964; Braga *et al.*, 2003; Katakura *et al.*, 2003).

Existem vários relatos de tripanossomas em flebotomíneos (Shaw *et al.*, 2003), alguns tendo sido correlacionados com hospedeiros mamíferos (McConnel e Correa, 1964; Herrer, 1942), anuros (Ayala, 1971; Anderson e Ayala, 1968; Ramos e Urdaneta-Morales, 1977, Feng e Chung, 1940) ou lagartos (Ayala e McKay, 1971). Outros trabalhos relatam flebotomíneos infectados com tripanossomas de hospedeiros desconhecidos (Chanotis e Anderson, 1968; Johnson e Hertig, 1970; Sherlock e Pessoa, 1966; Shaw e Lainson, 1972).

Muitas espécies de flebotomíneos têm hábitos restritos de alimentação, *Lutzomyia vexatrix*, por exemplo, alimenta-se apenas em répteis e anuros (Anderson e Ayala, 1968; Ayala, 1971). Tesh *et al.* (1971), relatou a preferência alimentar de algumas espécies de flebotomíneos do Panamá, determinada pela reação imunológica do conteúdo digestivo do inseto com antisoros específicos para mamíferos. Algumas espécies, *L. trinidadensis*, *L. rorotaensis* e *L. nordestina* (sinonímia de *Sciopemyia sordelli*), aparentemente, se alimentam apenas de répteis e/ou anfíbios. É interessante observar que *S. sordelli*, em diversos trabalhos sobre epidemiologia de leishmanioses, foi encontrada apenas com parasitas do gênero *Trypanosoma* (Shaw *et al.*, 2003).

Infecções experimentais revelaram detalhes do desenvolvimento de tripanossomas de anuros em flebotomíneos e sugerem que esses insetos são os prováveis vetores desses parasitas entre anuros na natureza.

Anderson e Ayala (1968) alimentaram *Lutzomyia vexatrix* em *Bufo boreas* (América do Norte) naturalmente e experimentalmente infectados com *T. bufophlebotomi*. Após 24h, foram observadas

formas amastigotas no estômago do inseto, após 48h formas alongadas com flagelo e no terceiro dia, um grande número de formas promastigotas, com rosetas de flagelados. Pelo 4º ou 5º dia, com a completa digestão do sangue no estômago do flebotomíneo, tripanossomas não foram mais encontrados no estômago e formas promastigotas foram observadas ao longo de todo o intestino. No 6º dia, esses flagelados foram encontrados apenas no intestino posterior. Não foram observadas formas epimastigotas. O desenvolvimento de *T. bocagei* de *Bufo gargarizans* (China) em *Phlebotomus squamirostris* obtidos em laboratório a partir de ovos (Feng e Chung, 1940) segue os mesmos passos descritos acima para *T. bufophlebotomi* por Anderson e Ayala (1968). Feng e Chung (1940) descrevem alterações morfológicas proeminentes no processo de migração do intestino anterior ao posterior e formas criticiais no intestino e no estômago, que correspondem ao que denominamos atualmente de pro- e epimastigotas (Hoare e Wallace, 1966).

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). Nesse inseto, a diferenciação dos flagelados no tubo digestivo ocorreu por um período de cerca de 100h e apresentou aspectos diferentes dos observados em flebotomíneos. No estômago as únicas formas observadas, a partir de 2-3h após a alimentação no anuro (*Rana clamitans* coletada no Canadá) foram amastigotas em divisões binárias e múltiplas. Cerca de 72h após a infecção, apareceram os primeiros flagelados no intestino do inseto, esferomastigotas, apresentando também os dois padrões de divisão. Após 85h, quando o sangue do estômago já está quase totalmente digerido, são observados epimastigotas com divisões binárias no intestino.

Ramos e Urdaneta-Morales (1977), testaram a suscetibilidade de *A. aegypti*, *Culex pipiens* e *Rhodnius prolixus*, de colônias de laboratório, a infecções por tripanossomas de *Hyla crepitans* e *Leptodactylus insularum*. *C. pipiens* e *R. prolixus* não foram considerados como possíveis vetores dos tripanossomas pois, ou apresentaram formas degenerativas dos flagelados no tubo digestivo (*R. prolixus* - resultado também observado por Pessoa, 1969) ou não mantiveram a infecção por mais de 72 h (*C. pipiens*). Em *A. aegypti* a infecção durou 96h e observou-se formas esferomastigotas e epimastigotas no estômago e intestino com a formação de rosetas. Bailey (1962) obteve resultados similares quando analisou o desenvolvimento de *T. rotatorium* em *Aedes aegypti* infectado experimentalmente, contudo, a infecção nesse experimento durou apenas 60h. Pérez-Reyes (1968) não obteve sucesso em infecções experimentais de *T. galba* (tripanossoma de *Rana montezuma*, *R. palmipes* e *R. pustulosae*) em *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens* e *Rhodnius prolixus*.

Johnson *et al.* (1993) analisaram o ciclo de vida de *Trypanosoma* sp em *Hyla cinerea* e sugeriram que *Corethrella wirthi*, inseto hematófago da família Corethrellidae, possa estar envolvido na transmissão desse tripanossoma. A infecção de *Hyla cinerea* foi obtida com a inoculação de tripanossomas oriundos do inseto, porém, anuros que foram alimentados com insetos supostamente

infectados não apresentaram infecção aparente por tripanossomas. Não foi possível induzir *C. wirthi* a se alimentar em *H. cinerea* naturalmente infectados. Contudo, a correlação entre a periodicidade da parasitemia periférica em *H. cinerea* e o número de *C. wirthi* que se alimenta neste anuro reforça o papel de vetor desse inseto. Na África, Lloyd *et al.* (1924) alimentaram *Glossina tachinoides* (livre de infecção por tripanossomas) em *Bufo regularis* naturalmente infectado com *T. rotatorium*. Foi observada alta mortalidade entre os insetos, contudo, formas epimastigotas e tripomastigotas foram observadas na parte média do tubo digestivo de poucos exemplares de *G. tachinoides*.

Todos os possíveis insetos vetores apresentaram flagelados restritos ao tubo digestivo, sem evidências de desenvolvimento nas glândulas salivares. Não se sabe se, na natureza, anuros são infectados por contaminação com fezes destes insetos contendo formas metacíclicas, detectadas apenas em flebotomíneos, depositadas próximas ao orifício da picada, ou se a ingestão de insetos infectados é o mecanismo de transmissão, ou ainda, se estes dois mecanismos são importantes.

1.4.4 Filogenia dos tripanossomas de anuros

A origem evolutiva, filogenia e "status" taxonômico dos tripanossomas de anfíbios são ainda controversos. Apesar do pequeno número de isolados analisados, diferentes estudos filogenéticos apresentaram posicionamento distinto para os tripanossomas de anuros:

O primeiro estudo filogenético (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*. Esse clado apresentou-se como irmão do grupo formado por *T. cruzi* e *T. avium* enquanto *T. brucei* se mostrou basal aos tripanossomatídeos, sugerindo a parafilia do gênero *Trypanosoma*. Esta análise mostrou, pela primeira vez, um grupo formado por isolados de peixes e anfíbios. Lukes *et al.* (1997) analisando 11 tripanossomas evidenciaram um grupo que comporta apenas organismos supostamente transmitidos por sanguessugas, grupo "Aquático", contendo *T. rotatorium* (de anuro) *T. boissoni*, *T. triglae* e *T. carassi* (de peixes) e um grupo com os tripanossomas da secção Salivaria. Haag *et al.* (1998), analisando um número maior de isolados de tripanossomas (24) corroboraram a monofilia do grupo "Aquático". Nesse trabalho, dois tripanossomas africanos (*T. mega* de anuro e *T. therezieni* de camaleão) posicionaram-se no grupo aquático.

As análises filogenéticas realizadas por Stevens e Gibson, (1999a) dividiram o grupo Aquático em dois grupos principais. Um constituído por tripanossomas cujos vetores são sanguessugas, isolados de peixes de água doce e salgada, de uma sanguessuga aquática (*T. sp* K&A), de ornitorrinco (*T. binneyi*) e de tartaruga (*T. chelodina*), apoiando a hipótese de coevolução destes tripanossomas com seus vetores aquáticos (sanguessugas). O outro grupo foi formado por isolados de anuros (*T. rotatorium* e *T. mega*) e um isolado de camaleão (*T. therezieni*). Martin *et al.*, (2002) analisaram quatro novos tripanossomas de anuros (*T. ranarum*, *T. neveulemairei*, *T. chattoni* e *T. fallisi*). Três desses

tripanosomas agruparam com *T. mega* e *T. rotatorium*, corroborando o grupo de isolados de anuros. Porém, *T. chattoni*, isolado de *Rana pipiens*, agrupou com isolados de peixes. Gibson *et al.* (2005) corroboram esses agrupamentos no grupo Aquático, porém, mostraram *T. chattoni* mais proximamente relacionado com os demais isolados de anuros do que com isolados de peixes (Figura 5). Se por um lado parece comprovada a transmissão de tripanossomas de peixes para sanguessugas, a transmissão de tripanossomas de anuros por esses vetores foi demonstrada apenas para *T. fallisi* e *T. rotatorium*. Contudo, para esse último, não há evidências de que o tripanossoma originalmente implicado no ciclo com sanguessugas corresponda aos isolados B2I e B2II utilizados nas filogenias (Martin *et al.* 2002). Outros trabalhos sugerem que insetos hematófagos dos gêneros *Culex* (Desser *et al.*, 1973; 1975), *Aedes* (Bailey, 1962; Ramos e Urdaneta-Morales, 1977), *Lutzomyia* (Anderson e Ayala 1968; Ayala e McKay, 1971) e *Corethrella* (Johnson *et al.*, 1993) também podem estar envolvidos no ciclo de tripanossomas de anuros. Esses dados sugerem que tripanossomas não evoluíram estritamente com seus hospedeiros vertebrados, mas sim, que um fator importante na evolução desse grupo tenha sido a transmissão entre hospedeiros que compartilham o mesmo ambiente.

O posicionamento do grupo Aquático nas inferências filogenéticas é controverso, sendo que alguns trabalhos sugerem que este seja o grupo irmão dos demais tripanossomas (Stevens *et al.*, 1999; 2001; Stevens e Gibson, 1999b; Hamilton *et al.*, 2004) e outros que este seja uma irradiação interna ao gênero (Martin *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 1999). Dois trabalhos recentes mostram hipóteses que sugerem a parafilia do grupo Aquático com tripanossomas de anuros segregando adjacentes aos demais tripanossomas desse grupo (Hamilton *et al.*, 2004; Hughes e Piontkivska 2003a;b).

Figura 5. Relacionamento filogenético entre tripanossomas do clado "Aquático". Modificado de Gibson (2005).

1.5 Parâmetros taxonômicos e métodos utilizados na classificação e caracterização de tripanossomas de anuros

1.5.1 Morfologia

Diferentes espécies de tripanossomas 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 classificação de espécies de *Trypanosoma*, sendo particularmente útil na classificação de tripanossomas de mamíferos em subgêneros (Hoare, 1972). Diamond (1965) propôs uma classificação para tripanossomas de anuros com a divisão em cinco grupos com base nos mesmos parâmetros morfológicos empregados para a classificação de tripanossomas de mamíferos (Hoare, 1972). Porém, como os tripanossomas de anuros são altamente pleomórficos, a utilização da morfologia como parâmetro taxonômico tem levado a uma profusão de espécies e a grande confusão. As formas sangüíneas de alguns destes flagelados estão entre as maiores já observadas quando comparadas aos tripanossomas de mamíferos. Apesar da grande diversidade de formas, Bardsley e Harmsen (1973) identificaram categorias em que podem ser enquadrados todos os tipos morfológicos de tripanossomas de anuros: a) *T. inopinatum*, formas tripomastigotas grandes e alongados, algumas bem afiladas, com membrana ondulante bem desenvolvida; b) *T. ranarum*, tripomastigotas muito largos com membrana ondulante bem desenvolvida e flagelo longo; c) *T. rotatorium*, formas menores e robustas com núcleo alongado e membrana ondulante bem definida; d) *T. chattoni*, formas muito grandes, esféricas, sem membrana ondulante e sem flagelo livre. Quando cultivados, os tripanossomas de anuros apresentam formas epimastigotas que não apresentam diferenças tão marcantes quanto as encontradas nas formas do sangue.

Foram realizados estudos por microscopia eletrônica de transmissão com *T. mega* (Steinert e Novikoff, 1960), *T. rotatorium* (Bardsley e Harmsen, 1973), *T. andersoni* (Reilly e Woo, 1982c) e *T. fallisi* (Martin e Desser, 1990). Formas de cultura destes tripanossomas e tripomastigotas sangüíneos de *T. andersoni* e *T. fallisi* não diferiram significativamente dos tripanossomas de mamíferos (Bardsley e Harmsen, 1973). Estes organismos apresentam citóstoma (Steinert e Novikoff, 1960) e estriações longitudinais na porção posterior das formas largas, semelhantes às descritas em tripanossomas de peixes e répteis (Bardsley e Harmsen, 1973).

Bardsley e Harmsen (1973) consideraram que a morfologia, como critério taxonômico, é insuficiente para a classificação de tripanossomas de anuros e que a única espécie adequadamente descrita era *T. pipientis* (Diamond, 1950; 1965). Esses autores propõem como critério para a classificação dos tripanossomas de anuros, a combinação dos seguintes parâmetros:

1. Hospedeiro(s) vertebrado(s) de origem;
2. Hospedeiro(s) invertebrado(s) de origem;
3. Distribuição geográfica;

4. Morfologia e citologia;
5. Composição bioquímica (enzimas, etc.);
6. Fisiologia (requerimentos nutricionais, patologia, etc.);
7. Comportamento;
8. Padrão reprodutivo (ciclo de vida).

1.5.2 Hospedeiro e origem geográfica

Estudos mais recentes indicam que há uma grande variedade de tripanossomas de anuros e que estes apresentam certo grau de isolamento geográfico e de especificidade pela espécie do hospedeiro de origem (Martin *et al.*, 1992a,b; Lun e Desser, 1995; 1996; Clark *et al.*, 1995). Trabalhos antigos, utilizando apenas caracteres morfológicos na identificação dos tripanossomas, sugeriram que algumas espécies, como *T. rotatorium*, eram cosmopolitas e inespecíficas com relação à espécie-hospedeira (Bardsley e Harmsen, 1973) e que este seria um comportamento comum de tripanossomas de anuros. *T. fallisi*, isolado no Canadá, foi originalmente classificado como *T. bufophlebotomi*, descrito na Califórnia, porém, Martin e Desser (1990) sugeriram que esses dois organismos podem corresponder a espécies diferentes baseados em aspectos como isolamento geográfico, hospedeiros e vetores distintos, além de diferenças morfológicas discretas. Clark *et al.* (1995) demonstraram que dois isolados de *T. rotatorium*, identificados por caracteres morfológicos, com hospedeiros e origens geográficas diferentes, são espécie distintas e pouco relacionadas. Em infecções cruzadas com tripanossomas de anuros demonstrou-se uma grande especificidade pelo hospedeiro de origem, podendo, no entanto, haver infecção cruzada entre espécies proximamente relacionadas filogeneticamente (Martin e Desser, 1991b; Werner *et al.*, 1988; Reilly e Woo, 1982b).

1.5.3 Características biológicas

Características biológicas tais como ciclos de vida, mecanismos de transmissão, infecciosidade e patogenicidade constituem importantes parâmetros para a identificação e classificação de tripanossomas em geral, assim como o cultivo e diferenciação "*in vitro*".

Os requerimentos nutricionais para o cultivo de tripanossomas de anuros são bem particulares para cada espécie, assim como pH, osmolaridade, etc. Bardsley e Harmsen (1973) mostraram que os tripanossomas de anuros, *T. rotatorium*, *T. ranarum*, *T. chattoni* e *T. mega* necessitam de meios de cultura diferentes. Diferenças no comportamento em cultura podem ser usadas como um critério preliminar na distinção de espécies de tripanossomas, no entanto, similaridades nos requerimentos de cultivo não refletem necessariamente similaridades filogenéticas entre espécies.

A diferenciação em cultura de tripanossomas de anuros foi observada em estudo realizado com *T. fallisi* (Martin e Desser, 1991a). Após 24h de cultivo (ágar sangue com Meio Essencial Mínimo), a 20°C, as formas tripomastigotas do sangue transformam-se em epimastigotas que, com 48h de cultivo, dão origem às formas amastigotas e esferomastigotas que se dividem unidas em rosetas. Estas formas se diferenciam em epimastigotas que, por sua vez, se dividem por fissão binária ou transformam-se em formas epimastigotas distintas das anteriores. Nessas culturas também são observadas formas tripomastigotas metacíclicas que são as formas infectantes.

1.5.4 Zimodemas (padrões de isoenzimas)

A análise de isoenzimas tem sido bastante utilizada na caracterização de espécies do gênero *Trypanosoma*. Esta metodologia foi amplamente empregada em estudos de genética de populações e em inferências filogenéticas de *T. cruzi* e *T. brucei*, (Gibson *et al.*, 1980; Tibayrenc *et al.*, 1993; Tibayrenc 1995; Brisse *et al.*, 1998).

Perfis de zimodemas de tripanossomas de anuros foram comparados para avaliar a similaridade de isolados de regiões geográficas diferentes. Martin *et al.* (1992b) avaliaram a diversidade de tripanossomas isolados de espécimes de *Bufo americanus* capturados em duas regiões geográficas (Michigan e Ontário) revelando padrões similares e sugerindo que os isolados das duas regiões sejam da mesma espécie, *T. fallisi*. Em outro estudo, Martin *et al.* (1992a) demonstraram que isolados de hospedeiros de diferentes famílias (rãs e sapos), de regiões distintas (Ontário e Louisiana), apresentam padrões diferentes, com a separação geográfica, a especificidade pelo hospedeiro, além de diferenças morfológicas, consistentes com as diferenças observadas nos padrões de isoenzimas.

1.5.5 Métodos baseados em análises de ácidos nucleicos

1.5.5.1 Sequências do gene ribossômico

Os genes nucleares de rDNA dos tripanossomatídeos possuem uma estrutura complexa e característica, com um dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. A estrutura do DNA ribossômico (rDNA) compreende uma unidade de repetição composta por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e espaçadores intergênicos (IGS), que se repetem "*in tandem*" mais de 100 vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição, o pré-rRNA, que é sintetizado pela RNA polimerase I, seguido por diversas etapas de processamento originando 3 moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior). Nos tripanossomatídeos, a sequência da subunidade 24S é interrompida por um espaçador interno, gerando duas moléculas, 24S α e 24S β . As unidades de transcrição dos genes ribossômicos são

alternadas por uma região espaçadora, espaçador intergênico, que apresenta tamanho e sequência altamente variáveis. As regiões transcritas em regiões não conservadas do pré-rRNA são denominadas espaçadores transcritos, que são divididos em externos (ETS) e internos (ITS).

Os genes de rDNA têm se revelado adequados para inferências de relacionamentos filogenéticos porque estão distribuídos universalmente e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos (Sogin *et al.*, 1986). A presença de diversas regiões, transcritas ou não, que exibem diferentes graus de variabilidade, acarretam um alto grau de polimorfismo dos cistrons ribossômicos e, por este motivo, têm se revelado excelente como ferramenta na identificação e em estudos filogenéticos dos tripanossomatídeos. 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 de tripanossomatídeos possui oito regiões universalmente 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 (ver itens 3 e 4.4). Os espaçadores IGS e ITS são muito mais variáveis do que as regiões SSU e LSU, diferindo inter e intra-especificamente, sendo excelentes alvos para análises de organismos filogeneticamente muito próximos, assim como alvos para diagnóstico e como marcadores taxonômicos. Análises do ITS revelaram variabilidade inter e intraespecífica em *Leishmania* e *Endotrypanum* (Cupolillo *et al.*, 1995; 2000), linhagens de *T. cruzi* (Fernandes *et al.* 1999; Mendonça *et al.* 2002), *T. rangeli* (Maia da Silva *et al.*, 2004b), espécies de tripanossomas Africanos (Desquesnes *et al.* 2001), inclusive *T. vivax* (Cortez *et al.*, 2006), e tripanossomas do clado *T. theileri* (subgênero *Megatrypanum*) (Rodrigues *et al.* 2006).

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). Os nove isolados estudados formaram grupos não associados com a morfologia ou com a espécie do hospedeiro de origem. Espécies morfologicamente indistinguíveis, *T. fallisi* e *T. schmidtii*, se posicionaram em grupos separados. Por outro lado, *T. ranarum* (de Rana) e *T. fallisi* (de Bufo) foram agrupados. Essas duas espécies de tripanossomas são simpátricas e supostamente compartilham o vetor *D. picta*, contudo, não há infecção cruzada entre os hospedeiros vertebrados.

1.5.5.2 Sequências do gene "spliced leader"

Os genes "spliced leader" (SL), ou de mini-exon, participam de um mecanismo bastante peculiar de processamento pós-transcricional denominado "trans-splicing". O processamento de mRNA nos tripanossomatídeos através deste mecanismo resulta na adição, na extremidade 5' dos mRNAs maduros, da sequência de 39 nucleotídeos denominada "spliced leader" RNA (SLRNA) ou "mini-exon

derived RNA" (med-RNA) (Donelson e Zeng, 1990; Agabian, 1990; Tschudi e Ullu, 1990; Perry e Agabian, 1991). O mecanismo de "trans-splicing" também foi observado em outros protozoários, tais como *Euglena* sp e *Bodo* sp (Tessier *et al.*, 1991), sugerindo que a aquisição deste mecanismo de processamento de mRNA ocorreu antes da divergência da ordem Trypanosomatida. Assim, este gene é uma excelente ferramenta para estudos evolutivos. Enquanto todos os mRNAs dos tripanossomatídeos sofrem este processamento, apenas uma pequena parte dos mRNAs de outros eucariotos é processada desta forma.

O mecanismo de "cis-splicing" foi descrito nos genes de poly (A) polimerase ("PAP gene") de *T. brucei* e *T. cruzi*, que são interrompidos por introns (Mair *et al.*, 2000; Jager *et al.*, 2007). A maioria dos genes dos Kinetoplastida não apresenta introns e seus transcritos são geralmente RNAs longos e policistrônicos (transcrição contígua de vários genes) sendo, em geral, o mecanismo pós-transcricional de "trans-splicing" responsável pela maturação dos mRNAs unitários. A comparação de seqüências dos genes de mini-exon de diferentes espécies, dos diversos gêneros de tripanossomatídeos, revelou regiões com diferentes graus de conservação, que permite dividir este gene em três partes: um exon de 39 nucleotídeos altamente conservado; um intron que pode variar de 50 a 100 nt, moderadamente conservado; e uma região intergênica espaçadora que apresenta variações de tamanho e de seqüência entre as espécies de tripanossomatídeos. Algumas espécies de tripanossomatídeos apresentam o rRNA 5S, que é composto por seqüências altamente conservadas, inserido na região intergênica do gene SL (Gibson *et al.*, 2000). Além das regiões com diferentes graus de conservação, este gene está presente em cerca de 100-200 cópias que se repetem, "*in tandem*", no genoma dos tripanossomatídeos, o que o torna um excelente alvo para fins taxonômicos e diagnósticos.

O gene SL foi empregado no gênero *Trypanosoma* para diferenciar espécies, linhagens e isolados; (Fernandes *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2001; Maia da Silva *et al.*, 2007) Além dos tripanossomas, a utilização de seqüências dos genes SL como marcadores taxonômicos permitiu identificar gênero, grupos, espécies e cepas de *Crithidia* (Fernandes *et al.*, 1997), *Endotrypanum* (Fernandes *et al.*, 1993); *Leishmania* (Fernandes *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1998) e *Phytomonas* (Nunes *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1999b; Teixeira *et al.*, 2000; Dollet *et al.*, 2001). O estudo comparativo de seqüências do gene SL de 27 espécies de tripanossomas revelou que apenas as seqüências dos exons e introns de organismos bastante próximos filogeneticamente podem ser alinhadas com confiança (Gibson *et al.*, 2000), sendo úteis para inferir graus de relacionamentos genéticos entre espécies muito relacionadas, na análise de variabilidade genética e como alvo para diagnóstico.

O seqüenciamento dos genes SL de espécies de tripanossomas de anuros revelou que a unidade de repetição dos genes SL desses tripanossomas é a menor dentre todos os tripanossomas estudados, 280pb e 294pb para *T. mega* e *T. rotatorium*, respectivamente. Ambos os isolados

apresentaram similaridade de tamanho e de sequência mesmo no espaçador intergênico, diferindo apenas no tamanho do transcrito (Gibson *et al.*, 2000).

1.5.5.3 Padrões de RAPD, seqüências polimórficas de DNA amplificadas aleatoriamente (Random Amplification of Polymorphic DNA)

A técnica de RAPD consiste na amplificação, por PCR, de regiões aleatórias do genoma de um determinado organismo utilizando oligonucleotídeos com seqüências arbitrárias (8-10 nucleotídeos). Esta técnica, além de dispensar o conhecimento prévio de seqüências dos organismos estudados, analisa um grande número de loci simultaneamente e pode ser aplicado no estudo de um grande número de organismos (Welsh e McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

O método de RAPD tem sido amplamente utilizado no estudo de variabilidade genética entre tripanossomatídeos muito relacionados, permitindo identificar e analisar o polimorfismo inter e intraespecífico. A construção de dendrogramas, baseados nos padrões de fragmentos amplificados, tem sido empregada para inferir graus de relacionamento genético entre tripanossomatídeos muito próximos geneticamente, tais como: espécies de *Phytomonas* (Serrano *et al.*, 1999a); subespécies de *Leishmania* (Tibayrenc *et al.*, 1993; Noyes *et al.*, 1996); cepas de *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1993; Brisse *et al.*, 1998; 2000a,b; 2001); isolados de *T. rangeli* (Steindel *et al.*, 1994; Maia da Silva *et al.*, 2004b); espécies e subespécies de tripanossomas (Kanmogne *et al.*, 1996; Ventura *et al.*, 2001; Brisse *et al.*, 2000b; Rodrigues *et al.*, 2003). Esse método revelou 6 linhagens de *T. cruzi* (Brisse *et al.*, 2000a, b), contrariando estudos baseados nos genes SSU rDNA e de mini-exon, que apontavam para apenas 2-3 linhagens.

Lun e Desser (1996) utilizaram um total de vinte oligonucleotídeos para analisar padrões de RAPD de tripanossomas de anuros, incluindo 5 isolados de *T. fallisi*, 3 de *T. ranarum*, 2 de *T. rotatorium*, 2 de *T. rotatorium-like*, *T. chattoni* e *Trypanosoma* sp (isolado de *Rana sphenoccephala*). Os padrões revelaram uma alta similaridade entre isolados de mesma região geográfica e um grande polimorfismo entre isolados de regiões distantes, classificados morfológicamente como uma só espécie, sugerindo que a morfologia foi insuficiente para a identificação destes tripanossomas.

1.5.5.4 DNA do cinetoplasto – kDNA

Os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto. O kDNA consiste de moléculas dupla-fita circulares, cada organismo contendo de 5.000-10.000 minicírculos e 40-50 maxicírculos, concatenados em uma única rede. Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos, codificando as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial. Os minicírculos codificam as moléculas de RNAs-guias utilizadas na edição de transcritos de maxicírculos (Simpson, 1986; Stuart e Feagin, 1992).

Interespecificamente os minicírculos diferem em tamanho e sequência. Intraespecificamente, estas moléculas diferem na sequência, mas são, em geral, homogêneas em tamanho e hibridizam cruzadamente. Os padrões de digestão de kDNA por endonucleases (esquizodemas) são característicos de espécies, subespécies e cepas de tripanossomas.

Estudos realizados com *T. avium* (Yurchenko *et al.*, 1999) e com tripanossomas de peixes (Jirku *et al.*, 1995) revelaram minicírculos com tamanhos entre 4 e 10kb. Portanto, muito maiores que os de tripanossomas de mamíferos, que apresentam, em geral, entre 1,0 e 1,5 kb. Muito pouco se sabe sobre a estrutura e organização das moléculas de kDNA de tripanossomas de anuros. Os maxicírculos de *T. mega* foram identificados por microscopia eletrônica (moléculas liberadas por digestão do kDNA) como moléculas de 24 ou 26kb (Borst *et al.*, 1977). As moléculas de minicírculos de kDNA de *T. mega* possuem cerca de 2,3kb e apresentam grande heterogeneidade de sequência quando analisadas por padrão de restrição e cinética de reassociação (Simpson, 1986). Steinnert e Van Assel (1980), sugeriram que existam aproximadamente 70 classes de minicírculos, com diferentes sequências, em *T. mega*.

Estudos recentes têm sugerido uma correlação entre o tamanho das moléculas de minicírculos de kDNA e as proporções do cinetoplasto de forma que moléculas maiores estão dispostas gerando estruturas cilíndricas mais altas, porém, com menor diâmetro quando comparada com as estruturas geradas por moléculas pequenas (Simpson, 1972; Borst e Hoeijmakers, 1979; Borst *et al.*, 1985; Lukes e Votýpka, 2000).

Embora poucos sejam os trabalhos que descrevam a estrutura do kDNA de tripanossomas de anuros por microscopia eletrônica, é possível inferir que existe uma certa diversidade de tamanhos de minicírculos de kDNA nesses organismos e que estes aparentam ser maiores dos que os de tripanossomas de mamíferos (Creemers e Jadin, 1966; Martin e Desser, 1990; Steinert e Novikoff, 1960; Cortez *et al.*, 1972; Perez-Reyez *et al.*, 1976). Os estudos ultraestruturais revelaram diferenças na forma e tamanho do cinetoplasto de tripanossomas de anuros. Creemers e Jadin (1966), trabalhando com mais de uma população do complexo *T. rotatorium*, observaram um cinetoplasto bastante achatado, largo e denso nesses flagelados. Por outro lado, estudos com outras espécies, incluindo *T. fallisi* (Martin e Desser, 1990), *T. mega* (Steinert e Novikoff, 1960), *T. montezumae* (Cortez *et al.*, 1972) e *T. galba* (Perez-Reyez *et al.*, 1976) apresentaram cinetoplastos com altura maior do que a largura e arranjo das fibrilas de kDNA com aparência frouxa. Para essas quatro espécies, o tamanho do cinetoplasto parece ser espécie-específico. Porém, essa característica precisa ser investigada com um maior número de espécies antes de ser proposta como um parâmetro taxonômico para os tripanossomas de anuros.

1.5.5.5 Caracterização cromossômica – Cariotipagem

Como não ocorre condensação dos cromossomos nos tripanossomatídeos, estes não podem ser visualizados por técnicas citológicas convencionais. Nestes organismos, bandas cromossômicas, correspondentes a um ou mais cromossomos, são observadas após separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE), que permitem analisar as diferenças de tamanho e de número de cromossomos, assim como a localização cromossômica de genes. A análise do cariótipo tem sido empregada na identificação de espécies e subespécies de tripanossomas e leishmanias (Henriksson *et al.*, 1993; 1996; Pedroso *et al.*, 2007; Pedroso *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004).

Lun e Desser (1995) analisaram o cariótipo de 12 espécies de tripanossomas de anuros, revelando cromossomos de 0,45 a 2,2 Mpb, com padrões de PFGE distintos para espécies diferentes e padrões similares isolados de uma mesma região geográfica, morfologicamente identificados como uma mesma espécie. Esses dados concordaram com os obtidos por RAPD (Lun e Desser, 1996).

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Os tripanossomas de anfíbios constituem um dos grupos maiores e mais amplamente distribuídos, porém, está entre os menos estudados do gênero *Trypanosoma*. A maioria dos estudos sobre tripanossomas de anuros se restringe a descrições morfológicas. Embora os parâmetros taxonômicos tradicionais, morfologia e hospedeiro de origem, sejam insuficientes, são ainda adotados na classificação desses organismos. Pouco se conhece sobre variabilidade genética, posicionamento taxonômico e filogenia desses tripanossomas. Um aspecto muito peculiar e interessante desses tripanossomas é a transmissão de suas espécies por sanguessugas (vetores aquáticos) e insetos hematófagos de diversas famílias (moscas e mosquitos). Porém, isolados de possíveis sanguessugas e insetos vetores de tripanossomas de anuros nunca foram analisados por métodos moleculares.

Embora estes tripanossomas apresentem um grande número de espécies hospedeiras e, desta forma, sejam amplamente distribuídos no mundo, apenas 6 isolados, incluindo 4 da América do Norte (E.U.A. e Canadá), além de um isolado europeu e um isolado africano foram analisados em estudos filogenéticos. As seis espécies de tripanossomas de anuros analisadas se mostraram muito próximas filogeneticamente. Porém, diferentes análises filogenéticas geraram controvérsias sobre a monofilia desses tripanossomas e sobre o posicionamento desse grupo nas filogenias do gênero *Trypanosoma*. Informações mais confiáveis sobre a diversidade de tripanossomas de anuros e seu relacionamento com tripanossomas de outros hospedeiros necessitam da análise de um grande número de isolados, de diferentes regiões e espécies-hospedeiras, com a utilização de diversos métodos de análise de polimorfismo e filogenia, baseados em genes e seqüências distintas. Não existem informações sobre a diversidade, morfológica e molecular, relacionamentos genéticos e filogenia de tripanossomas de anuros sul-americanos, onde se concentra grande parte da diversidade desses hospedeiros.

Portanto, considerando que não existem estudos sobre tripanossomas de anuros brasileiros e que a diversidade genética, filogenia e taxonomia dos tripanossomas de anuros em geral são aspectos ainda pouco explorados e bastante controversos, são nossos principais objetivos:

1. Detectar e isolar em cultura tripanossomas de anuros e de flebotomíneos (possíveis vetores) brasileiros;
2. Comparar algumas características biológicas desses tripanossomas:
 - a) Morfologia - formas do sangue e de cultura;
 - b) Comportamento em cultura - cultivo e diferenciação celular;
3. Avaliar o polimorfismo genético desses tripanossomas analisando o polimorfismo de tamanho e de padrões de restrição do gene ITS rDNA, amplificado por PCR e digerido com enzimas de restrição;
4. Determinar graus de relacionamento genético e inferir relações filogenéticas entre tripanossomas de anuros brasileiros, entre esses e isolados de anuros de outras regiões do mundo, e

entre espécies de tripanossomas de anuros e de outros hospedeiros, com base em seqüências dos genes SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina;

5. Comparar os dados obtidos com a análise de polimorfismo e as inferências filogenéticas com as análises dos isolados com parâmetros taxonômicos tradicionais (morfologia, origem geográfica e hospedeiro de origem).

6. 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 e dos possíveis vetores desses tripanossomas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de captura dos anuros

A coleta de anuros foi realizada entre 2000 e 2005 em áreas constituídas por três ecossistemas Brasileiros distintos: Amazônia (região norte, Estado de Rondônia, Cidade de Monte Negro), Mata Atlântica (região sudoeste, São Paulo, São Paulo, Guarulhos e Biritiba Mirim), Pantanal (região central, Mato Grosso do Sul, Miranda) e no Guaporé (MG) que representa uma região de transição entre Cerrado e Mata Amazônica. Quatro espécimens de anuros do Cerrado, coletados pelo Prof. Dr. Carlos Jared, também foram analisados. As coletas em Moçambique foram realizadas no sul (Sul da província de Maputo) e no centro do país (Leste da província de Sofala), em 2006, com a colaboração do professor Dr. Luís Neves.

3.2 Captura e identificação dos anuros

Além da busca visual, foram empregadas armadilhas de interceptação e queda ("pit fall traps"). Cada armadilha consiste de quatro baldes plásticos (30L), enterrados no solo, três dispostos como se fossem vértices de um triângulo equilátero e o quarto colocado no centro do triângulo. Faixas de lonas plástica de 5,0 X 0,5m ligando os baldes periféricos ao balde central foram fixadas por estacas de madeira. As armadilhas foram vistoriadas diariamente e os animais capturados foram transportados em sacos plásticos.

Espécies ameaçadas de extinção não foram coletadas. Os animais coletados foram identificados e depositados nas coleções zoológicas do Museu de Zoologia da USP. Os anuros foram integralmente preservados em via líquida (Heyer *et al.*, 1994). Cada espécime capturado teve registrado o dia, condições climáticas, local exato da coleta e o número de identificação. Todos foram vistoriados à procura de ectoparasitas. Para a captura e identificação dos anuros contamos com a colaboração do Dr. Miguel. T. Rodrigues (Departamento de Zoologia, IB, USP) e Dra Sandra E. Favorito (UNIBAM).

3.3 Isolamento de tripanossomas

3.3.1 Isolamento de tripanossomas de anuros

Amostras de sangue coletadas por punção cardíaca de anuros, com assepsia prévia dos animais com álcool-iodado e sedados com anestésico, foram inoculadas em tubos com meio bifásico constituído por fase sólida BAB (blood agar base com 15% de sangue de coelho) e fase líquida de meio LIT ou Grace (contendo 15% de soro fetal bovino, 0,8mg/mL de gentamicina e 5mg/mL de ampicilina).

3.3.2 Obtenção de tripanossomas de flebotomíneos

Isolados de flebotomíneos oriundos de dois Estados da região amazônica (Rondônia e Pará) foram cedidos pelos professores Drs. Jeffrey Jon Shaw e Toby Vincent Barrett. Isolados que apresentaram formas epimastigotas em cultura, portanto, morfologia compatível com o gênero *Trypanosoma*, foram caracterizados (Tabela 2).

Tabela 2. Tripanossomatídeos de flebotomíneos utilizados neste estudo.

TryCC ^a	Organismo		Hospedeiro de origem		Bioma	Origem Geográfica
	Gênero	família	espécie			
102	<i>Endotrypanum</i>	Psychodidae	<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	Amazônia		BR/RO
889	<i>Endotrypanum</i>	Psychodidae	<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	Amazônia		BR/RO
890	<i>Endotrypanum</i>	Psychodidae	<i>Lutzomyia gomezi</i>	Amazônia		BR/RO
101	<i>Trypanosoma</i>	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	Amazônia		BR/RO
103	<i>Trypanosoma</i>	Psychodidae	<i>Evandromyia infraspina</i>	Amazônia		BR/RO
120	<i>Trypanosoma</i>	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	Amazônia		BR/RO
887	<i>Trypanosoma</i>	Psychodidae	<i>Sciopemyia</i> sp	Amazônia		BR/RO
888	<i>Trypanosoma</i>	Psychodidae	<i>Sciopemyia servulolimae</i>	Amazônia		BR/RO
1155	<i>Trypanosoma</i>	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	Amazônia		BR/PA

3.4 Condições de cultivo e manutenção dos tripanossomas

Os tripanossomas que utilizamos neste estudo são mantidos criopreservados na coleção de tripanossomatídeos (TCC: Trypanosomatidae Culture Collection) do Departamento de Parasitologia/ICB/USP. Dispomos de 84 isolados de tripanossomas de anuros brasileiros. Para comparação, incluímos nas análises *T. mega* (isolado de sapo africano), adquirido do ATCC. Os isolados são mantidos congelados em N₂ líquido (Em meio LIT com 10% de SFB acrescido de 20% de DMSO) e cultivados a 25°C em meio bifásico: BAB com 15% de hemácias de coelho e LIT (Camargo, 1964) contendo 10% de SFB. Os organismos utilizados neste estudo e seus respectivos hospedeiros de origem e local de coleta estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3. Tripanossomas de anuros utilizados neste estudo.

Organismo	Hospedeiro de origem		Origem Geográfica	Bioma
	TryCC ^a	família		
Tripanosomas Sul Americanos				
282	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
287	Hylidae	<i>Bokermannohyla circumdata</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
288	Hylidae	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
290	Hylidae	<i>Hypsiboas prasinus</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
291	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
304	Hylidae	<i>Hypsiboas punctatus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
305	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
306	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
311	Bufonidae	<i>Chaunus schneideri</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
313	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
315	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
316	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
317	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
321	Hylidae	<i>Scinax acuminatus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
322	Bufonidae	<i>Chaunus schneideri</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
324	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
325	Bufonidae	<i>Chaunus schneideri</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal

Tabela 3. Continuação.

326	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
327	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
334	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
339	Bufonidae	<i>Chaunus marinus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
346	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
357	Hylidae	<i>Osteocephalus</i> sp	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
358	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i> sp	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
362	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
364	Bufonidae	<i>Chaunus marinus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
365	Leptodactylidae	N.D.	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
367	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
398	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
399	Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
400	Hylidae	<i>Phyllomedusa</i> sp	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
401	Leiuperidae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
402	Leiuperidae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
405	Leiuperidae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
406	Hylidae	<i>Scinax ruber</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
407	Leiuperidae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
408	Leiuperidae	<i>Engystomops petersi</i>	BR/RO/Monte Negro	Amazônia
436	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
439	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
440	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
441	Bufonidae	<i>Chaunus schneideri</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
442	Hylidae	<i>Scinax acuminatus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
443	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
444	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
445	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
446	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
447	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
448	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
449	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
457	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
465	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
467	Hylidae	<i>Hypsiboas raniceps</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
492	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
598	Bufonidae	<i>Chaunus schneideri</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
612	Hylidae	<i>Hypsiboas geographicus</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
613	Hylidae	<i>Hypsiboas raniceps</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
614	Hylidae	<i>Osteocephalus taurinus</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
615	Hylidae	<i>Hypsiboas boans</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
616	Hylidae	<i>Hypsiboas boans</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
617	Hylidae	<i>Hypsiboas boans</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
618	Hylidae	<i>Hypsiboas raniceps</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
619	Hylidae	<i>Hypsiboas raniceps</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
620	Hylidae	<i>Trachycephalus venulosus</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
622	Hylidae	<i>Hypsiboas raniceps</i>	BR/MT/Pontes de Lacerda	Guaporé
641	Hylidae	<i>Hypsiboas faber</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
644	Hylidae	<i>Itapotihyla langsdorffii</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
645	Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
646	Hylidae	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
647	Hylidae	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
653	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
660	Hylidae	<i>Scinax hayii</i>	BR/SP/Biritiba Mirim	Floresta Atlântica
858	Bufonidae	<i>Chaunus ictericus</i>	BR/SP/Guarulhos	Floresta Atlântica
868	Bufonidae	<i>Chaunus ictericus</i>	BR/SP/Guarulhos	Floresta Atlântica
920	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/SP/Rio Claro	Cerrado
928	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	BR/SP/Rio Claro	Cerrado
932	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
933	Hylidae	<i>Bokermannohyla circumdata</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
934	Hylidae	<i>Hypsiboas prasinus</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
939	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
944	Hylidae	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
950	Hylidae	<i>Hypsiboas faber</i>	BR/SP/São Paulo	Floresta Atlântica
966	Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	BR/MS/Miranda	Pantanal
Tripanosomas Africanos				
1276	Bufonidae	<i>Amietophrynus garmani</i>		
1277	Bufonidae	<i>Amietophrynus garmani</i>		
1278	Bufonidae	<i>Amietophrynus garmani</i>		
1280	Bufonidae	<i>Amietophrynus garmani</i>		
1306	Bufonidae	<i>Amietophrynus garmani</i>		
1307	Ptychadenidae	<i>Ptychadena mossambica</i>		
1309	Bufonidae	<i>Amietophrynus garmani</i>		
Espécie Referência				
<i>T. mega</i>	Bufonidae	<i>Bufo regularis</i>	ATCC 30038/África	

3.5 Caracterização morfológica

Para o estudo morfológico de microscopia de luz dos isolados foram preparados esfregaços em lâminas, que foram fixados com metanol e corados com Giemsa (meia gota por mL de água não tamponada) por 45 minutos.

3.6 Extração de DNA dos parasitas

O método utilizado para a extração de DNA foi o de Osaki e Czeto (1984).

3.7 Reações de amplificação - PCR

Oligonucleotídeos utilizados. Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da subunidade menor dos genes ribossômicos foram KRD5 e KRD3 (Clark *et al.*, 1995) e 609F e 706R (Maia da Silva *et al.*, 2004a; Rodrigues, *et al.*, 2006). As regiões ITS1/5.8S/ITS2 e ITS1 foram amplificadas com os oligonucleotídeos IR1, IR2 e 5.8R (Cupolillo *et al.*, 1995; Maia da Silva *et al.*, 2004a). Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de amplificação dos genes de GAPDH (versão glicolítica) foram o GAP-TryF (GGN.CGC.ATG.GTS.TTY.CAG.G) e GAP-TryR (CCC.CAC.TCG.TTR.TCR.TAC.C). O gene de Alfa tubulina foi amplificado com os oligonucleotídeos Alfa1F (TGC.ATY.CAC.ATY.GGY.CAG.GC) e Alfa2R (CTG.RAT.YGT.SCG.CTT.CGT.C).

Reações de amplificação e eletroforese em gel de agarose. Nas reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação: 200mM de dNTP; 100ng de cada oligonucleotídeo; 100ng de DNA genômico; 5µl de tampão (200mM de Tris-HCl, pH 8.4; 500mM de KCl e 1,5mM de MgCl₂); 2,5u de *Taq* DNA Polimerase e água bidestilada deionizada e autoclavada (qsp 50ul). Foram empregados 30 ciclos de amplificação para todas as reações. As temperaturas de anelamento empregadas foram 55°C para a SSUrDNA, 48°C para a região V7-U4-V8 rDNA e 60°C para os genes codificantes. De 2 a 5µl do produto da reação foram aplicados em gel de agarose 2% com tampão TAE 2x, utilizando-se o marcador de peso molecular 1Kb, corados com brometo de etídeo e fotografados sob luz U.V.

3.8 Digestão de DNA com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose (RFLP)

Cerca de 900ng de DNA amplificado por PCR (ITS) foram incubados por 16 horas, a 37°C, com enzimas de restrição (*Hinf* I e *Rsa* I). Ao DNA digerido foram acrescentados 2,5µl de tampão de amostra e estas foram aplicadas em gel de agarose a 2% com tampão TAE 2x. Como marcador molecular foi utilizado 1Kb. As amostras separadas por eletroforese foram coradas com brometo de etídeo e fotografadas em luz U.V.

3.9 Purificação, clonagem e seqüenciamento dos fragmentos amplificados por PCR

A purificação dos fragmentos amplificados por PCR dos isolados de anuros foi realizada por meio de uso do kit “Spin-X” (Costar) segundo instruções do fabricante. A clonagem foi feita utilizando o kit “pMOS Blue” (Amersham) seguindo as instruções do fabricante. O seqüenciamento foi obtido em seqüenciador automático “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” utilizando o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing” (Perking Elmer).

3.10 Alinhamento das seqüências obtidas e inferências filogenéticas

As seqüências obtidas por PCR da gGAPDH, de Alfa Tubulina e da SSUrDNA foram submetidas a alinhamentos múltiplos pelo programa NCBI Blast Search (Altschul *et al.*, 1997) com seqüências de DNA disponíveis no GenBank. Para obter alguns dos alinhamentos das seqüências utilizamos o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de “Gaps” (Peso de inserção = 1, Extensão = 1).

Para as inferências filogenéticas foram utilizados como critérios de otimização máxima parcimônia e a análise bayeseana. As análises por máxima parcimônia foram executadas no programas PAUP* v.4b10 (Swofford, 1998) e POY v. 3.0.11a (Wheeler *et al.*, 2003). Em ambos os programas foram executadas 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS-TBR Branch-breaking”). No programa POY os diagramas obtidos foram ainda submetidos a refinamento posterior (“TBR Branch-breaking”) com as opções “exact” e “iterativepass” (Wheeler, 2003). No programa PAUP* os “gaps” foram tratados como quinto estado e os ramos obtidos nas análises que apresentaram comprimento mínimo igual a zero foram colapsados a politomias. As análises de “suporte de ramos” foram executadas no programa PAUP* (100 replicatas incluindo apenas caracteres informativos) utilizando os métodos de Bootstrap, seguindo a estratégia de busca descrita acima com apenas 10 “RAS-TBR”.

As análises bayeseanas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Foram empregadas 100 replicatas usando como modelo de substituição GTR com 4 categorias de gama e proporção de sítios invariantes. Para a construção do consenso de maioria foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 75 replicatas. Para a verificação de “suporte de ramos” nas análises bayeseanas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com o programa MrBayes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Relacionamento filogenético, diversidade morfológica e molecular de tripanossomas de anuros dos biomas brasileiros, Amazônia, Floresta Atlântica e Pantanal.

Anexo 1. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil.

A presença de tripanossomas foi examinada no sangue de 259 anuros (pertencentes a 47 espécies de oito famílias), a maioria da Amazônia brasileira, Mata Atlântica e Pantanal. Tripanossomas foram detectados pela combinação dos métodos de microhematócrito e hemocultura em 45% dos anuros e 87 culturas foram obtidas: 44 de Hylidae, 22 de Leptodactylidae, 15 de Bufonidae, 5 de Leuperidae e 1 de uma de anuro não identificado. Grande diversidade morfológica (11 morfotipos) foi observada entre os tripanossomas sanguíneos de anuros de diferentes espécies, de uma mesma espécie, assim como entre tripanossomas de um mesmo indivíduo. Por outro lado, tripanossomas morfológicamente similares foram encontrados em anuros de espécies e de biomas distintos. O polimorfismo de moléculas de ITS e de SSU rDNA revelou grande diversidade entre os 82 isolados examinados. Foram diferenciados 29 genótipos, a maioria distribuída em 11 grupos. O relacionamento filogenético baseado em seqüências de rDNA indicaram que os isolados de anuros são mais proximamente relacionados quando isolados de hospedeiros mais relacionados filogeneticamente. A comparação entre anuros do Brasil e outros países revelou várias espécies novas entre os isolados examinados neste estudo. O relacionamento filogenético sugere que a restrição aos hospedeiros, a troca de hospedeiro e a estrutura ecogeográfica devem ter desempenhado um importante papel na evolução de tripanossomas de anuros.

4.2 Uma nova linhagem monofilética de tripanossomas de anuros (Bufonidae e Leptodactylidae) e flebotomíneos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) da Amazônia brasileira.

Anexo 2: A new lineage of closely related trypanosomes of anurans (Bufonidae and Leptodactylidae) and sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Brazilian Amazonia.

A análise do relacionamento filogenético entre tripanossomas de vários hospedeiros vertebrados e invertebrados revelou uma nova linhagem de tripanossomas circulando entre anuros e flebotomíneos da Amazônia brasileira. A relação desse grupo de tripanossomas muito proximamente relacionados com outros tripanossomas de anuros e de outros hospedeiros e com outros gêneros de tripanossomatídeos que infectam flebotomíneos foi determinado por comparação de seqüências do gene completo da SSUrDNA. Diagramas obtidos por parcimônia e análise bayesiana suportaram a monofilia dos tripanossomas de anuros e revelaram quatro clados ou linhagens (An01 a 4) no clado principal de tripanossomas de anuros. O clado An04 foi composto por tripanossomas de anuros exóticos, enquanto os isolados brasileiros foram distribuídos em três clados: a) clado An01, constituído principalmente por isolados de hilídeos; b) clado An02, constituído principalmente por isolados de bufonídeos e c) clado An03, contendo apenas tripanossomas isolados da Amazônia. Isolados dos clados An01 e An02 são de tripanossomas de anuros capturados nos três biomas estudados, enquanto o clado An03 é composto por três isolados de bufonídeos, um de leptodactilídeo, um de leiuperídeo e seis isolados de flebotomíneos. Esse clado é uma nova linhagem filogenética de tripanossomas de anuros e flebotomíneos que compartilham o mesmo ecótopo. Este é o primeiro estudo de caracterização morfológica e molecular de tripanossomas de flebotomíneos que são incriminados como hospedeiros invertebrados e, provavelmente, também como vetores de tripanossomas de anuros terrestres da Amazônia brasileira.

4.3 Filogenia de tripanossomas de anuros sul americanos e africanos baseada na análise de três loci gênicos.

4.3.1 Introdução

Tripanossomas de anuros são hemoparasitas encontrados em todas as regiões não polares do planeta e ocorrem em espécies representativas de toda a classe Anura (Bardsley e Harmsen, 1973). Grande diversidade morfológica e genética é encontrada entre esses parasitas que, em geral, são mais polimórficos e mais complexos do que os tripanossomas de mamíferos (Bardsley e Harmsen, 1973; Ferreira *et al.*, 2007a; b). A morfologia como parâmetro taxonômico para esse grupo é muito pouco confiável, tendo em vista que não são conhecidas as formas de desenvolvimento de diferentes espécies nem, tampouco, formas de uma mesma espécie presentes no sangue de seus hospedeiros. Portanto, não se pode fazer nenhuma correlação entre a morfologia e a taxonomia e filogenia de tripanossomas de anuros (Ferreira *et al.*, 2007a). Estudos baseados apenas em análises morfológicas têm sugerido que tripanossomas de anuros não apresentam restrição aos seus hospedeiros vertebrados, já que anuros de diferentes espécies, e até mesmo de famílias distintas, têm sido encontrados albergando parasitas muito similares. Entretanto, infecções cruzadas experimentais têm sugerido uma significativa restrição dos tripanossomas às espécies de anuros mais filogeneticamente relacionadas (Martin *et al.*, 1992b).

Apesar da grande prevalência e da diversidade de hospedeiros descrita para tripanossomas de anuros em todo o mundo, são raros os isolados disponíveis em cultura e as seqüências depositadas em bancos. Trabalhos a respeito de tripanossomas de anuros são ainda bastante limitados quanto ao número de isolados e de genes analisados. Até recentemente, quando analisamos um grande número de isolados brasileiros (Ferreira *et al.*, 2007a), apenas 7 tripanossomas de anuros tinham seqüências depositadas no GenBank: Um isolado da Europa (Iugoslávia), 5 da América do Norte (USA e Canadá) e apenas um da África (Congo).

Embora alguns tripanossomas de anuros sejam freqüentemente incluídos em análises filogenéticas do gênero *Trypanosoma* (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; 2005; 2007; Gibson *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2006), poucos são os trabalhos cujo enfoque seja especificamente esse grupo de parasitas (Martin *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2007a, b). Todos os trabalhos posicionam os isolados de anuros no clado “Aquático” e sugerem a existência de dois grandes grupos nesse clado: um constituído por tripanossomas cujos vetores são sanguessugas e que compreende isolados de peixes de água doce e salgada, de sanguessuga aquática (*T. sp* K&A), de ornitorrinco (*T. binneyi*) e de tartaruga (*T. chelodina*). Estes dados indicam uma associação, neste grupo, com sanguessugas,

apoiando a hipótese de evolução destes tripanossomas com seus vetores aquáticos. O outro grupo é constituído por todos os isolados de anuros e um isolado de camaleão (*T. therezieni*) (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; 2005; 2007; Gibson *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007a). Esse segundo grupo compreende isolados de hospedeiros que vivem nos dois ambientes, aquático e terrestre, e não existem evidências filogenéticas sobre os vetores desses tripanossomas. O posicionamento do clado “Aquático” nas inferências filogenéticas é controverso. Alguns trabalhos sugerem que este seja o grupo irmão dos demais tripanossomas (Stevens *et al.*, 1999; 2001; Stevens e Gibson, 1999; Hamilton *et al.*, 2004; 2007) e outros que seja uma irradiação interna do gênero (Haag *et al.*, 1998). Outros trabalhos sugerem a parafilia do clado Aquático, com tripanossomas de anuros segregando na base do gênero *Trypanosoma* (Hamilton *et al.*, 2004; Hughes e Piontkivska, 2003a;b).

A monofilia dos tripanossomas de anuros também não é consenso nos estudos realizados. Martin *et al.* (2002) analisaram o posicionamento filogenético de 5 tripanossomas de anuros: isolados de ranídeos, *T. rotatorium*, *T. ranarum*, *T. neveulemairei* e *T. chattoni* e de bufonídeos, *T. fallisi* e *T. mega*. Esses tripanossomas agruparam com *T. mega* e *T. rotatorium*, cujo posicionamento já era conhecido (Haag *et al.*, 1998, Stevens *et al.* 2001) agrupando todos os isolados de anuros, exceto *T. chattoni*, isolado de *Rana pipiens*, que agrupou com isolados de peixes (Martin *et al.*, 2002). O estudo de Gibson *et al.* (2005) corroborou os dois principais grupos internos do clado “Aquático” e confirmou a monofilia dos isolados de anuros, posicionando *T. chattoni* mais próximo aos demais isolados de anuros, embora em um ramo distante, do que dos isolados de peixes. A posição instável de *T. chattoni* nas topologias já publicadas, agrupando com tripanossomas de peixes ou de anuros, indica que essa espécie é bastante distinta das demais e que esse parasita possa ser membro de uma linhagem diferente.

A transmissão de tripanossomas por sanguessugas deve ser uma característica comum de todos os tripanossomas de peixes, assim como parece ser importante para as espécies mais aquáticas de anuros. Entretanto, existem inúmeras evidências que sugerem que sanguessugas e insetos podem transmitir tripanossomas entre anuros, inclusive a mesma espécie de tripanossoma (Molineux, 1977). Dentre os isolados de anuros, a transmissão por sanguessugas foi experimentalmente demonstrada apenas para *T. fallisi* e *T. rotatorium*. Contudo, não há evidências de que o isolado de *T. rotatorium* infectante para sanguessugas corresponda aos isolados utilizados nas análises filogenéticas, uma vez que diversos isolados são classificados no complexo *T. rotatorium* apenas com base em morfologia (Martin *et al.* 2002). Alguns trabalhos sugerem que insetos hematófagos dos gêneros *Culex* (Desser *et al.*, 1973; 1975), *Aedes* (Bailey, 1962; Ramos e Urdaneta-Morales, 1977), *Lutzomyia* (Anderson e Ayala 1968; Ayala e McKay, 1971; Ferreira *et al.*, 2007b) e *Corethrella* (Johnson *et al.*, 1993) estão envolvidos na transmissão de tripanossomas de anuros. O conjunto de dados obtido até o momento sugere que os tripanossomas de anuros não evoluíram estritamente com seus hospedeiros vertebrados e

invertebrados, e que um fator importante na evolução desse grupo tenha sido a troca de tripanossomas entre hospedeiros que compartilham o mesmo ambiente e os mesmos vetores (Ferreira *et al.*, 2007b). As topologias propostas (Martin *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007) sugerem que a evolução de tripanossomas de anuros apresentou eventos de troca de hospedeiros, tanto entre espécies quanto entre famílias de anuros. Esses dados reforçam evidências de que uma mesma espécie de anuro pode ser infectada por tripanossomas distantemente relacionados, por exemplo, *Rana pipiens* pode ser infectada por *T. chattoni* e por *T. ranarum*, espécies posicionadas em grupos distintos nas árvores filogenéticas.

Em um trabalho anterior observamos uma alta taxa de infecção por tripanossomas em anuros brasileiros e demonstramos que a diversidade morfológica desses tripanossomas é acompanhada de uma grande diversidade genética (analisada por polimorfismos de tamanho, restrição e seqüência de ITSrDNA). Inferências filogenéticas de 11 isolados brasileiros baseadas em seqüências de ITS1 e da região V7-U4-V8 da SSUrDNA revelaram a existência de três grupos de tripanossomas de anuros brasileiros (An01, An02 e An03) distantemente relacionados dos tripanossomas de anuros de outros continentes (An04). Esses agrupamentos apresentaram certa correlação com as famílias dos hospedeiros vertebrados e com a origem geográfica (Ferreira *et al.*, 2007a). Mostramos recentemente uma associação entre tripanossomas de anuros e de flebotomíneos, posicionados no clado An03, sugerindo a existência de uma linhagem de tripanossomas de anuros transmitida por esses insetos e que a associação de linhagens com vetores e hospedeiros vertebrados parece ser dependente de ecótopos compartilhados (Ferreira *et al.*, 2007b).

Portanto, o estudo da diversidade e das relações filogenéticas entre tripanossomas de anuros ainda é bastante fragmentado, assim como a relação desses parasitas com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Estudos filogenéticos mais abrangentes, com a inclusão de um maior número de espécies de diferentes regiões geográficas e ecótopos, analisados com um maior número de marcadores moleculares, são fundamentais para uma melhor compreensão da história evolutiva desse grupo de tripanossomas. Neste estudo, comparamos seqüências de três loci gênicos de isolados de diversas espécies de anuros das famílias Bufonidae, Leiuperidae, Leptodactylidae e Hylidae de distantes regiões geográficas do Brasil e de bufonídeos (*Amietophrynus garmani*) e um ptycadenídeo (*Ptychadena mossambica*) de Moçambique (África) a fim de investigar: a) a diversidade genética e o posicionamento filogenético de tripanossomas de anuros brasileiros e moçambicanos; c) as associações das linhagens de tripanossomas de anuros com padrões filogeográficos e ecogeográficos de seus hospedeiros vertebrados e possíveis vetores.

4.3.2 Materiais e Métodos

4.3.2.1 Locais de coleta e isolamento de tripanossomas de anuros

Anuros brasileiros foram capturados entre 2000 e 2005 como descrito em Ferreira *et al.*, (2007a; b). Os isolados Africanos foram obtidos de anuros capturados em Moçambique (Sul da província de Maputo) e no centro do país (Leste da província de Sofala), em 2006, com a colaboração do professor Dr. Luís Neves. O isolamento, meios e condições de cultura utilizados estão descritos em Ferreira *et al.* (2007a; b).

4.3.2.2 Amplificação, por PCR, dos genes ITS1/5.8S/ITS2 rDNA, SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina

O DNA genômico foi extraído pelo método clássico de fenol-clorofórmio. Os oligonucleotídeos e reações de PCR para amplificação da região ITSrDNA e V7-U4-V8 SSUrDNA foram descritos por Maia da Silva *et al.* (2004) e Rodrigues *et al.* (2006). O tamanho do ITS rDNA foi analisado em gel de agarose 2%. As seqüência dos genes gGAPDH e a Alfa Tubulina foram amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos GAPTryF(GGN.CGC.ATG.GTS.TTY.CAG.G)-GAPTryR(CCC.CAC.TCG.TTR.TCR.TAC.C) e AlfaTF(TGC.ATY.CAC.ATY.GGY.CAG.GC)-AlfaTR(CTG.RAT.YGT.SCG.CTT.CGT.C), respectivamente. Para a amplificação por PCR de ambos os genes foi utilizada a mesma mistura de reação empregada para a amplificação da região V7-U4-V8 com adição de 5% do volume final de DMSO. A temperatura e o tempo de extensão utilizados foram 60°C e 1minuto, respectivamente.

4.3.2.3 Seqüenciamento e inferências filogenéticas

A purificação dos fragmentos amplificados por PCR dos isolados de anuros foi realizada por meio de uso do kit “Spin-X” (Costar) segundo instruções do fabricante. A clonagem foi feita utilizando o kit “pMOS Blue” (Amersham) seguindo as instruções do fabricante. O seqüenciamento foi obtido em seqüenciador automático “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” utilizando o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing” (Perking Elmer).

O conjunto de dados (seqüências dos três genes) foi analisado via Otimização Direta (Parcimônia) e análise bayeseana. Os três genes também foram analisados separadamente apenas por parcimônia (DNA e Proteína no caso dos genes codificadores), para fins de comparação, nos programas POY 3.0.11a (Wheeler *et al.*, 2003) e PAUP* (Swofford, 1998).

A estratégia de busca foi dividida em três etapas: 1) Adição aleatória dos terminais (100 replicatas) seguida de troca de ramos (“RAS-TBR Branch-breaking”); 2) refinamento adicional dos

diagramas obtido através de 50 ciclos de troca de ramos pelo algoritmo de Ratchet-TBR (Nixon, 1999). 3) refinamento final dos diagramas obtidos na etapa anterior por TBR com a opção “Iterativepass” (Wheeler, 2003). Em todas as buscas empregamos igual custo para indels, transições e transversões (1:1:1) e não excluimos regiões altamente variáveis.

As seqüências da SSUrDNA, que possuem variação de tamanho, foram divididas em partes menores com o intuito de diminuir o tempo das análises (Wheeler, 2003). As seqüências do fragmento V7-U4-V8 do gene SSUrDNA foi dividida em 4 partes, todas flanqueadas por regiões altamente conservadas. Para a verificação de suporte de ramos (Bootstrap), utilizamos o alinhamento exportado ao final das análises. Para isto, no programa PAUP* empregamos 100 replicatas de RAS-TBR empregando apenas sítios informativos.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) utilizando o alinhamento dos três genes exportado pelo POY ao final das análises por parcimônia. Tentativas de executar análises por máxima verossimilhança no POY, mesmo com parâmetros menos rigorosos (utilização de modelos menos complexos, retenção de poucas árvores por replicata, número reduzido de replicatas e fixação de parâmetros no início da busca) foram computacionalmente inviáveis. Foram empregadas 100 replicatas usando como modelo de substituição GTR com 4 categorias de gama e proporção de sítios invariantes. Uma vez que utilizamos genes diferentes, optamos por separar o conjunto de dados em partições, uma para cada gene, e para os genes codificadores, uma para a primeira e segunda posições dos códons e outra para a terceira posição. Cada partição utilizou seu próprio conjunto de parâmetros. Para a construção do consenso de maioria 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.

Como grupo externo das análises de evidência total escolhemos tripanossomas representantes de vários grupos (*T. cruzi* CL, *T. microti* TRL132, *T. cyclops*, *T. theileri* K127, *T. grayi* BAN 1, *T. avium* Chaffinch, *T. sp* AAT e *T. brucei* rhodesiense) e um tripanossomatídeo de outro gênero: *Leishmania tarentolae* cujos números de acesso estão disponíveis em Hamilton *et al.* (2007) e Jackson *et al.* (2006). O critério de escolha foi baseado na disponibilidade, para o mesmo isolado, de pelo menos dois dos genes utilizados nas análises em bancos públicos de seqüências. No grupo “Aquático” incluímos todas as espécies de tripanossomas de anuros com seqüências disponíveis (Martin *et al.* 2002) e representantes de todos os grupos de tripanossomas de peixes (Gibson *et al.* 2005). Do grupo “Aquático” foram incluídos todos os tripanossomas, mesmo os que possuem apenas seqüência de SSUrDNA disponível. Os genes não disponíveis foram codificados como “missing entries”.

As análises realizadas com as seqüências separadas incluíram como grupo externo ao clado “Aquático” apenas *T. grayi* para evitar artefatos filogenéticos devidos à inclusão de taxa muito distantes.

Nas análises de evidência total, com seqüências de gGAPDH e Alfa Tubulina, incluímos no grupo interno apenas terminais que representam genótipos distintos previamente determinados (Ferreira, et al 2007a; b). Na análise da região V7-U4-V8 da SSUrDNA incluímos mais de um representante de cada genótipo quando estes ofereciam informações importantes a respeito da região de coleta ou hospedeiro vertebrado de origem.

4.3.3 Resultados e Discussão

4.3.3.1 Diversidade genética de tripanossomas de anuros Africanos avaliada por polimorfismo de tamanho de ITSrDNA

A análise de polimorfismo de tamanho de ITSrDNA revelou grande diversidade genética entre os isolados de tripanossomas de anuros africanos, apesar do pequeno número de isolados e de espécies de anuros analisados. Os animais foram coletados nas regiões central e sul de Moçambique, separadas por uma grande distância geográfica. Entre os sete isolados obtidos, 6 do bufonídeo *Amietophrynus garmani* e um do pticadenídeo *Ptychadena mossambica*, foram detectados quatro genótipos. Os tamanhos dos fragmentos correspondentes ao gene ITSrDNA variaram de ~890pb a ~1500pb. Observamos uma significativa variabilidade entre os isolados de *A. garmani*. Embora 4 isolados dessa espécie (1276, 1277, 1278 e 1309) tenha apresentado o mesmo tamanho de ITS os outros 2 isolados (1280 e 1360) apresentaram padrões distintos, sendo o padrão do isolado 1280 o mais diferente de todos os isolados. O isolado 1306 apresentou um tamanho de ITS bastante próximo do apresentado pelo *T. mega*. Para comparação, incluímos no gel o fragmento de DNA correspondente ao ITS de *T. mega*, antigo isolado africano do bufonídeo "*Bufo regularis*", que era o único isolado africano disponível em cultura e caracterizado até este trabalho. O isolado 1307 de pticadenídeo, o único isolado africano que não é de bufonídeo, apresentou um tamanho diferente de todos os demais isolados (Figura 1).

Figura 1. Análise de polimorfismo de ITS de isolados de anuros africanos.

Portanto, existe um grande polimorfismo genético entre os isolados de anuros africanos, o que confirma que a grande diversidade genética entre tripanossomas de anuros, mesmo entre isolados de uma mesma espécie de anuro e de uma mesma região geográfica, é comum entre isolados de todo o mundo, como sugerido em estudos com isolados Europeus e Norte Americanos (Clark *et al.*, 1995; Lun e Desser, 1995; 1996; Martin *et al.*, 1992a) e confirmada com nossos estudos anteriores com isolados brasileiros (Ferreira *et al.*, 2007a,b).

4.3.3.2 Análises filogenéticas de tripanossomas de anuros baseadas em seqüências dos genes SSUrDNA (V7-U4-V8), gGAPDH e Alfa Tubulina

A análise comparativa da região V7-U4-V8 da SSUrDNA de 57 isolados de anuros apresentou um significativo polimorfismo de tamanho entre os isolados, variando de 719 a 765pb (média de 728pb). Obtivemos seqüências de gGAPDH e de Alfa Tubulina de 39 dos 41 isolados analisados, selecionados de acordo com o polimorfismo de seqüências do gene ribossômico detectado nesse estudo em nossos estudos anteriores (Ferreira *et al.*, 2007a,b). Não observamos variação de tamanho entre as seqüências amplificadas desses genes. Não foi possível obter as seqüências de Alfa Tubulina dos isolados 357 e 939, e de gGAPDH dos isolados 1155 e 1278, devido a dificuldades na amplificação e seqüenciamento. As seqüências obtidas dos três genes foram utilizadas, isoladamente ou em conjunto, para inferências filogenéticas.

4.3.3.2.1 Análises filogenéticas de tripanossomas de anuros com seqüências combinadas dos genes SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina

A análise do conjunto de dados combinados empregando o programa POY resultou em um único diagrama mais parcimonioso com 4151 passos. Com o programa PAUP*, analisamos o alinhamento exportado pelo POY e obtivemos 10 diagramas, igualmente parcimoniosos, com o mesmo comprimento obtido na análise anterior. Os conflitos entre os 10 diagramas obtidos se resumem basicamente ao posicionamento de quatro ramos internos no clado An01 e de alguns terminais apicais, como visto no consenso estrito (Figura 2). O diagrama obtido pela análise bayeseana é congruente com o obtido por parcimônia, diferindo apenas na resolução das politomias e no posicionamento de alguns terminais internos aos grupos (Figura 3).

As análises combinadas corroboraram os grupos majoritários observados em trabalhos anteriores: o clado de tripanossomas de peixes separado do de anuros, a monofilia e as linhagens de tripanossomas de anuros (An01 a 04) (Ferreira *et al.*, 2007a,b). O clado An01 é constituído por isolados de hilídeos (21 tripanossomas) de todas as regiões brasileiras estudadas mais dois tripanossomas de leptodactilídeos (444 do Pantanal e 928 do Cerrado). O grupo An02 contém 4 tripanossomas de

bufonídeos e um de *L. chaquensis* (316). No grupo An03, encontramos isolados de anuros, principalmente de bufonídeos, e de flebotomíneos, todos da Amazônia. No clado An04 estão albergados todos os tripanossomas de anuros exóticos, exceto *T. chattoni*. Apenas dois isolados não se agruparam em nenhum dos clados An01 a 04, um isolado de *Hypsiboas bischiffi* (934) que se posicionou na base do grupo formado por An01 e 02 e um isolado o de *Amietophrynus garmani* (1278), único isolado Africano a se posicionar fora do clado An04, porém, na base desse clado. Com esse estudo, confirmamos a existência de um novo grupo (An05) bastante heterogêneo quanto aos hospedeiros e origem geográfica. Esse clado é constituído por *T. chattoni* (do ranídeo *Rana pipiens*) isolado da América do Norte (USA), que se mostrava pouco relacionado com todos os tripanossomas incluídos nos estudos anteriores (Martin *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2005), e por isolados do Brasil (439, isolado de *L. chaquensis* no Pantanal, 407 de *E. petersi* da Amazônia e 920 de *L. labyrinthicus* do Cerrado).

Figura 2. Análise de parcimônia baseada na combinação da região V7-U4-V8 rDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina de 47 tripanossomas, incluindo 4 isolados de flebotomíneos (◆) e 43 de anuros das famílias Hylidae (●), Leptodactylidae (■), Bufonidae (▲), Leiuperidae (□) e Ranidae (◆) do Brasil (BR), África (AFr), América do Norte (NA) e Europa (EU). Os isolados de anuros e flebotomíneos brasileiros incluídos nas análises são da Floresta Atlântica (AF), do Pantanal (PA), da Amazônia (AM), do Guaporé (GU) e do Cerrado (CE).

Figura 3. Análise bayesiana baseada na combinação da região V7-U4-V8 rDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina de 47 tripanossomas.

4.3.3.2 Análises filogenéticas de tripanossomas de anuros com seqüências isoladas dos genes SSUrDNA, gGAPDH e Alfa Tubulina

A análise realizada apenas com a região V7-U4-V8 da SSUrDNA resultou em um único diagrama (1251 passos), similar ao obtido pela análise combinada de seqüências. A única exceção foi o grupo An03 que apresentou uma posição distinta, mais relacionado com o grupo formado por An01, 02 e 934 nessa análise e com An04 na análise combinada (Figuras 2 e 4).

Os diagramas baseados nas seqüências de gGAPDH e Alfa Tubulina se mostraram menos resolvidos do que os baseados em seqüências de SSUrDNA ou nos dados combinados. Apesar da baixa resolução, em geral, observamos a formação de todos os grupos (An01 a 05), embora o

relacionamento entre eles apresente diferenças dependendo do diagrama (Figura 5). As análises baseadas em seqüências de proteínas foram ainda menos resolvidas do que as baseadas em seqüências de nucleotídeos (Figuras 5 b e d).

Figura 4. Análise de parcimônia baseada nas seqüências da região V7-U4-V8 rDNA (~725 pb).

Figura 5. Análise de parcimônia baseada em seqüências de DNA (A- gGAPDH e C- Alfa Tubulina) e de proteína (B- gGAPDH e D- Alfa Tubulina)

4.3.3.3 Relacionamento filogenético entre tripanossomas de bufonídeos sul americanos (brasileiros) e africanos (Moçambique e Congo).

Nas análises realizadas com 10 isolados de bufonídeos, 6 brasileiros e 5 africanos, *T. mega* do Congo e 1280, 1307, 1306 e 1278 de Moçambique, utilizando o conjunto de dados combinados dos 3 genes analisados obtido com o programa POY, os isolados de bufonídeos foram distribuídos em três clados: An02, An03 e An04 (Figura 2). Enquanto, os isolados de bufonídeos brasileiros foram posicionados nos clados An02 e An03, a maioria dos isolados africanos foi posicionada no clado An04. A única exceção foi o isolado 1278 que se posicionou na base do clado An04.

Os isolados 1280, 1307 e 1306 de bufonídeos moçambicanos se posicionaram no grupo An04, junto com isolados da Europa e da América do Norte. O isolado 1278, também de um bufonídeo moçambicano, foi posicionado em um ramo longo na base desse grupo (Figura 2). As inferências filogenéticas baseadas nos dados combinados, aliadas à análise de polimorfismo de tamanho de ITS, sugerem certa correlação entre grupos de isolados e a origem geográfica dos bufonídeos. Os isolados do centro de Moçambique (1280 de *Amietophrynus garmani* e 1307 de *Ptychadena mossambica*) formaram um grupo distantemente relacionado do isolado 1278 de *A. garmani* obtido no sul do País. Por outro lado, os isolados 1276, 1277 e 1309, também de *A. garmani* da região central de

Moçambique não foram diferenciados pelo polimorfismo de tamanho de ITS do isolado 1278. Todos os três genes seqüenciados do isolado 1306, também de *A. garmani*, da região sul de Moçambique apresentaram 100% de similaridade com os de *T. mega*, isolado de "*Bufo regularis*" (atualmente *Amietophrynus* sp), no Congo, em 1956 (Boné e Steinert, 1956). Entretanto, o tamanho de ITS desses dois tripanossomas apresentou pequena variação de tamanho (Figura 1), sugerindo que sejam isolados diferentes da mesma espécie. Portanto, podemos concluir que reisolamos *T. mega* de *A. garmani* em Moçambique 51 anos após sua primeira descrição em outra espécie de bufonídeo.

Embora tenhamos observado uma grande correlação entre os isolados do grupo An02 e a família Bufonidae não foi possível estabelecer correlação entre a família do hospedeiro de origem e os demais grupos onde se posicionam tripanossomas de bufonídeos. No grupo An03, por exemplo, posicionam-se isolados de três famílias de anuros (Bufonidae, 339, 364 e 399; Leiuperidae, 408; Leptodactylidae, 398) (Figura 4). Os isolados 364, 399, 408 e 398 não foram diferenciados geneticamente nas análises de polimorfismo molecular (Ferreira *et al.* 2007a) e apresentaram fragmentos de V7-U4-V8 com 100% de similaridade. Esses dados sugerem que esse grupo esteja predominantemente relacionado ao bioma do hospedeiro vertebrado (Amazônia).

O ramo que agrupa An04 com o isolado 1278 apresenta um padrão acentuado de troca de hospedeiros vertebrados (Figura 2). Neste ramo observamos um isolado de bufonídeo africano na base (1278). O ramo basal de An04 é constituído por tripanossomas de ranídeos da Europa e da América do Norte (*T. neveulemairei* e *T. rotatorium*, respectivamente) e um isolado de camaleão (*T. therezieni*). O ramo apical contém dois agrupamentos: um de tripanossomas africanos isolados de hospedeiros distantemente relacionados (1280 de Bufonidae e 1307 de Ptychadenidae) e outro que contém uma espécie de ranídeo (*T. ranarum* da América do Norte) e duas espécies de bufonídeos (*T. fallisi* da América do Norte e *T. mega* da África).

Algumas semelhanças e diferenças merecem ser discutidas quando comparamos as análises agora apresentadas com um maior número de isolados e de seqüências analisadas (Figura 2) e as anteriormente realizadas pelo nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2007a,b). A posição do clado An02 como grupo irmão do An01, que contém principalmente isolados de hílídeos, foi corroborada nesse e nos estudos anteriores. Por outro lado, o clado An04, que compreende todos e somente os isolados de anuros exóticos, posicionou-se como irmão do grupo An03, posicionado mais próximo do clado An05 (Figura 2). Nossos estudos anteriores posicionaram o clado An04 na base de um ramo formado por An03 e *T. chattoni*, que não constituíam um clado uma vez que *T. chattoni* sempre era posicionado em um ramo longo nas árvores filogenéticas (Ferreira *et al.* 2007a; b).

4.3.3.4 Relacionamento filogenético entre tripanossomas de leptodactílídeos e leiuperídeos.

Em trabalhos anteriores (Ferreira *et al.*, 2007a;b) mostramos que tripanossomas isolados de leptodactílídeos estão distribuídos em dois grupos, predominantemente de isolados de bufonídeos (An02) ou de hilídeos (An01). Neste trabalho, utilizando um número maior de isolados de várias famílias de anuros, confirmamos esse padrão (Figuras 2 e 4). No grupo An01, além de 32 isolados de hilídeos foram posicionados os isolados 444 (de *L. chaquensis* do Pantanal) representante do genótipo E (Ferreira *et al.*, 2007a;b) e 928 (de *L. labyrinthicus* do Cerrado) representante do genótipo H1. No grupo An02, que é composto predominantemente por isolados de bufonídeos, foi posicionado o isolado 316 de *L. chaquensis* do Pantanal, representante do genótipo K. Além disso, um isolado de leptodactílídeo (398 de *L. pentadactylus* da Amazônia) foi posicionado no grupo An03 (Figura 4). Esses dados sugerem que leptodactílídeos tenham sido colonizados por tripanossomas em eventos recentes de troca de hospedeiro vertebrado a partir de parasitas ancestrais de outras famílias de anuros. O mesmo é observado para isolados de *Egystomops petersi* (Leiuperidae) que estão distribuídos em grupos não relacionados (isolados 407 e 408 nos grupos An05 e An03, respectivamente) (Figura 2 e 4).

Os isolados 439 de *L. chaquensis* (Pantanal) e 920 de *L. labyrinthicus* (Cerrado), junto com o isolado 407 de *E. petersi* (Amazônia) e *T. chattoni* (USA), posicionaram-se no grupo An05. Esse é o grupo mais homogêneo geneticamente (menor divergência intra-clado) e com a maior diversidade de hospedeiros. Além disto, esse grupo contém isolados de anuros capturados em diferentes biomas, em regiões separadas por grandes distâncias.

Embora anuros da família Leptodactylidae possam se infectar com tripanossomas muito distantemente relacionados, em pelo menos dois grupos observamos que esses tripanossomas podem ser associados à região geográfica. No grupo An02, o ramo que agrupa isolados amazônicos de *Rhinella margaritifera* (346 e 362 de Rondônia) possui na base o isolado 316 de *L. chaquensis* (Pantanal). *L. chaquensis* ocorre em pequenos fragmentos de floresta amazônica do Acre e na Floresta Amazônica Boliviana além do Pantanal do Mato Grosso do Sul (IUCN, 2004). Os tripanossomas 398 (*Leptodactylus pentadactylus*) e 408 (*Engystomops petersi*) do clado An03, isolados em Rondônia, são de espécies de anuros que ocorrem predominantemente na Amazônia (IUCN, 2004).

4.3.3.5 Relacionamento filogenético entre tripanossomas de hilídeos da América do Sul.

Tripanossomas de hilídeos constituem o nosso maior conjunto de isolados (43 isolados). Foram selecionados 22 isolados de hilídeos para as análises combinadas e 33 para a análise com a região V7-U4-V8. Nas análises baseadas nos dados combinados, ou apenas na região V7-U4-V8, os tripanossomas de hilídeos formam um grupo (An01), com exceção do isolado 934 posicionado na base do clado formado pelos grupos An01 e An02 (Figuras 2, 3 e 4). Contudo, no diagrama baseado no gene de Alfa Tubulina observamos uma tricotomia entre o isolado 934, An01 e An02 (Figura 5a) e nas

análises baseadas no gene gGAPDH esse isolado se encontra na base do grupo An01 (Figura 5c). Portanto, provavelmente o isolado 934 representa uma linhagem bastante distinta das demais de hilídeos, porém ainda relacionada ao grupo An01.

Portanto, os isolados do grupo An01 apresentam uma forte correlação com Hylidae, a família dos hospedeiros de origem. Porém, esse grupo é dividido em vários subgrupos que não apresentam correlação com as espécies ou mesmo com os gêneros de hilídeos. Isolados de diferentes gêneros e até mesmo de diferentes espécies de anuros foram distribuídos em 4 subgrupos distintos (An01a-d). Por exemplo, isolados de *H. bischoffi* posicionaram-se nos grupos An01b (939, 653 e 291) ou An01d (282 e 932); isolados de *T. venulosus* foram separados nos grupos An01a (315 e 334) e An01d (448) (Figura 4). Contudo, observamos grande correlação entre dois dos subgrupos formados e tribos da subfamília Hyliinae (Faivovich *et al.*, 2005): O grupo An01a possui tripanossomas isolados de hilídeos da tribo Lophiohylini, An01b agrupa 8 tripanossomas, 7 isolados de hilídeos da tribo Cophomantini. Os clados An01c e An01d não apresentam relação com a tribo de hilídeo. An01d agrupa tripanossomas de hilíneos de três tribos (Cophomantini, Lophiohylini e Dendropsophini) além de um isolado da subfamília Phyllomedusinae (Figura 4).

O padrão de ramificação dos isolados de hilídeos mostra uma significativa correlação entre os subgrupos obtidos e as regiões geográficas de origem dos anuros. Por exemplo, o subgrupo An01a agrupa dois isolados do Pantanal (334 e 448) e um do Guaporé (614) que são regiões próximas que compartilham espécies de anuros; An01b é constituído apenas por isolados da Mata Atlântica de São Paulo; An01c é composto por um isolado da Amazônia (357) e um do Guaporé (616), que são regiões vizinhas. No subgrupo An01d também observamos essa correlação entre certos agrupamentos terminais (Figuras 2 e 4): os isolados 939, 647 e 646 são de anuros da Mata Atlântica de São Paulo; 315 e 467 são do Pantanal; 304, 615, 613, 612, 358, 442, 620 e 305 são de hilídeos da Amazônia, Guaporé e Pantanal.

Portanto, nossas análises demonstram que os tripanossomas de hilídeos estão distribuídos em diversas linhagens filogenéticas que apresentam certa correlação com a família e as tribos dos hospedeiros de origem e com a origem geográfica. O padrão de ramificação entre os subgrupos de An01 sugere, ainda, que o surgimento desse grupo ocorreu depois da divergência das tribos de hilíneos observada atualmente. O grupo An01a, que é o mais basal dos tripanossomas agrupados em An01, é composto por isolados de hilíneos da tribo Lophiohylini, a mais derivada das presentes na América do Sul (Faivovich *et al.*, 2005). Por outro lado, o único isolado de Phyllomedusinae, subfamília irmã de Hyliinae, empregado nas análises (358) agrupou com os tripanossomas do grupo apical de An01 (An01d). Esse dado sugere que a colonização de grupos mais antigos de Hylidae ocorreu tardiamente em relação à colonização da família em geral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler S, Theodor O. Investigations on Mediterranean kala-azar. X. A note on *Trypanosoma platydactyli* and *Leishmania tarentolae*. Proc Roy Soc Lond 1935; 116:543-544.
- Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. Cell 1990; 61:1157-1160.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997; 25:3389-3402.
- Anderson JR, Ayala SC. Trypanosome transmitted by Phlebotomus: first report from the Americas. Science 1968; 161:1023-1025.
- Averinzev S. Concerning parasites of *Rana nutti* Blgr. Zool Vêst 1916; 1:519.
- Ayala SC. Two new trypanosomes from California toads and lizards. J Protozool 1970; 17:370-373.
- Ayala SC. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. J Protozool 1971; 18:433-436.
- Ayala SC, McKay G. *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. J Protozool 1971; 18:430-433.
- Bailey JK. *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. Exp Parasitol 1962; 12:155-163.
- Baker JR. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. Exp Parasitol 1963; 13:219-233.
- Baker JR. The origins of parasitism in the protists. Int J Parasitol 1994; 24:1131-1137.
- 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). Can J Zool 1969; 47:283-288.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of Ranidae. II. The effects of excitation and adrenalin on the peripheral parasitaemia in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw). Can J Zool 1970; 48:1317-1319.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of anura. Adv Parasitol 1973; 11:1-73.
- Barrow JH. The biology of *Trypanosoma diemyctyli* (Tobey). I. *Trypanosoma diemyctyli* in the leech, *Batrachobdella picta* (Verrill). Trans Am microsc Soc 1953; 72:197-216.
- Barta JR, Boulard Y, Dessler SS. Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of Its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. Trans Am microsc Soc 1989; 108:6-20.

- Barta JR, Desser SS. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *J Wildl Dis* 1984; 20:180-189.
- 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; 139:574-576.
- Boné GJ, Steinert M. Isotopes incorporated in the Nucleic Acids of *Trypanosoma mega*. *Nature* 1956; 178:308-309.
- Borst P, Fase-Fowler F, Steinert M, Van-Assel S. Maxi-circles in the kinetoplast DNA of *Trypanosoma mega*. *Exp Cell Res* 1977; 110:167-173.
- Borst P, Fase-Fowler F, Weijers PJ, Barry JD, Tetley L, Vickerman K. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma vivax* and *T. congolense*. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 15:129-142.
- Borst P, Hoeijmakers JHJ. Kinetoplast DNA. *Plasmid* 1979; 2:20-40.
- Bossuyt F, Milinkovitch MC. Amphibians as indicators of early tertiary "Out-of-India" dispersal of vertebrates. *Science* 2001; 292:93-95.
- Braga RR, Lainson R, Ishikawa EAY, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) utingensis* n. sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata* in amazonian Brazil. *Parasite* 2003; 10:111-118.
- Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of Phagotrophic Euglenids (Euglenozoa) as Inferred from Hsp90 Gene Sequences. *J Eukaryot Microbiol* 2007; 54:86–92.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 104:219-232.
- Brisse S, Barnabe C, Banuls AL, Sidibe I, Noel S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 92:253-263.
- Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000a; 30:35-44.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000b; 111:95-105.

- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 2001; 31:1218-1226.
- Brumpt E. Rôle pathogène et mode de transmission du *Trypanosoma inopinatum* Ed. et Et. Sergent. Mode d'inoculation d'autres trypanosomes. *C r Séanc Soc Biol* 1906; 61:167-169.
- Brumpt E. De l'hérédité des infections à trypanosomes et à trypanoplasmes chez les hôtes intermédiaires. *C r Séanc Soc Biol* 1907; 63:176-178.
- Brumpt E. Description de deux trypanosomes nouveaux: *T. sergeti* et *T. parroti* du *Discoglossus pictus*. *Annl Parasitol* 1923; 1:337-341.
- Brumpt E. Un nouveau trypanosome: *Trypanosoma neveu-lemairei* n. sp. de la grenouille verte (*Rana esculenta*). *Anns Parasit* 1928; 6:18-22.
- Brumpt E. Précis de parasitologie. Paris: Masson et Cie; 1936.
- Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *J Mol Evol* 2002; 55:757-767.
- Busse I, Preisfeld A. Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). *Org Divers Evol* 2003; 3:1-12.
- Buttner A, Bourcart N. Sur Certaines Particularités Biologiques d'un trypanosome de la grenouille verte *Trypanosoma inopinatum* Sergent, 1904. *Anns Parasit* 1955; 30:431-445.
- Camargo EP. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic tripanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964; 12:93-100.
- Camargo EP. *Phytomonas* and others parasites of plants and fruits. *Adv Parasitol* 1999; 42:29-112.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 2003; 5:1231-1240.
- Carini A. Stades endoglobulaires des trypanosomes. *Ann Inst Pasteur* 1910; 24:143-151.
- Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 1981; 14:461-481.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 1998; 73:203-266.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc R Soc Lond B* 2004; 271:1251-1262.
- Chaniotis BN, Anderson JR. Age structure, population dynamics and vector potential of *Phlebotomus* in Northern California. II. Field population dynamics and natural flagellate infections in parous females. *J Med Entomol* 1968; 5:272-292.

- Clark CG, Martin DS, Diamond LS. Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42:92-96.
- Cortes M, Perez-Reyes R, Tay J. Ultrastructure of culture forms of a trypanosomal parasite of frogs, *Trypanosoma montezumae*. *Rev Latinoam Microbiol* 1972; 14:183-190.
- 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; 133:159-169.
- Creemers J, Jadin JM. Ultrastructure et biologie de *Trypanosoma rotatorium*, Mayer 1843. *Acta Zool Path Antverp* 1966; 41:119-136.
- Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73:145-155.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 2000; 16:142-144.
- Danilewsky B. Zur parasitologie des blutes. *Biol Zbl* 1885; 5:529-536.
- Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Davila AMR. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol* 2001; 31:610-614.
- Desser SS. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *J Parasitol* 2001; 87:152-160.
- Desser SS, McIver SB, Jez D. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. *Int J Parasitol* 1975; 5:507-509.
- Desser SS, McIver SB, Ryckman A. *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *J Parasitol* 1973; 59:353-358.
- Diamond LS. A new trypanosome, *Trypanosoma pipientis* n. sp. from the leopard frog, *Rana pipiens*. *J Parasitol* 1950; 36:24.
- Diamond LS. A Study of the Morphology, Biology and Taxonomy of the Trypanosomes of Anura. *Wildl Dis* 1965; 44:1-85.
- Doflein F. Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger. Jena: G. Fisher; 1901.
- Dolezel D, Jirku M, Maslov DA, Lukes J. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50:1943–1951.

- Dollet M. Phloem-restricted trypanosomatids form a clearly characterised monophyletic group among trypanosomatids isolated from plants. *Int J Parasitol* 2001; 31:459-467.
- Donelson JE, Zeng W. A comparison of trans-splicing in trypanosomes and nematodes. *Parasitol Today* 1990; 6:327-334.
- Dooijes D, Chaves I, Kieft R, Dirks-Mulder A, Martin W, Borst P. Base J originally found in Kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:3017–3021.
- Duellman WE. Patterns of species diversity in anuran amphibians in the american tropics. *Ann Missouri Bot Gard* 1988; 75:79-104.
- Dutton JE, Todd JL, Tobey EN. Concerning parasitic protozoa observed in Africa. Part II. *Ann Trop Parasit* 1907; 1:287-370.
- Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC. Systematic review of the frog family hylidae, with special reference to hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bull Am Mus Nat Hist* 2005; 294:6-228.
- Fantham HB, Porter A, Richardson LR. Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. *Parasitology* 1942; 34:199-226.
- Feng LC, Chung HL. *Phlebotomus squamirostris* Newstead, transmitter of *Trypanosoma bocagei* França in the toad, *Bufo bufo gargarizans* (Cantor). *Chin Med J* 1940; Supplement 3:198-211.
- Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11608-11612.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 1999; 118 (Pt 2):161-166.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66:261-271.
- Fernandes O, Santos S, Cupolillo E, Mendonça B, Derré R, Junqueira A, et al. Trypanosomiasis in the Brazilian Amazon: a mini-exon multiplex PCR to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95:97-99.
- Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Euk Microbiol* 1997; 44:535-539.

- Ferreira RC, Campaner M, de Souza AA, Takata CSA, Barret TV, Shaw JJ, et al. A new lineage of closely related trypanosomes of anurans (Bufonidae and Leptodactylidae) and sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Brazilian Amazonia 2007b; em preparação.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CSA, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitology 2007a; in press.
- Ford LS, Cannatella DC. The major clades of frogs. Herp Monogr 1993; 7:94–117.
- França C. Le cycle évolutif des trypanosomes de la grenouille (*T. constatum*, *T. rotatorium* et *T. inopinatum*). Archs Inst r Bact 1908; 2:89-93.
- França C. Notes sur des hématozoaires de la Guinée Portugaise. IV. Hématozoaires de *Bufo regularis* Reuss. Archs Inst Real Bact 1911; 3:229-238.
- França C, Athias M. Recherches sur les trypanosomes des amphibiens. I. Les trypanosomes de la *Rana esculenta*. Archs Inst Real Bact 1906; 1:127-165.
- Frost DR. Amphibian species of the world: an online reference. Version 4 (17 August 2006). 2006 [updated 2006; cited]; Available from: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, et al. The amphibian tree of life. Bull Am Mus Nat Hist 2006; 297:1-370.
- Gardiner PR, Mahmoud MM. Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside sub-saharan Africa. In: Kreier JP, Baker JR, editors. Parasitic Protozoa: Academic Press, Inc; 1992. p. 277-313.
- Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95:557-565.
- Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcripts. Mol Biochem Parasitol 2000; 107:269-277.
- Gibson W, Stevens J. Genetic exchange in the trypanosomatidae. Adv Parasitol 1999; 43:1-46.
- 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; 130:405-412.
- Gibson WC, Marshall TF, Godfrey DG. Numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. Adv Parasitol 1980; 18:175-246.
- Glaw F, Köhler J. Amphibian species diversity exceeds that of mammals. Herpetol Rev 1998; 29:11-12.

- Gomez E, Valdes AM, Pinero D, Hernandez R. What is a genus in the Trypanosomatidae family? Phylogenetic analysis of two small rRNA sequences. *Mol Biol Evol* 1991; 8:254-259.
- Graybeal A. Phylogenetic relationships of bufonid frogs and tests of alternate macroevolutionary hypotheses characterizing their radiation. *Zool J Linnean Society* 1997; 119:297-338.
- Grimaldi GJ, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:230-250.
- Gruby M. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1843; 55:1134-1136.
- Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol* 2001; 31:443-452.
- Haag J, O'Huigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91:37-49.
- Haas A. Phylogeny of frogs as inferred from primarily larval characters (Amphibia: Anura). *Cladistics* 2003; 19:23-89.
- Hajduk SL, Sabatini RS. RNA Editing, post-transcriptional restructuring of genetic information. In: Smith DF, Parsons M, editors. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Oxford: Oxford University Press; 1996. p. 134-158.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phyl Evol* 2007; 44:15-25.
- 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. *Int J Parasitol* 2004; 34:1393-1404.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol* 2005a; 35:431-443.
- Hamilton PB, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol Ecol* 2005b; 14:3167-3175.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1989-1995.
- Henriksson J, Pettersson U, Solari A. *Trypanosoma cruzi*: Correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp Parasitol* 1993; 77:334-348.

- Henriksson J, Solari A, Rydaker M, Sousa OE, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology* 1996; 112:385-391.
- Hernandez R, Rios P, Valdes AM, Pinero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 41:207-212.
- Herrer A. *Trypanosoma phyllotis* n. sp. e infecciones asociadas en una titira, el *Phlebotomus noguchii*. *Rev Med Exp (Peru)* 1942; 1:40-55.
- Heyer WR, Donnelly MA, McDiarmid RW, Hayek L-AC, Foster MS. Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians. Smithsonian Institution Press; 1994.
- Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool* 1964; 11:200-207.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 1966; 212:1385-1386.
- Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. *Progress in Protozoology*. New York: Academic Press; 1963. p. 68.
- Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol Dis* 2003a; 2:15.
- Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol* 2003b; 20:644-652.
- IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2004 [updated 2004; cited]; Available from: www.iucn.org.
- Jackson AP, Vaughan S, Gull K. Evolution of Tubulin Gene Arrays in Trypanosomatid parasites: genomic restructuring in *Leishmania*. *BMC Genomics* 2006; 7:261.
- Jager AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D'Orso I, Frasch AC. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *PNAS* 2007; 104:2035-2042.
- Jirku M, Kolesnikov AA, Benada O, Lukes J. Marine fish and ray trypanosomes have large kinetoplast minicircle DNA. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73:279-283.

- Johnson PT, Hertig M. Behavior of *Leishmania* in panamanian phlebotomine sandflies fed on infected animals. *Exp Parasit* 1970; 27:281-300.
- Johnson RN, Young DG, Butler JF. Trypanosome transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *J Med Entomol* 1993; 30:918-921.
- Johnston TH. A census of the endoparasites recorded as occurring in Queensland arranged under their hosts. *Proc R Soc Queensland* 1916; 28:31-79.
- Jones SR, Woo PT. Use of kidney impressions for the detection of trypanosomes of anura. *J Wildl Dis* 1989; 25:413-415.
- Kanmogne GD, Stevens JR, Asonganyi T, Gibson WC. Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol Res* 1996; 82:535-541.
- Katakura K, Mimori T, Furuya M, Uezato H, Nonaka S, Okamoto M, et al. Identification of *Endotrypanum* species from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. *J Vet Med Sci* 2003; 65:649-653.
- Kudo R. On the protozoa parasitic in frogs. *Trans Am Microsc Soc* 1922; 41:59-76.
- Lake JA, de la Cruz VF, Ferreira PC, Morel C, Simpson L. Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:4779-4783.
- Landweber LF, Gilbert W. Phylogenetic analysis of RNA editing: a primitive genetic phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:918-921.
- Laurin M, Girondot M, de Ricqlès A. Early tetrapod evolution. *Trends Ecol Evol* 2000; 15:118-123.
- Laveran A. Sur un nouveau trypanosome d'une grenouille. *C r Séanc Soc Biol* 1904; 56:158-160.
- Laveran A, Mesnil F. *Trypanosomes et trypanosomiasés*. Paris: Masson et Cie; 1912.
- Lehmann DL. *Trypanosoma boylii* n. sp. from the California yellow-legged frog, *Rana b. boylii*. *Trans Am micros Soc* 1959; 78:370-373.
- Lloyd L, Johnson WB, Young WA, Morrison H. Second report of the tsetse-fly investigation in Northern Provinces of Nigeria. *Bull Entomol Res* 1924; 15:1-28.
- Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell* 2002; 1:495-502.
- Lukes J, Hashimi H, Zikova A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet* 2005; 48:277-299.

- Lukes J, Jirku M, Dolezel D, Kral'ova I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *J Mol Evol* 1997; 44:521-527.
- Lukes J, Votypka J. *Trypanosoma avium*: novel features of the kinetoplast structure. *Exp Parasitol* 2000; 96:178-181.
- Lun ZR, Desser SS. Karyotype analysis of anuran trypanosomes by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *J Parasitol* 1995; 81:1018-1020.
- Lun ZR, Desser SS. Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. *Parasitol Res* 1996; 82:22-27.
- Maia da Silva F, Junqueira ACV, 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; in press.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N, et al. 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* 2004a; 129:549-561.
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, 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* 2004b; 128:283-294.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna* 2000; 6:163-169.
- Marchoux E, Salinbeni A. Un trypanosome nouveau chez une *Hyla* voisine de *H. lateristriga* Spix et Agassiz. *C r Séanc Soc Biol* 1907; 62:592-594.
- Martin DS, Desser SS. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* N. sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. *J Protozool* 1990; 37:199-206.
- 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. *Parasitol Res* 1991a; 77:18-26.
- Martin DS, Desser SS. Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. *J Parasitol* 1991b; 77:498-500.
- Martin DS, Desser SS, Hong H. Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *J Parasitol* 1992a; 78:317-322.

- Martin DS, Desser SS, Werner JK. Allozyme comparison and infectivity of cultured stages of *Trypanosoma fallisi* from southern Ontario and a trypanosome of toads from northern Michigan. J Parasitol 1992b; 78:1083-1086.
- 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. J Parasitol 2002; 88:566-571.
- 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. Mol Biochem Parasitol 1996; 75:197-205.
- Maslov DA, Simpson L. RNA editing and mitochondrial genomic organization in the cryptobiid kinetoplastid protozoan *Trypanoplasma borrelli*. Mol Cell Biol 1994; 14:8174-8182.
- Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. Parasitol Today 1995; 11:1995.
- Mathis C, Leger M. Trypanosomes des batrachiens du Tonkin. Ann Inst Pasteur 1911; 25:671-681.
- Mayer AFIC. Spicilegium observationum anatomicarum de organo electrico in *Raiis anelectricis* et de haematozois. Bonnae; 1843.
- Mazza S, Gonzles C, Franke I, Alvaro S. Tripanosomas observados en ranas (*Leptodactylus ocellatus* L.) del pais. Revta Univ B Aires 1927; 5:902-905.
- McConnell E, Correa M. Trypanosomes and other microorganisms from Panamanian *Phlebotomus* sandflies. J Parasitol 1964; 50:523-528.
- McKeever S, French FE. *Corethrella* (Diptera: Corethrellidae) of eastern Norht America: laboratory life history and field responses to anuran calls. Ann Entomol Soc Am 1991; 84:493-497.
- Mendona 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; 124:177-184.
- 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*. J Eukaryot Microbiol 2001; 48:161-169.
- Minter-Goedbloed E, Leake CJ, Minter DM, McNamara J, Kimber C, Bastien P, et al. *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: development in vitro and insect hosts. Parasitol Res 1993; 79:329-333.

- Miyata A. Anuran trypanosomes in Kyushu and Ryukyu islands, with descriptions of six new species. *Trop Med* 1978; 20:51-80.
- Miyata A, Poon SK. Two new amphibian trypanosomes (Protozoa: Trypanosomatidae) in *Bufo asper* (Amphibia: Bufonidae) from Peninsular Malaysia. *Proceedings Japanese Society of Systematic Zoology* 1992; 47:1-9.
- Miyata A, Yong HS. Four new trypanosomes (Protozoa: trypanosomatidae) in the blood of a Malaysian frog, *Rana Blythi* (Amphibia: Ranidae). *Raffles Bull Zool* 1994; 42:539-550.
- Miyata A, Yong HS, Hasegawa H, Syafruddin. Five new trypanosomes (Protozoa: Trypanosomatidae) in the blood of East Asian tree-frogs (Amphibia: Rhacophoridae). *Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology* 1994; 52.
- Miyata A, Young HS. A new trypanosome, *Trypanosoma hosei* (Protozoa, Trypanosomatidae), in *Rana hosei* (Amphibia: Ranidae) from peninsular Malaysia. *Raffles Bull Zool* 1990; 39:131-134.
- Molan AL, Saeed IS, Miyata A. Haematoprotezoa in *Rana ridibunda* in Iraq. *Proceedings of the Japanese Society of Systematic Zoology* 1989; 40:3-12.
- Molyneux DH. Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 1977; 15:1-82.
- Moore MJ, Query CC, Sharp PA. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. Gesteland RF, Atkins JF, editors.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1993.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:2211–2219.
- Moreira D, López-García 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54:1861-1875.
- Nabarro D. English translation and enlargement of "Trypanosomes et Trypanosomiasis" (Laveran, A. and Mesnil, F.). Chicago: W. T. Keener Co; 1907.
- Nigrelli RF. Trypanosomes from North American amphibians, with description of *Trypanosoma grylli* Nigrelli (1944) from *Acris gryllus* (Le Conte). *Zoologica* 1945; 30:47-57.
- Nixon K. The parsimony ratchet, a method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 1999; 15:407–414.
- Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herrerii* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 80:119-123.

- Nunes LR, Teixeira MMG, Camargo EP, Buck GA. Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 74:233-237.
- Osaki LS, Czeko YMT. Genomic DNA cloning and related techniques. In: Morel CM, editor. *Genes and antigens of parasites, a laboratory manual*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 1984. p. 165-185.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. *Trypanosoma cruzi*: exploring the nuclear genome of zymodeme 3 stocks by chromosome size polymorphism. *Exp Parasitol* 2007; 116:71-76.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. 2003. *Mol Biochem Parasitol* Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation; 129:79-90.
- Peres-Reyes R, Hashimoto BY, Montesino CM, Valencia LC. Estudios sobre hematozoarios X. Algunos tripanosomas de ranas mexicanas. *Revta lat-am Microbiol* 1960; 3:201-212.
- Perez-Reyes R. *Trypanosoma galba* n. sp., parasite of Mexican frogs. Morphology and cycle in the vertebrate. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex)* 1968; 10:79-84.
- Perez-Reyes R. Two new species of trypanosomas parasites in Mexican frogs. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex)* 1969; 11:37-40.
- Perez-Reyes R, Tay J, Cortez M. Ultrastructure of the epimastigotes of *Trypanosoma galba*, a parasite of frogs. *Rev Latinoam Microbiol* 1976; 18:47-58.
- Perry K, Agabian N. mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia* 1991; 47:118-128.
- Pessoa SB. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by leeches and of trypanosomas of cold-blooded vertebrates by triatominae. *Rev Saude Publica* 1969; 3:17-20.
- Pough FH, Heiser JB, McFarland WN. *Vertebrate life*. 1996.
- 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). *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:751–758.
- Ramos B, Urdaneta-Morales S. Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. *Rev Biol Trop* 1977; 25:209-217.
- Reilly BO, Woo PTK. The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida) from *Hyla versicolor* LeConte, 1825 (Anura). *Can J Zool* 1982a; 60:116-123.
- Reilly BO, Woo PTK. The *in vivo* and *in vitro* development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). *Can J Zool* 1982b; 60:124-133.
- Reilly BO, Woo PTK. The ultrastructure of an anuran trypanosome, *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo 1982 (Kinetoplastida). *Can J Zool* 1982c; 60:134-138.

- Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell' Porto A, Milder RV, Takeda GF, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol* 2003; 116:185-207.
- 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; 132:215-224.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19:1572–1574.
- Roy J, Faktorová D, Benada O, Lukeš J, Burger G. Description of *Rhynchopus euleeides* n. sp. (Diplonemea), a Free-Living Marine Euglenozoan *J Euk Microbiol* 2007; 54:137–145.
- Ruppert EE, Barnes RD. *Invertebrate zoology*. 1994.
- Sawyer RT. *Leech biology and behaviour*. Oxford Oxford Science Publications; 1986.
- SBH. Lista de espécies de anfíbios do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). 2005 [updated 2005; cited]; Available from: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>.
- Scorza JV, Boyer CD. Sobre la sinonimia del *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, en batracios de Venezuela. *Bol Venez Lab Clin* 1958; 3:29-36.
- Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Mol Ecol* 2001; 10:2319-2327.
- Sergent E, Sergent E. Sur un trypanosome nouveau, parasite de la grenouille verte. *C r Séanc Soc Biol* 1904; 56.
- Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG. *Phytomonas*: Analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. *J Eukaryot Microbiol* 1999a; 46:618-625.
- Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol* 1999b; 91:268-279.
- Shaw JJ. A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the sloth *Choloepus hoffmanni*, in Panama. *Nature* 1964; 201:417-418.

- Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). Trans R Soc Trop Med Hyg 1972; 66:709-717.
- Shaw JJ, Rosa AT, Souza A, Cruz AC. Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: Rangel EF, Lainson R, editors. Flebotomíneos do Brasil: Ed. Fiocruz; 2003.
- Sherlock I, Pessoa SB. Leptomonas infectando naturalmente *Phlebotomus* em Salvador (Bahia, Brasil). Rev Lat-Amer Microbiol Parasit 1966; 8:47-50.
- Shortt HE, Swaminath CS. Life history and morphology of *Trypanosoma phlebotomi* (Mackie 1914). Ind J Med Res 1931; 19:541-563.
- Siddall ME, Apakupakul K, Burreson EM, Coates KA, Erséus C, Gelder SR, et al. Validating Livanow: Molecular data agree that leeches, branchiobdellidans, and *Acanthobdella peledina* form a monophyletic group of oligochaetes. Mol Phylogenet Evol 2001; 21:346-351.
- Siddall ME, Burreson EM. Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. Mol Phylogenet Evol 1998; 9:156-162.
- Siddall ME, Desser SS. Alternative leech vectors for frog and turtle trypanosomes. J Parasitol 1992; 78:562-563.
- Siegel TN, Tan KS, Cross GA. Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol 2005; 25:9586-9594.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. Mol Phylogenet Evol 2004; 30:201-212.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. Mol Biol Evol 2002; 19:2071-2083.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends in Parasitology 2006; 22:168-174.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol 2006; 22:168-174.
- Simpson L. The kinetoplast of hemoflagellates. Int Rev Cytol 1972; 32:139-207.
- Simpson L. Kinetoplast DNA in trypanosomatid flagellates. Int Rev Cytol 1986; 99:119-179.
- Simpson L, Maslov DA. Evolution of the U-insertion/deletion RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa. Ann N Y Acad Sci 1999; 870:190-205.

- Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: A complex business. *RNA* 2003; 9:265–276.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:1383-1387.
- 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. *J Parasitol* 1968; 54:255-258.
- Stebbins JH. On the occurrence of trypanosomes in the blood of *Rana clamata*. *Trans Am micros Soc* 1907; 27:26-30.
- Steindel M, Dias Neto E, Pinto CJ, Grisard EC, Menezes CL, Murta SM, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Eukaryot Microbiol* 1994; 41:261-267.
- Steinert M, Novikoff AB. The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 8:563-569.
- Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:669-676.
- Stevens JR, Gibson WC. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today* 1999a; 15:432-437.
- Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica* 1999b; 15:673-684.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 1999; 118:107-116.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* 2001; 48:1-56.
- Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. *Int Rev Cytol* 1992; 141:65-88.
- Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 1998.
- Taylor JE, Rudenko G. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet* 2006; 22:614–620.
- Teixeira MMG, Serrano MG, Camargo EP. New Data from Old Trypanosomatid Preparations. *Parasitol Today* 2000; 16:261-263.

- Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *Am J Trop Med Hyg* 1971; 20:150-156.
- Tessier LH, Keller M, Chan RL, Fournier R, Weil JH, Imbault P. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J* 1991; 10:2621–2625.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-4882.
- Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol* 1995; 36:47-115.
- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabe C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1335-1339.
- Tschudi C, Ullu E. Destruction of U2, U4, or U6 small nuclear RNA blocks Trans splicing in trypanosome cells. *Cell* 1990; 61:459-466.
- Uliel S, Liang XH, Unger R, Michaeli S. Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organisation, and unique functions. *Int J Parasitol* 2004; 34:445-454.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 138:131-141.
- Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takeda G, Buck GA, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol* 2001; 99:37-48.
- 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.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 1994; 24:1317-1331.
- von der Heyden S, Chao EE, Vickerman K, Cavalier-Smith T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplonemid flagellates and the evolution of Euglenozoa. *J Eukaryot Microbiol* 2004; 51:402–416.
- Votýpka J, Lukes J, Oborník M. Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. *Acta Protozool* 2004; 43:225-231.

- Votycka J, Obornik M, Volf P, Svobodova M, Lukes J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology* 2002; 125:253-263.
- Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol* 1966; 18:124-193.
- Wallace FG. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press; 1979. p. 213-240.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:7213-7218.
- Werner JK. Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. *J Parasitol* 1993; 79:356-363.
- Werner JK, Davis JS, Slaght KS. Trypanosomes of *Bufo americanus* from northern Michigan. *J Wildl Dis* 1988; 24:647-649.
- Werner JK, Walewski K. Amphibian trypanosomes from the McCormick forest, Michigan. *J Parasitol* 1976; 62:20-25.
- Wheeler WC. Iterative pass optimization of sequence data. *Cladistics* 2003; 19:254-260.
- Wheeler WC, Gladstein DS, De Laet J. POY. Version 3.0. (current version 3.0.11). Documentation by Daniel Janies and Ward Wheeler. Commandline documentation by J. De Laet and W. C. Wheeler. 2003 [updated 2003; cited]; Available from: <ftp.amnh.org/pub/molecular/poy>.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski TA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6531-6535.
- Woo PT. Sensitivity of diagnostic techniques in determining the prevalence of anuran trypanosomes. *J Wildl Dis* 1983; 19:24-26.
- Woo PT, Bogart JP. *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distribution and prevalences. *Can J Zool* 1984; 62:820-824.
- Woo PTH. Trypanosomes in amphibians and reptiles in southern Ontario. *Can J Zool* 1969; 47:981-988.
- Worthey EA, Schnauffer A, Mian IS, Stuart K, Salavati R. Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:6392-6408.
- Wright AD, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 99:69-76.

Young DG, Duncam MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera Psychodidae). Mem Amer Entomol Inst 1994; 54:1-881.

Yurchenko V, Hobza R, Benada O, Lukes J. *Trypanosoma avium*: Large minicircles in the kinetoplast DNA. Exp Parasitol 1999; 92:215-218.

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

ANEXOS

Anexo 1. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil (Publicado).

Anexo 2: A new lineage of closely related trypanosomes of anurans (Bufonidae and Leptodactylidae) and sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Brazilian Amazonia (Em preparação)

Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil

R. C. FERREIRA, M. CAMPANER, L. B. VIOLA, C. S. A. TAKATA, G. F. TAKEDA
and M. M. G. TEIXEIRA*

Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil

(Received 6 March 2007; revised 24 April 2007; accepted 25 April 2007)

SUMMARY

We examined for the presence of trypanosomes in blood samples from 259 anurans (47 species from 8 families), the majority of which were from the Brazilian Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes. Trypanosomes were detected by a combination of microhaematocrit and haemoculture methods in 45% of the anurans, and 87 cultures were obtained: 44 from Hylidae, 22 from Leptodactylidae, 15 from Bufonidae, 5 from Leiuperidae and 1 from an unidentified anuran. High morphological diversity (11 morphotypes) was observed among blood trypanosomes from anurans of different species and of the same species as well as among trypanosomes from the same individual. Conversely, morphologically similar trypanosomes were found in anurans from distinct species and biomes. ITS and SSU rDNA polymorphisms revealed high diversity among the 82 isolates examined. † Twenty-nine genotypes could be distinguished, the majority distributed in 11 groups. Phylogenetic relationships based on rDNA sequences indicated that isolates from more phylogenetically related anurans are more closely related. Comparison of anuran trypanosomes from Brazil and other countries revealed several new species among the isolates examined in this study. Phylogenetic relationships suggest that host restriction, host switching and overall ecogeographical structure may have played a role in the evolution of the anuran trypanosomes.

Key words: *Trypanosoma*, Amphibia, Anura, Amazonia, genetic polymorphism, phylogeny, evolution, ribosomal sequences, morphology.

INTRODUCTION

Amphibians belonging to the orders Anura (frogs and toads) and Caudata (salamanders) have long been known to be infected with trypanosomes. Trypanosomes in Anura were discovered in 1842 in Europe in the blood of the frog *Rana esculenta* and initially classified as *Amoeba rotatoria*. A year later, this species was denominated *Trypanosoma rotatorium* by Gruby (1843), who thus created the genus *Trypanosoma*. Anuran trypanosomes have been recorded in all continents, as reviewed by Bardsley and Harmsen (1973). After their review, new descriptions of trypanosomes in anurans in Canada and the USA (Werner and Walewski, 1976; Levine and Nye, 1977; Woo and Bogart, 1984; Barta and Desser, 1984), China and Japan (Miyata, 1978; Werner, 1993), Europe (Barta *et al.* 1989; Zickus, 2002) and Costa Rica in Central America (Desser, 2001) were published. No surveys were carried out in South

America, where trypanosomes were only incidentally mentioned in anurans in Venezuela, Colombia, Argentina, Peru and Brazil (Bardsley and Harmsen, 1973).

Low parasitaemias make microscopical detection of trypanosomes difficult in the blood of anurans. Nevertheless, anuran trypanosomes have traditionally been classified according to the morphology of a small number of blood trypanosomes, their host and geographical origin and, sporadically, the results of cross-infection experiments. Unfortunately, this approach is not supported by the extreme polymorphism of blood trypanosomes within the same anuran species from the same region or by the marked pleomorphism of life-cycle developmental forms of these parasites. Moreover, trypanosomes in anurans from distant geographical regions and distinct host species can be morphologically indistinguishable (Bardsley and Harmsen, 1973; Werner and Walewski, 1976; Reilly and Woo, 1982; Woo and Bogart, 1984; Martin and Desser 1991a; Desser, 2001; Martin *et al.* 2002). Data from natural and laboratory cross-infections suggested that some toad trypanosomes evolved through host switching from frogs to toads. However, these data also revealed a certain degree of host restriction among

* Corresponding author. Fax: +55 11 3818 7417. E-mail: mmgteix@icb.usp.br

† Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank database under the Accession numbers listed in Table 2.

anuran trypanosomes, the potential for host-switching being inversely proportional to the evolutionary distance between their hosts (Reilly and Woo, 1982; Martin and Desser, 1991*b*; Martin *et al.* 1992*a*, 2002).

Therefore, morphological, behavioural and host-parasite features render unreliable the identification of anuran trypanosomes based solely on traditional taxonomic parameters. However, before this was recognized, Diamond (1965) referred to 26 species of anuran trypanosomes in a compilation of the literature worldwide. In the largest review of amphibian trypanosomes, Bardsley and Harmsen (1973) examined 68 species of anuran trypanosomes and considered most species non-valid. They proposed guidelines for the taxonomy of these organisms that included morphology, geographical origin, vertebrate and invertebrate host species, life-cycles and biochemical features. Miyata (1978) did not take into account these guidelines and recognized 34 valid species including 6 new ones based mainly on morphology. All these reviews focused on morphology and host origin, and no consensus currently exists as to which species are valid.

Recent phylogenetic studies have revealed that anuran trypanosomes cluster together with fish trypanosomes in the 'Aquatic' clade, which comprises species that infect water vertebrates (fishes, turtles and platypus) and are thought to be transmitted by leeches, a fact favouring host switching (Stevens *et al.* 2001; Jakes *et al.* 2001; Hamilton *et al.* 2004; Gibson *et al.* 2005; Simpson *et al.* 2006). Anurans may live all or part of their lives in an aquatic environment where they may be also preyed upon by leeches (Martin and Desser, 1991*a*; Siddall and Desser, 1992). In addition, anurans are also prey to terrestrial arthropods such as sand flies and mosquitoes (Anderson and Ayala, 1968; Ayala, 1970; Desser *et al.* 1973, 1975) and to terrestrial leeches (Hamilton *et al.* 2005). The interplay of habitats, hosts and vectors makes anuran trypanosomes a unique model for evolutionary studies of trypanosomatids (Simpson *et al.* 2006).

Although anuran trypanosomes occur worldwide and have long been cultured, not many cultures are available, and most studies have included a limited set of trypanosome species, namely, *T. chattoni*, *T. fallisi*, *T. rotatorium* and *T. ranarum* from North America, *T. neveulemairei* from Europe and *T. mega* from Africa. Biochemical and molecular data for anuran trypanosomes are limited and include analysis of zymodemes (Martin *et al.* 1992*a,b*), ribo-printing (Clark *et al.* 1995), karyotyping (Lun and Desser, 1995) and RAPD patterns (Lun and Desser, 1996). Phylogenetic studies based on SSU rDNA sequences revealed that all the above species, with the exception of *T. chattoni*, which is far from the other anuran trypanosomes, were very closely related (Martin *et al.* 2002). Molecular studies showed that

the traditional taxonomy was insufficient to properly address the genetic diversity and phylogenetic relationships between anuran trypanosomes (Martin and Desser, 1990, 1991*b*; Clark *et al.* 1995; Lun and Desser, 1996; Desser, 2001; Martin *et al.* 2002). Since most trypanosome species from Anura were described on the basis of their morphology and host origin, their host-parasite and phylogenetic relationships remain far from understood, and a reliable taxonomy of these organisms is still badly needed. Dealing properly with these questions requires the collection, culturing and comparative analysis of a large number of trypanosomes from anuran of distinct species and geographical origins. In light of this, the aims of the present study were (a) to estimate the occurrence of trypanosomes in the blood of anurans from different Brazilian biomes; (b) to evaluate the morphological diversity of blood and culture forms; (c) to assess the molecular diversity of these trypanosomes by analysing the polymorphisms of their ITS ribosomal sequences and (d) to infer phylogenetic relationships between anuran trypanosomes from Brazil and other countries by analysis of ITS1 and SSU ribosomal sequences.

MATERIALS AND METHODS

Capture and identification of anurans

In this paper we report on the presence of trypanosomes in anurans captured during different seasons in the period 2000 to 2005 in the following Brazilian biomes separated by large geographical distances (the regions in Brazil and the states and cities within the biomes in which the anurans were collected are given in parentheses): Amazonia (AM) (northern region, Rondonia state, Monte Negro); Atlantic Forest (AF) (southeast region, São Paulo, São Paulo, Guarulhos and Biritiba Mirim); Pantanal (PA), wetland (central region, Mato Grosso do Sul, Miranda); and Guaporé (GU), a transition region between the Cerrado and Amazonia (western Brazil, Mato Grosso, Pontes de Lacerda). Four anuran specimens from Cerrado (CE), tropical savanna (southeast region, São Paulo, Rio Claro) captured by Dr Carlos Jared (Butantan Institute, São Paulo, Brazil) were also examined (Fig. 1, Table 1). Anuran captures were performed according to IBAMA (The Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources) recommendations with the collaboration of Dr Miguel T. Rodrigues (Department of Zoology, University of São Paulo, Brazil), who also identified and deposited the captured specimens in the Museum of Zoology of the University of São Paulo. The taxonomy of anurans was recently revised according to Frost (2006). The present report is only concerned with the occurrence of trypanosomes in anurans and their

Fig. 1. Geographical origin of Brazilian isolates of anuran trypanosomes. The cities and states within the biomes in which the anurans were collected are: Monte Negro (■), Rondonia in Amazonia; Miranda (□), Mato Grosso do Sul in Pantanal; Mato Grosso; Pontes de Lacerda (△) in Guaporé; São Paulo, Guarulhos and Biritiba Mirim (○) in São Paulo in Atlantic Forest; and Rio Claro (◇), São Paulo in Cerrado.

characterization and was neither planned nor intended to reflect the composition of anuran fauna in any of the regions studied.

Blood survey, isolation in culture and morphology of anuran trypanosomes

The anurans captured were bled by heart puncture using sodium citrate as anticoagulant, and the blood samples examined for the presence of trypanosomes using the microhaematocrit (MH) and haemoculture (HC) methods. In animals captured in Guaporé, part of the anurans from Atlantic Forest, and several hylids from other biomes, the blood was not examined by MH because of the very small blood sample obtained and/or the lack of infield facilities. Haemocultures were performed by inoculating 0.2–0.5 ml of blood in Vacutainer tubes containing a biphasic medium consisting of 15% rabbit red blood cells mixed with 4% Blood Agar Base (DIFCO) overlaid with liquid LIT medium supplemented with 10% FBS. Cultures were maintained in this medium with incubation at 25 °C and expanded for DNA preparation and cryopreservation in liquid N₂. Some positive HCs could not be propagated despite attempts with different media and culture conditions. The culture codes and the anuran hosts and geographical origins are given in Table 2. For morphological analysis, glass-slide smears of the

blood from anurans and of the cultures were fixed with methanol and stained with Giemsa.

PCR amplification of ITS1 and SSU rDNA, restriction analysis, sequencing and data analysis

Genomic DNA was extracted from cultured trypanosomes by the classical phenol-chloroform method. The oligonucleotides employed for PCR amplifications of whole ITS rDNA (ITS1/5.8S/ITS2), ITS1 rDNA and the V7–V8 regions of SSU rDNA have been described before (Maia da Silva *et al.* 2004; Rodrigues *et al.* 2006). The PCR-amplified products of SSU and whole ITS genes were cloned, and at least 3 clones from each gene and isolate were sequenced. Length polymorphism of whole ITS rDNA and ITS1 rDNA and restriction site polymorphisms of ITS rDNA digested with *Hinf* I or *Rsa* I enzymes were analysed on 2% agarose gels.

Sequences were aligned using ClustalX and the alignment obtained was refined manually. There are no ITS rDNA sequences from anuran trypanosomes deposited in GenBank. ITS rDNA sequences of other trypanosome species were not included in the analysis due to unreliable alignments. Phylogenetic inferences were assessed by the Parsimony (P) and Bayesian (B) methods. Analysis was conducted in PAUP* v4b10 via 100 random-addition sequence replicates followed by a branch swap (RAS-TBR).

Table 1. Host and biomes of Brazilian anurans examined in this study

(Trypanosome infection determined by MH and HE methods, isolates obtained in culture, and morphotypes associated to trypanosomes observed in blood of anurans.)

Host species of origin			Geographical origin of anurans ^a No. of individuals: examined\positive ^b						No. of isolates in culture ^c	Morpho- type ^d
Family	Genus	Species	AF	AM	PA	GU	CE	Total		
Bufonidae	<i>Chaunus</i>	<i>ornatus</i>	2\1					2\1	0	
		<i>granulosus</i>		1\0				1\0	0	
		<i>ictericus</i>	20\2					20\2	2	11
		<i>marinus</i>		9\3				9\3	2	1, 3, 5, 6
		<i>schneideri</i>	1\1		20\8	1\0		22\9	6	11
		<i>guttatus</i>		5\0		1\1		6\1	1	
Centrolenidae	<i>Rhaebo</i>	<i>margaritifera</i>		12\5		2\0		14\5	4	2, 3
	<i>Rhinella</i>	<i>eurynathum</i>	2\0					2\0	0	
Hylidae	<i>Hyalino-</i>	<i>batrachium</i>								
	<i>Aplastodiscus</i>	<i>leucopygius</i>	10\3					10\3	2	
	<i>Bokermannohyla</i>	<i>circumdata</i>	6\5					6\5	3	
		<i>hylax</i>	1\0					1\0	0	
	<i>Dendropsophus</i>	<i>berthaultzae</i>	3\0					3\0	0	
		<i>leucophyllatus</i>		1\0				1\0	0	
		<i>microps</i>	4\0					4\0	0	
		<i>nanus</i>			1\0			1\0	0	
	<i>Hypsiboas</i>	<i>albomarginatus</i>	2\2					2\2	1	
		<i>bischoffi</i>	13\6					13\6	6	
		<i>boans</i>		3\3		3\3		6\6	3	9, 10
		<i>faber</i>	2\2					2\2	2	7, 9
		<i>geographicus</i>		2\0		1\1		3\1	1	
		<i>prasinus</i>	3\2					3\2	2	
		<i>punctatus</i>			1\1			1\1	1	
		<i>raniceps</i>			4\2	5\5		9\7	5	8, 9, 10
	<i>Itapotihyla</i>	<i>langsdoerffii</i>	1\1					1\1	1	
	<i>Scinax</i>	<i>acuminatus</i>			3\2			3\2	2	
		<i>fuscovarius</i>				2\0		2\0	0	
		<i>hayii</i>	2\2					2\2	2	9
		<i>nebulosus</i>				1\0		1\0	0	
		<i>perpusillus</i>	1\0					1\0	0	
		<i>ruber</i>		4\1				4\1	1	9
	<i>Osteocephalus</i>	<i>taurinus</i>				1\1		1\1	1	
		sp		1\1				1\1	1	9
	<i>Phyllomedusa</i>	<i>hypochondrialis</i>				1\0		1\0	0	
		sp		3\2		1\1		4\3	2	9
		<i>tomopterna</i>		2\1				2\1	0	
	<i>Sphaenorhynchus</i>	sp	1\0					1\0	0	
	<i>Trachycephalus</i>	<i>venulosus</i>			16\12	1\1		17\13	8	8, 10
Brachycephalidae	<i>Eleutherodactylus</i>	<i>binotatus</i>	2\0					2\0	0	
		<i>fenestratus</i>		2\1				2\1	0	
		<i>guentheri</i>	2\0					2\0	0	
		<i>zeuctotylus</i>		5\1				5\1	0	
	<i>Hylodes</i>	<i>phyllodes</i>	3\0					3\0	0	
Leptodactylidae	<i>Leptodactylus</i>	<i>chaquensis</i>			23\22	2\1		25\23	19	2, 3, 4, 8, 9, 10
		<i>knudseni</i>		1\0				1\0	0	
		<i>labyrinthicus</i>					4\2	4\2	2	3, 8, 10
		<i>pentadactylus</i>		1\1				1\1	1	3
		<i>stenodema</i>		1\0				1\0	0	
	<i>Engystomops</i>	<i>petersi</i>		10\6				10\6	5	3
Leiuperidae	<i>Physalaemus</i>	<i>moreirae</i>	1\0					1\0	0	
		sp	1\0					1\0	0	
Cycloramphidae	<i>Proceratophrys</i>	<i>boiei</i>	6\0					6\0	0	
Microhylidae	<i>Ctenophryne</i>	<i>geayi</i>		3\1				3\1	0	
ND	ND	ND	1\0	9\1				10\1	1	
Total	21	48	90\27	75\27	68\47	22\14	4\2	259\117	87	

^a Geographical origin of anurans: AF, Atlantic Forest; AM, Amazonia; PA, Pantanal; GU, Guaporé; CE, Cerrado.^b Number of anuran specimens examined for the presence of trypanosome by a combination of MH and HE methods.^c Isolates obtained from the hemocultures of anuran blood samples that propagated in culture and were cryopreserved.^d Morphotype: distinct trypanosome forms observed in Giemsa-stained smears of anuran blood samples (Fig. 2).

Gaps were treated as fifth state and branches whose minimum length was zero were collapsed. Bootstrap analysis (100 replicates) was done using the same parameters described for the searches including only informative characters. Distance matrices were generated using uncorrected *p*-distance. Bayesian analysis was done using MrBayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Tree searches employed GTR plus gamma and proportion of invariable sites. The first 25% of the trees from 100 000 generations were discarded as burn in.

To infer phylogenetic relationships between anuran trypanosomes from Brazil and those from other countries, ~750 bp of SSU rDNA corresponding to the V7–V8 variable region plus the conserved flanking region were identified in this study and aligned with sequences from the following anuran trypanosomes from GenBank (Accession number): *T. rotatorium* (B2-II) (AJ009161); *T. neveulemairei* (AF119809); *T. mega* (AJ223567); *T. fallisi* (AF119806); *T. ranarum* (AF119810); and *T. chattoni* (AF119807). *T. therezieni* (AJ223571) from *Chamaeleo brevicornis*, which clustered with anuran trypanosomes, was also included. The following sequences of trypanosomes from fish were used as outgroup for anuran trypanosomes (Hamilton *et al.* 2004): *T. boissoni* (U39580); *T. sp.* CLAR (AJ620555); *T. granulosum* (AJ620552) and *T. triglae* (U39584). In addition, *T. sp.* K&A from aquatic leech (AJ009167); *T. binneyi* from platypus (AJ620565) and *T. chelodinae* from aquatic turtle (AF297086), which clustered with fish trypanosomes, were also included in the alignment. Alignments used in this study are available from the authors upon request.

RESULTS

Occurrence of trypanosomes in anurans

Detection of trypanosomes by MH yielded 48 positive individuals out of 124 examined (39%) whereas HC yielded 111 positive individuals out of 259 (43%) (Table 1). Positive haemocultures were obtained from both MH-positive and MH-negative individuals. The overall prevalence of blood trypanosomes in anurans assessed by the combination of the two methods was 45% (117 of 259). Of the 117 positive animals, 100 belong to 48 nominal species, 7 had only been identified at the generic level at the time this study was carried out, and 10 remained unidentified (Table 1). The prevalence (%), the number of positive individuals (+), the total number of individuals examined (N) and the total number of anuran species recovered (S) in the different biomes were, respectively, 69% (+47, N 68, S 7) in the Pantanal; 64% (+14, N 22, S 12) in Guaporé; 36% (+27, N 75, S 17) in Amazonia; 30% (+27, N 90, S 21) in the Atlantic Forest; and 50% (+2, N 4, S 1) in Cerrado (Table 1). The percentage of different anuran species infected

by trypanosomes was highest in the PA (86%), followed by Amazonia (65%), Guaporé (58%) and the Atlantic Forest (52%). The occurrence of trypanosomes in the anuran families examined was 28% (+21, N 74, S 6) in Bufonidae; 57% (+60, N 106, S 26) in Hylidae; 81% (+26, N 32, S 5) in Leptodactylidae; 18% (+2, N 11, S 4) in Brachycephalidae; 50% (+6, N 12, S 2) in Leiuperidae; and 33% (+1, N 3, S 1) in Microhylidae (Table 1).

Different trypanosome infection indices were found among anuran of distinct species independent of their family, namely, 92% for *Leptodactylus chaquensis* (Leptodactylidae); 77% for *Trachycephalus venulosus* (Hylidae); 60% for *Engystomops petersi* (Leiuperidae); 46% for *Hypsiboas bischoffii* (Hylidae); 41% for *Chaunus schneideri* (Bufonidae); 36% for *Rhinella margaritifera* (Bufonidae); 30% for *Aplastodiscus leucopygius* (Hylidae), and 10% for *Chaunus ictericus* (Bufonidae). Only species for which more than 10 individuals were examined are mentioned.

Morphology of blood trypanosomes

Microhaematocrit analysis revealed that most anurans had low parasitaemias, with few trypanosomes found in Giemsa-stained blood smears or even in smears of buffy-coat layers from MH capillaries. Microscopy revealed trypanosomes that varied greatly in size and shape not only between distinct anuran species but also between individuals of the same species and even within the same individual. On the other hand, very similar trypanosomes were found infecting anurans of distinct species from the same or different families (Fig. 2).

Comparison of the main morphological features of Giemsa-stained blood trypanosomes, including shape, size, kinetoplast position and features of the nucleus and undulating membrane, revealed at least 11 major morphotypes (M1 to M11) separable in 2 groups (I and II), as shown by the selected photomicrographs in Fig. 2. In addition to the major 11 morphotypes, unusual forms represented by a very small number of individuals and not associated with a particular species were also found in blood samples (data not shown). Whenever possible, morphotypes were associated with previously described species of anuran trypanosomes, but despite careful analysis of drawings and photomicrographs in the literature, association of the morphotypes described here with reported species was very often a particularly difficult and highly subjective task (Diamond, 1965; Bardsley and Harmsen, 1973; Miyata, 1978; Reilly and Woo, 1982; Woo and Bogart, 1984; Barta and Dessler, 1984; Werner, 1993; Dessler, 2001).

A greater number of group I trypanosomes than group II trypanosomes was detected in blood samples, indicating a higher parasitaemia for this type of trypanosome in the anurans examined.

Table 2. Host and geographical origin of anuran trypanosome isolates obtained in this study

(Genotyping by polymorphisms of ITS rDNA and morphotypes of blood trypanosomes from their respective anuran of origin.)

Host species		Isolate TryCC ^a	Geographical origin ^b	Length of ITS rDNA ^c		Genotype ^d	Morpho- type ^e	GenBank Accession numbers	
Family	Species			wITS	ITS1			ITS1rDNA	SSUrDNA
Buf.	<i>C. marinus</i>	364	AM	760 & 700	(180) 190 & 250	A1		EF457247-50	EF457295
	<i>R. margaritifera</i>	367	AM	760 & 700		A1			
	<i>R. margaritifera</i>	399	AM	760 & 700		A1	3		
Lep.	<i>L. pentadactylus</i>	398	AM	760 & 700		A1	3		
	N.D.	365	AM	760 & 700		A1			
Lei.	<i>E. petersi</i>	401	AM	760 & 700		A1	3		
	<i>E. petersi</i>	402	AM	760 & 700		A1			
	<i>E. petersi</i>	405	AM	760 & 700		A1	3		
	<i>E. petersi</i>	408	AM	760 & 700		A1	3		
Buf.	<i>C. marinus</i>	339	AM	780 & 730	(210) 210 & 280	A2	1, 3, 5, 6	EF457244-46	EF457294
Hyl.	<i>B. circumdata</i>	933	AF	990	290	B			
	<i>H. bischoffi</i>	932	AF	990		B			
	<i>H. bischoffi</i>	944*	AF	990		B			
Buf.	<i>C. ictericus</i>	858	AF	1020	(287)	C1	11	EF457266-69	EF457290
	<i>C. ictericus</i>	868	AF	1020		C1	11		
	<i>C. schneideri</i>	311	PA	1020		C2		EF457263-65	EF457289
	<i>C. schneideri</i>	322	PA	1020	(293)	C2			
Hyl.	<i>C. schneideri</i>	325	PA	1020		C2			
	<i>C. schneideri</i>	441	PA	1020		C2	11		
	<i>C. schneideri</i>	598	AF	1020		C2			
	<i>S. hayii</i>	645*	AF	1020		C3	9		
	<i>B. circumdata</i>	287*	AF	1020		C4			
	<i>H. faber</i>	641	AF	1020		C4	7		
	<i>H. faber</i>	950*	AF	1020		C4			
	<i>A. leucopygius</i>	288	AF	1020		C4			
	<i>I. langsdorffii</i>	644	AF	1020	320	C4			
	<i>L. chaquensis</i>	324	PA	1020		C5			
	<i>L. chaquensis</i>	439	PA	1020		C5	10		
	<i>L. chaquensis</i>	440	PA	1020		C5	8		
Lep.	<i>L. chaquensis</i>	443	PA	1020		C5			
	<i>L. chaquensis</i>	445	PA	1020		C5			
	<i>L. chaquensis</i>	446	PA	1020		C5	8		
	<i>L. chaquensis</i>	447	PA	1020		C5	4, 8, 10		
	<i>L. chaquensis</i>	966	PA	1020		C5			
	<i>H. bischoffi</i>	282*	AF	1070		D1			
	<i>H. prasinus</i>	290	AF	1070		D1			
	<i>R. margaritifera</i>	346	AM	1070	(262) 280	D2		EF457255-58	EF457292
	<i>R. margaritifera</i>	362	AM	1080	(266) 280	D3		EF457259-62	EF457293
	<i>L. chaquensis</i>	317	PA	1090		E			
Lep.	<i>L. chaquensis</i>	327	PA	1090		E			
	<i>L. chaquensis</i>	436*	PA	1090		E	8, 10		
	<i>L. chaquensis</i>	444	PA	1090	(305) 330	E	10	EF457270-73	EF457288

Hyl.	<i>H. boans</i>	616	GU	1100		F			
	<i>Osteocephalus</i> sp	357	AM	1100	270	F	9		
Lep	<i>L. labyrinthicus</i>	920	CE	1120	350	U1	3		
Lei.	<i>E. petersi</i>	407	AM	1130		G1	3		
Hyl.	<i>S. hayii</i>	660	AF	1130	370	G2			
	<i>S. ruber</i>	406	AM	1150	310	U2	9		
Lep.	<i>L. labyrinthicus</i>	928	CE	1160		H1	8, 10		
Hyl.	<i>O. taurinus</i>	614	GU	1160	370	H2			
	<i>T. venulosus</i>	448*	PA	1160		H3	8		
	<i>T. venulosus</i>	457	PA	1160		H3			
	<i>H. boans</i>	617	GU	1200		I1	9, 10		
	<i>H. bischoffi</i>	291*	AF	1200	440	I2			
	<i>H. albomarginatus</i>	647	AF	1260		J1			
	<i>A. leucopygius</i>	646	AF	1260	(402)	J1		EF457278-80	EF457285
	<i>H. bischoffi</i>	939	AF	1260		J1			
	<i>H. boans</i>	615*	GU	1260		J2			
	<i>H. geographicus</i>	612	GU	1260		J2			
	<i>H. punctatus</i>	304	PA	1260		J2			
	<i>H. raniceps</i>	618	GU	1260		J2			
	<i>H. raniceps</i>	613	GU	1260		J2			
	<i>H. raniceps</i>	619	GU	1260		J2			
	<i>H. raniceps</i>	622*	GU	1260		J2			
	<i>T. venulosus</i>	305	PA	1260	(401)	J2		EF457281-84	EF457286
	<i>T. venulosus</i>	620*	GU	1260		J2			
	<i>T. venulosus</i>	313	PA	1260		J2			
	<i>Phyllomedusa</i> sp	400	AM	1260		J2	9		
	<i>Phyllomedusa</i> sp	358	AM	1260	440	J2			
	<i>S. acuminatus</i>	442	PA	1260		J2			
	<i>S. acuminatus</i>	321	PA	1260		J2			
	<i>T. venulosus</i>	334	PA	1260		J3			
	<i>T. venulosus</i>	465	PA	1260		J3			
	<i>H. raniceps</i>	467	PA	1260		J4	8, 9, 10		
	<i>T. venulosus</i>	315	PA	1260	(385)	J4		EF457274-77	EF457287
	<i>H. bischoffi</i>	653	AF	1380	600	U3			
	<i>H. prasinus</i>	934*	AF	1420 & 1070	520 & 330	U4			
Lep.	<i>L. chaquensis</i>	306	PA	1460		K			
	<i>L. chaquensis</i>	316	PA	1460	(570) 580	K	2, 4, 8	EF457251-54	EF457291
	<i>L. chaquensis</i>	326	PA	1460		K	3, 8, 10		
	<i>L. chaquensis</i>	449	PA	1460		K	8		
	<i>L. chaquensis</i>	492	PA	1460		K	8		

^a Cultures of anuran trypanosomes are cryopreserved in the Trypanosomatid Culture Collection of the Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. TryCC correspond to number codes of isolates cryopreserved in this collection.

^b Geographical origin (biomes) of anurans from which cultures were isolated: AM, Amazonia; AF, Atlantic Forest; PA, Pantanal; GU, Guaporé; CE, Cerrado.

^c Length in base pairs (bp) of PCR-amplified whole ITS (wITS) or ITS1 rDNA sequences determined by separation in agarose gel (approximated length) or by sequencing (in parentheses).

^d Groups (A–K) and genotypes (indicated by letters and numbers) defined by length and sequencing polymorphism of ITS and SSU rDNA sequences; U, unique genotypes; * Mixed cultures.

^e Morphotypes (M) of trypanosomes found in blood smears of anurans from which cultures were obtained. Anuran families: Buf, Bufonidae; Lep, Leptodactylidae; Lei, Leiuperidae; Hyl, Hylidae.

Fig. 2. Photomicrographs selected to illustrate the morphological diversity of trypanosomes found in blood smears (Giemsa stained) of Brazilian anurans, which are distributed in 2 major groups (I and II) comprising 11 morphotypes (M1–M11): Group I, elongated trypomastigotes with pointed ends observed in Bufonidae (M1, M2, M3, M5 and M6), Leiuperidae (M3) and Leptodactylidae (M2, M3, M4), and Group II, leaf-shaped, rounded or elliptical trypanosomes found mostly in Hylidae (M7, M8, M9, M10) and Leptodactylidae (M8, M9, M10). Morphotypes associated with previously described species of anuran trypanosomes are: M1 (*T. bocagei*-like); M3 (*T. leptodactily*-like); M5 (*T. fallisi*-like); M7 (*T. loricatum*-like); M8 (*T. rotatorium*-like), M10 (*T. chattoni*-like); and M11 (*T. tsunetzomiytai*-like). k, Kinetoplast; f, flagellum; n, nucleus.

Group I morphotypes were observed in Bufonidae (M1, M2, M3, M5 and M6), Leiuperidae (M3) and Leptodactylidae (M2, M3, M4) whereas group II morphotypes were found mostly in Hylidae (M7, M8, M9, M10) and Leptodactylidae (M8, M9, M10). Interestingly, morphotypes found in Bufonidae were not found in Hylidae and group II

morphotypes were reported in North American ranids and bufonids (Bardsley and Harmsen, 1973).

Group I comprises elongated trypomastigotes with pointed ends, which were separated into 6 morphotypes (M1–6), of which only 3 were associated with a previously described species: M1 (*T. bocagei*-like that is similar to *T. bufophlebotomi*), large and

wide forms with central nucleus and kinetoplast, conspicuous undulant membrane and long free flagellum; M2, the thinnest trypomastigotes, with the kinetoplast at the end of a posterior extremity, long free flagellum and slight undulant membrane; M3 (*T. leptodactily*-like), with S-like or roll-shaped bodies with conspicuous, many-folded undulating membranes and the kinetoplast at the posterior extremity; M4, slender trypanosomes with serpentine bodies and small undulating membranes; M5 (*T. fallisi*-like), the largest and widest trypomastigotes with many longitudinal striations and large nucleus at the posterior extremity; and M6, the smallest forms, with a well-developed undulating membrane and rounded posterior end (Fig. 2).

Group II is formed by leaf-shaped, rounded or elliptical trypanosomes distributed in 5 morphotypes: M7 (*T. loricaum*-like), flagellates with elliptical, broad and costate bodies, spherical nucleus, and many-folded undulating membranes without a free flagellum; M8 (*T. rotatorium*-like), forms with wide and large bodies, fusiform nucleus, conspicuous undulating membranes and a short free flagellum; M9 (probably *T. rotatorium*-like), small dark-staining forms with a rounded anterior end and a small free flagellum; M10 (*T. chattoni*-like), trypanosomes with largest and irregular rounded bodies with clear borders, a central small and spherical nucleus with the kinetoplast appended to it, without undulating membranes; and M11 (*T. tsunetzomiytai*-like), forms similar to *T. chattoni* but with small spherical bodies, clear and regular borders.

The same anuran species had a maximum of 3 morphotypes (Fig. 2; Table 1). Exceptions were *Leptodactylus chaquensis* and *Chaunus marinus*, which had 6 and 4 morphotypes, respectively, although no more than 4 morphotypes were observed in the same animal. Some morphotypes were detected in only 1 anuran species: for example, M1, M5 and M6 in *Chaunus marinus*, M7 in *Hypsiboas faber* and M4 in *Leptodactylus chaquensis* (Fig. 2; Table 1).

Isolation in culture of anuran trypanosomes and morphology

Trypanosomes could be observed after approximately 10 days in most haemocultures. In recent cultures, the flagellates multiplied as small round bodies known as spheromastigotes, which often clustered into rosettes (Fig. 3I, M, N). After a few days, the flagellates began to elongate while the rosettes disintegrate, releasing free epimastigotes (Fig. 3I, M). Multiplication occurs by either binary and/or multiple divisions. Like the blood forms, the cultured forms of anuran trypanosomes showed high polymorphisms both among and within cultures. Although the cultures were not cloned, it was found by means of molecular analysis that most pleomorphic cultures probably consisted of only 1 isolate,

except for a few mixed samples disclosed by ITS rDNA analysis (Fig. 4). Some cultures shared morphological features while others exhibited unique and peculiar morphologies (Fig. 3). Epimastigotes varied in body shape and size, in the length and width of the body, and in the size and position of the nucleus and kinetoplast, in the development of the undulating membrane and in the length of the free flagellum. While the kinetoplast in all the different blood morphotypes is always very small (Fig. 2), in the cultured epimastigotes it varies considerably in size and position (Fig. 3A, B). A few cultures had very large, slender and pointed epimastigotes, with the kinetoplast positioned far from the nucleus (Fig. 3A). Most cultures had smaller epimastigotes with slender (Fig. 3B, E, K, L), wide (Fig. 3C, D, F) or short (Fig. 3G, H, J) predominant forms. A small number of trypomastigote forms, all of which were distinct from blood trypomastigotes, could be observed in stationary-phase cultures; these included large and wide forms with a very well-developed undulant membrane (Fig. 3O, P) and very small trypomastigote forms (Fig. 3Q, R).

Genetic diversity among anuran trypanosomes evaluated by ITS rDNA length and restriction polymorphisms

Analysis of length polymorphism of amplified whole ITS rDNA or ITS1 rDNA disclosed high diversity among the 82 trypanosomes examined, which were isolated from 25 anuran species, but did not allow phylogenetic relationships to be inferred. Amplified fragments ranged from ~700 to 1460 bp for wITS (whole ITS) and from ~180 to 600 bp for ITS1 (Fig. 4, Table 2). To evaluate the polymorphism within the groups, isolates were analysed by restriction patterns of amplified wITS. Length and restriction site polymorphisms of the ITS rDNA revealed high genetic diversity among the 82 isolates examined. Together, length, restriction and sequence polymorphisms permitted most isolates to be distributed into 11 major groups (A–K). Some isolates showed 2 amplified fragments, suggesting mixed infections (Fig. 4, Table 2). Polymorphisms of ITS rDNA, together with sequence polymorphisms of SSU rDNA sequences, from 11 selected isolates presenting different genotypes representative of 6 groups disclosed high genetic variability, with at least 29 distinguishable genotypes. Most isolates, representing 25 genotypes distributed in 11 major groups, each group comprising isolates that shared genotypes and morphological features in cultures. Four isolates showed unique and ungrouped genotypes (U1 to U4) (Fig. 4, Table 2). Some considerations regarding the distribution of genotypes among the anuran families deserve to be mentioned. Firstly, there appears to be a consistent association between trypanosome genotype and anuran family, with trypanosome genotypes

Fig. 3. Photomicrographs illustrative of the morphological diversity of culture forms (Giemsa stained) of isolates from Brazilian anurans. Logarithmic-phase culture epimastigote forms varying in body shape and size, length of free flagellum and in size and position of kinetoplast, with the following predominant body forms: large and slender (A); of medium size and slender (B, E, K, L); of medium size and wide (C, D, F); and small (G, H, J). Stationary-phase cultures showing large and wide (O, P) and very small (Q, R) trypomastigote forms. The following cultures of anuran isolates are represented: A, 322; B, 858; C, 367; D, 346; E, 339; F, 321; G, 316; H, 407; I, 444; J, 315; K, 291; L, 357; M, 316; N, 287; O, 448; P, 620; Q and R, 321. k, Kinetoplast; f, flagellum; n, nucleus.

C1 and C2 found in Bufonidae and genotypes B, C4, D1, F, H3 and J1–J4 found in Hylidae. There also appears to be a consistent association between some anuran species and certain genotypes such as *Leptodactylus chaquensis* and genotypes C5, E and K; *Chaunus ictericus* and genotype C1; *Chaunus schneideri* and genotype C2; and *Trachycephalus venulosus* and genotypes J3 and H3. This may suggest the existence of a certain degree of host-restriction between anuran species and their trypanosomes. However, isolates of group A occurred in Bufonidae, Leptodactylidae and Leuperidae and some anurans harboured more than 1 distinct genotype, as is the case of *Leptodactylus chaquensis* (3 genotypes), *Hypsiboas bischoffii* (5) and *Trachycephalus venulosus* (4) (Fig. 4). Thus, these data indicate that if host

restriction does indeed exist, it is not an absolute axiom for anuran trypanosomes, as some genotypes are shared by more than 1 species of different genera and sporadically by species from distinct families of anurans.

The distribution of the trypanosome genotypes in the different biomes deserves some considerations. Some genotypes, in addition to having a host-family association, were found in only 1 biome. Thus, all trypanosomes of genotype A (from bufonids, leptodactylids and leiuperids) are from Western Amazonia; trypanosomes of genotypes B, C4, D1 and J1 (hylids) and C1 (bufonids) are all from the Atlantic Forest; trypanosomes of genotypes C5, E and K (leptodactylids) and H3 and J3–4 (hylids) are from the Pantanal. Exceptions were some genotypes

Fig. 4. Analysis of length and restriction site polymorphism of trypanosome isolates from Brazilian anurans. PCR-amplified wITS rDNA (A) and ITS1 rDNA (B) sequences from 17 selected isolates plus *T. mega* to illustrate the high degree of polymorphism among the anuran trypanosomes. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PCR-amplified wITS rDNA (C) digested with the restriction enzymes *Hinf* I (D) or *Rsa* I (E). Agarose gels (2%) stained with ethidium bromide. M, molecular marker (1 kb).

of hyliid trypanosomes: J2, from Amazonia, Guaporé and the Pantanal, and F, from Amazonia and Guaporé. It must be remembered, however, that Amazonia and the Atlantic Forest are biomes separated by a very large geographical distance and that there is a high level of endemism among anuran species living in these biomes. In contrast, the Pantanal is located between these biomes and shelters anurans from Amazonia and the Atlantic Forest, and Guaporé is a small transition area between Amazonia and the Pantanal in which anuran fauna consists of species from both these biomes (Table 2).

Phylogenetic relationships among Brazilian anuran trypanosomes using ITS1 rDNA sequences

To infer the phylogenetic relationships among anuran trypanosomes ascribed to different genotypes, we selected 11 genotypes from 8 groups to compare their ITS1 and SSU rDNA sequences (Table 2). The high heterogeneity of ITS1 sequences detected is in accordance with the ITS1 length polymorphism and with the polymorphisms on restriction profiles of wITS rDNA (Fig. 4, Table 2). Analysis of ITS1 aligned sequences disclosed large blocks of deletions and insertions in addition to regions with numerous substitutions and few blocks of conserved sequences

(data not shown). Altogether, ITS rDNA sequences from the 11 isolates shared only 47% ITS1 sequence similarity, with divergences ranging from ~80% to 4.2% among the isolates. Besides significant sequence divergence among the isolates, considerable divergence was also observed among the 3 or 4 cloned sequences of ITS1 rDNA from the same isolate, with divergences ranging from 0.0% (isolate 316, 346, 362) up to 9.2% (isolate 339). However, sequences from the same isolate clustered together despite divergences, indicating that they belong to the same isolates and are not sequences from mixed cultures. Dendrograms of ITS1 sequences segregated the isolates into the following 3 major clusters: An01 (average sequence divergence of ~28.3%); An02 (~40.0%); and An03 (~37%). Very similar branching patterns resulted using the Parsimony (Fig. 5) and the Bayesian (data not shown) methods.

Cluster An01 comprises 4 flagellates: 3 are tightly clustered isolates of hyliids from the Atlantic Forest (isolate 646) and Pantanal (305 and 315), while 1 is an isolate of a leptodactylid from the Pantanal (444). Cluster An02 grouped 5 isolates: 2 from bufonids (isolates 322 and 858) from the Pantanal and Atlantic Forest, respectively, 2 tightly clustered bufonid isolates (346 and 362) from Amazonia, in addition to more distant isolate 316 of a leptodactylid from the Pantanal. Cluster An03 consisted of 2 bufonid

Fig. 5. (A) Unrooted dendrogram based on Parsimony analysis of 41 cloned ITS1 sequences from 11 isolates (3 to 4 clones from each isolate) of Brazilian anuran trypanosomes. The numbers at nodes correspond to percentage of bootstrap values derived from 100 replicates. (B) Matrix of average sequence divergence among anuran trypanosomes clustered in An01, An02 and An03 clades. Range given in parentheses. Length of 4 most parsimonious trees: 941 steps. Length of strict consensus: 942 steps; CI=0.87; RI=0.97.

isolates (364 and 339) from Amazonia (Fig. 5B). Although leptodactylid isolates were clustered in clades An01 and An02, their sequences were the most divergent within each clade, suggesting distant relationships of leptodactylid trypanosomes with both hylid and bufonid trypanosomes.

Phylogenetic inferences among anuran trypanosomes from Brazil and other countries using SSU rDNA sequences

To infer the phylogenetic positioning of Brazilian anuran trypanosomes in relation to anuran trypanosomes from other countries, comparative analysis was performed using partial SSU rDNA sequences from the 11 selected isolates and sequences available on GenBank from trypanosomes of exotic anurans. All the analyses corroborated the clustering of all the anuran trypanosomes and indicated the position of fish trypanosomes as a basal group for the anuran clade. The branching pattern of the phylogenetic trees showed very similar topologies in both Parsimony (Fig. 6A) and Bayesian (data not shown) analysis. Analysis based on SSU rDNA sequences

confirmed the phylogenetic relationships inferred by ITS1 sequence analysis, with the isolates also segregating in the 3 main clades: An01, An02 and An03. Clades An01 (divergence ranging from 0.4% to 1.4%), and An02 (0.0% to 3.0% divergence), clustered together (99% bootstrap) and shared ~94.8% similarity (Fig. 6B). All the Brazilian isolates separated from most species of exotic trypanosomes (Fig. 6A). *T. chattoni* was the closest to the Brazilian isolates despite high divergence (12.39–14.95%) and was positioned close to clade An03, which consisted of 2 bufonid isolates from Amazonia (2.3% divergence). Anuran trypanosomes from North America (*T. fallisi*, *T. ranarum*, *T. rotatorium*), Europe (*T. neveulemairei*) and Africa (*T. mega*) clustered together (100% bootstrap) in clade An04 despite significant divergence (15.3%). The divergence separating Brazilian isolates from the exotic isolates in clade An04 ranged from 19.2 to 19.9% (Fig. 6B).

Brazilian isolates showed significant sequence polymorphism in the V7–V8 region of the SSU rDNA (5.7% average divergence). Because the V7–V8 SSU rDNA sequences were very conserved compared with the highly polymorphic ITS1 sequences, only 8 of the 11 isolates distinguished by ITS rDNA polymorphism were separated by significant SSU rDNA sequence divergence. Trypanosomes from the same or from very closely related anuran species showed identical or very similar SSU rDNA sequences. This was true for (a) isolates 322 (genotype C2) and 858 (C1) respectively from the bufonids *Chaumus schneideri* and *Chaumus ictericus*, which shared 100% and ~93% SSU and ITS1 sequence similarity, respectively; (b) isolates 346 (D2) and 362 (D3) both from the bufonid *Rhinella margaritifera* (99.9% and ~96% SSU and ITS1 similarity, respectively) and (c) isolates 364 (A1) and 339 (A2) from the bufonid *Chaumus marinus* (97.7% and ~91% SSU and ITS similarity, respectively).

DISCUSSION

Anuran trypanosomes represent the largest known assemblage of trypanosomes among vertebrate orders (Bardsley and Harmsen, 1973). However, their taxonomy was largely built on the proven insufficient criteria of morphology and host origin, with studies including molecular markers being relatively scarce (Clark *et al.* 1995; Martin *et al.* 1992a,b; Lun and Desser, 1995, 1996). As a result, trypanosomes that probably belong to the same species have been classified in separate ones, leading to a profusion of species. Similarly, distinct species may have been considered as a single species merely because the trypanosomes come from the same host and/or are morphologically indistinguishable. The use of unreliable taxonomic parameters over a long period caused considerable confusion and prevented correct appraisal of the taxonomy, biology, diversity and

Fig. 6. (A) Phylogenetic tree inferred by Parsimony analysis of partial SSU rDNA sequences (~725 bp of V7–V8 regions) of trypanosomes from Brazil (BR), Africa (AFr), North America (NA) and Europe (EU) from anurans of the families Hylidae (●), Leptodactylidae (■), Bufonidae (▲) and Ranidae (◆). The Brazilian isolates included in this analysis are from Atlantic Forest (AF), Pantanal (PA) and Amazonia (AM). Sequences from fish trypanosomes (Fish clade) were used as outgroup for anuran trypanosomes (Anura clade). The numbers at nodes correspond to percentage of bootstrap values derived from 100 replicates. (B) Matrix of average sequence divergence indexes among anuran trypanosomes clustered An01, An02, An03 and An04 clades. Range given in parentheses. Length of most parsimonious tree: 846 steps; CI=0.80; RI=0.83.

host range of anuran trypanosomes. To date, few anuran trypanosomes have been included in phylogenies of trypanosomes in general. The only study that has specifically dealt with the phylogeny of these trypanosomes is that of Martin *et al.* (2002). Their data showed that 5 species of trypanosomes from ranids and bufonids in North America, Europe and Africa clustered together despite the considerable divergence among them. In this phylogeny, *T. chattoni*, isolated from a North American ranid, clearly stood apart from all the trypanosomes analysed, nesting more closely to the trypanosomes of fishes (Martin *et al.* 2002). However, in a phylogeny using a larger collection of fish trypanosomes, *T. chattoni* clustered with anuran trypanosomes, although in a long and separate branch (Gibson *et al.* 2005). Therefore, additional data from a larger number of trypanosomes from a wider cohort of hosts of varied geographical origin are badly needed to allow correct appraisal of the phylogenetic relationships of anuran trypanosomes.

Aiming to assess the diversity of anuran trypanosomes and better understand their phylogeny as well as to evaluate their current taxonomy, we captured anuran from various species of distinct Brazilian biomes, some of which separated by large geographical distances, evaluated their overall prevalence of trypanosome infection, isolated trypanosomes in

culture and compared their morphological and molecular characteristics. The prevalence of blood trypanosomes in anurans was high (45%). The families Leptodactylidae, Hylidae, Leiuperidae and Bufonidae had decreasing infection indices ranging from 81% to 28%. Isolates from bufonids came mainly from the Amazonia and Pantanal; trypanosomes from hylids came mostly from the Atlantic Forest, Pantanal and Guaporé; and isolates from leptodactylids came mainly from the Pantanal and Guaporé. Any explanation of the disparities in prevalence among the families and biomes should take into account biome features, anuran habitat, sampling size and collecting biases. It is known that haematophagous insects (flies and mosquitoes) and leeches transmit trypanosomes between anurans (Bardsley and Harmsen, 1973). The life-cycles and habitats (adult and breeding environments) of anurans affect their availability to potential vectors and thus prevalence of trypanosome infection. In this study, anuran species examined in both dry and rainy seasons exhibited highest infection indices in the rainy season, coinciding with the increased number of vector insects and greater time spent by some anuran species in aquatic breeding environments, where they can be exposed to aquatic leeches for longer periods.

The Brazilian anurans showed a large variety of bloodstream trypanosomes showing at least 11

distinct morphotypes, 8 similar to forms of previously described trypanosome species, but 3 entirely new. Adoption of the morphological and host-origin taxonomic criteria would lead to the classification of some Brazilian trypanosomes as new species. However, such an approach should be strongly discouraged because (a) the same morphotypes could be found in anurans of different species and from distant locations, including different continents; (b) inversely, anurans of the same species and from the same location could harbour trypanosomes of quite distinct morphotypes and (c) cultures of isolates from anuran blood samples showing identical morphotypes could have distinct molecular characteristics or, inversely, blood samples with distinct morphotypes could generate cultures with identical or very similar molecular features. The extensive pleomorphism of epimastigotes also precludes the use of the morphology of culture forms for species discrimination. Thus, data from this study do not support species identification of anuran trypanosomes based on morphology, host species and geographical origin.

To evaluate host, ecological and geographical diversity, we examined ITS and SSU rDNA sequences of Brazilian trypanosomes of anurans from geographically distant locations corresponding to distinct biomes. Genetic diversity among 82 isolates evaluated by polymorphisms of ITS rDNA distinguished 11 major groups (A–K) comprising 29 genotypes. Phylogenetic analysis using ITS and SSU rDNA sequences of Brazilian trypanosomes of anurans and species from North America (*T. chattoni*, *T. fallisi*, *T. ranarum* and *T. rotatorium*), Africa (*T. mega*) and Europe (*T. neveuilemairei*) showed that new isolates from this study and the reference species clustered together in a clade exclusive of anuran trypanosomes, providing evidence of the monophyly of anuran trypanosomes in agreement with previous studies (Hamilton *et al.* 2004; Gibson *et al.* 2005; Simpson *et al.* 2006). Phylogenetic relationships of 11 Brazilian isolates inferred using ITS and SSU rDNA sequences positioned most of them in a major assemblage formed by 2 clades, An01 and An02. These clades were separated by a considerable distance from clade An03, which is composed of 2 Brazilian isolates positioned closer to *T. chattoni* than to other Brazilian isolates. Therefore, although still significantly divergent from all anuran trypanosomes, in our analysis *T. chattoni* was positioned within the clade of anuran trypanosomes, corroborating results from Gibson *et al.* (2005) in conflict with its positioning with fish trypanosomes as shown by Martin *et al.* (2002). The phylogeny based on V7–V8 SSU rDNA was totally congruent with data generated by ITS1 rDNA, in conformity with our previous analysis using the same approach for mammalian trypanosomes (Maia da Silva *et al.* 2004; Rodrigues *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2006).

Molecular analysis revealed that the same anuran species could be infected by distinct trypanosomes and that the same presumed trypanosome species could infect distinct anuran species. In addition, our analyses suggest that closely related trypanosomes generally come from closely related anuran species. This is supported by the clustering together of trypanosomes from anurans of the same host families and genera but from different biomes and collection locations, as in the case of trypanosomes from hylids (Clade An01) or bufonids (Clades An02 and An03). Comparison of trypanosomes according to their collection locations might also suggest that there is some degree of association between genotype and geographical origin, since isolates from the same anuran family and genus, but from regions far apart, were separated in distinct subgroups/genotypes. Moreover, some genotypes were found to be restricted to certain biomes regardless of their host family, genus or species. This was the case of group A, which comprises 10 isolates from 4 anuran species from 3 families, all of which are from the same location in Rondônia State in Amazonia. Another example of a relationship related to geographical origin is genotype J2, composed of 14 isolates from 6 hylid species living in Pantanal or Guaporé, whereas trypanosomes from hylids of the Atlantic Forest were clustered in separate groups. This type of association is supported by previous studies employing isoenzyme, RAPD and karyotyping patterns to demonstrate that isolates of *T. rotatorium* and *T. ranarum* from ranids of the same geographical region had high similarity whereas isolates from geographical locations that are far apart exhibited pronounced genetic polymorphism (Lun and Desser, 1995, 1996; Desser, 2001). The association between genotype and geography is expected considering the high degree of endemism of anuran taxa. For the same reason, genotypes shared by anurans from Guaporé and Pantanal are also expected. The Brazilian isolates characterized in this study are from anuran species whose geographical distribution is restricted to Brazil or South America. These isolates were found to be separated from all the trypanosomes from other countries by large genetic distances, indicating that the culture collection of anuran trypanosomes obtained in this study contains several new species.

Finally, in spite of its monophyly, the clade formed by anuran trypanosomes is undoubtedly a complex taxon comprising distinct phylogenetic lineages. Several speciation modes may have played a role in the evolution of trypanosomes of this clade, including co-divergence by host switching and co-evolution, and sympatric and allopatric speciation events. The data from this study also suggest a significant degree of host restriction and that vector transmission, which is largely driven by biome and anuran species-specific ecogeographical features

could be important evolutionary factors for anuran trypanosomes. Leech transmission is thought to be a predominant evolutionary factor for anuran trypanosomes and the entire 'Aquatic' clade (Hamilton *et al.* 2004, 2005; Simpson *et al.* 2006). However, haematophagous insects should be very important vectors for terrestrial and arboreal anurans, despite the aquatic breeding environment of these anurans. We are currently investigating possible trypanosome vectors for the anurans investigated in this study. Several analyses of the phylogeography and co-evolutionary history of diverse host-parasite assemblages have been performed. However, few studies have focused on anuran parasites, one of the most diverse and complex groups in its parasite community, and most of the available data relate to the strictly host-specific Monogenea species (platyhelminth flatworms) (Sinnappah *et al.* 2001; Bentz *et al.* 2006). Further studies into host-parasite interactions and comparative analysis of the ecology and phylogeography of anurans and their trypanosomes would greatly contribute to our understanding of the evolution of this large, widespread and heterogeneous group of trypanosomes. The polymorphic DNA markers we have identified in this paper may facilitate such studies.

We are grateful to several collaborators for their tireless help in the fieldwork. We specially would like to thank Arlei Marcili (ICB-USP), Miguel T. Rodrigues (IB-USP), Sandra Favorito (Universidade Bandeirantes, São Paulo) and Carlos Jared (Instituto Butantan, São Paulo) for inestimable help providing blood samples from anurans. Work in Amazonia was done at the laboratory of the ICB5-USP in Monte Negro, Rondonia. We thank Fernando Paiva (UFMS) for providing good conditions for field work in the Pantanal. Many thanks to Professor Erney P. Camargo for helpful discussions, valuable comments and constructive criticisms in reviewing our manuscript. This work was funded by the Brazilian agencies of FAPESP and CNPq. Robson C. Ferreira and Laerte B. Viola are graduate student fellows respectively from FAPESP and CNPq.

REFERENCES

- Anderson, J. R. and Ayala, S. C.** (1968). Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: first report from the Americas. *Science* **161**, 1023–1025. doi: 10.1126/science.161.3845.1023.
- Ayala, S. C.** (1970). Two new trypanosomes from California toads and lizards. *Journal of Protozoology* **17**, 370–373.
- Bardsley, J. E. and Harmsen, R.** (1973). The trypanosomes of Anura. *Advances in Parasitology* **11**, 1–73.
- Barta, J. R., Boulard, Y. and Desser, S. S.** (1989). Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Transactions of the American Microscopical Society* **108**, 6–20. doi: 10.2307/3226201.
- Barta, J. R. and Desser, S. S.** (1984). Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Wildlife Diseases* **20**, 180–189.
- Bentz, S., Sinnappaah-Kang, N. D., Lim, L.-H.S., Lebedev, B., Combes, C. and Verneau, O.** (2006). Historical biogeography of amphibian parasites, genus *Polystoma* (Monogenea: Polystomidae). *Journal of Biogeography* **33**, 742–749. doi: 10.1111/j.1365-2699.2005.01402.x.
- Clark, C. G., Martin, D. S. and Diamond, L. S.** (1995). Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes as revealed by riboprinting. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**, 92–96.
- Cortez, A. P., Ventura, R. M., Rodrigues, A. C., Batista, J. S., Paiva, F., Anez, N., Machado, R. Z., Gibson, W. C. and Teixeira, M. M. G.** (2006). The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology* **133**, 159–169. doi: 10.1017/S0031182006000254.
- Desser, S. S.** (2001). The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *Journal of Parasitology* **87**, 152–160. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0152:TBPOAF]2.0.CO;2.
- Desser, S. S., McIver, S. B. and Jez, D.** (1975). Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. *International Journal for Parasitology* **5**, 507–509.
- Desser, S. S., McIver, S. B. and Ryckman, A.** (1973). *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *Journal of Parasitology* **59**, 353–358.
- Diamond, L. S.** (1965). A study of the morphology, biology and taxonomy of the trypanosomes of anura. *Wildlife Diseases* **44**, 1–85.
- Frost, D. R.** (2006). *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 4 (17 August 2006), <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>.
- Gibson, W. C., Lom, J., Peckova, H., Ferris, V. R. and Hamilton, P. B.** (2005). Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using SSUrRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. *Parasitology* **130**, 405–412. doi: 10.1017/S0031182004006778.
- Gruby, M.** (1843). Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences, Paris* **55**, 1134–1136.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J. and Gibson, W. C.** (2004). Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology* **34**, 1393–1404. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.08.011.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gidley, J., Holz, P. and Gibson, W. C.** (2005). A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology* **35**, 431–443. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.12.005.
- Jakes, K. A., O'Donoghue, P. J. and Adlard, R. D.** (2001). Phylogenetic relationships of *Trypanosoma*

- chelonina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian turtles and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitology* **123**, 483–487. doi: 10.1017/S0031182001008721.
- Levine, N. D. and Nye, R. R.** (1977). A survey of blood and other tissue parasites of leopard frogs *Rana pipiens* in the United States. *Journal of Wildlife Diseases* **13**, 17–23.
- Lun, Z. R. and Desser, S. S.** (1995). Karyotype analysis of anuran trypanosomes by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Journal of Parasitology* **81**, 1018–1020.
- Lun, Z. R. and Desser, S. S.** (1996). Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. *Parasitology Research* **82**, 22–27. doi: 10.1007/s004360050062.
- Maia da Silva, F., Rodrigues, A. C., Campaner, M., Takata, C. S., Brigido, M. C., Junqueira, A. C., Coura, J. R., Takeda, G. F., Shaw, J. J. and Teixeira, M. M. G.** (2004). 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* **128**, 283–294. doi: 10.1017/S0031182003004554.
- Martin, D. S. and Desser, S. S.** (1990). A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* n. sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park, Ontario. *Journal of Protozoology* **37**, 199–206.
- Martin, D. S. and Desser, S. S.** (1991a). Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron microscopic study. *Parasitology Research* **77**, 18–26. doi: 10.1007/BF00934379.
- Martin, D. S. and Desser, S. S.** (1991b). Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. *Journal of Parasitology* **77**, 498–500.
- Martin, D. S., Desser, S. S. and Hong, H.** (1992a). Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *Journal of Parasitology* **78**, 317–322.
- Martin, D. S., Desser, S. S. and Werner, J. K.** (1992b). Allozyme comparison and infectivity of cultured stages of *Trypanosoma fallisi* from southern Ontario and a trypanosome of toads from northern Michigan. *Journal of Parasitology* **78**, 1083–1086.
- Martin, D. S., Wright, A. D., Barta, J. R. and Desser, S. S.** (2002). Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *Journal of Parasitology* **88**, 566–571. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0566: PPOTGA]2.0.CO;2.
- Miyata, A.** (1978). Anuran trypanosomes in Kyushu and Ryukyu islands, with descriptions of six new species. *Tropical Medicine* **20**, 51–80.
- Reilly, B. O. and Woo, P. T. K.** (1982). The *in vivo* and *in vitro* development of *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo, 1982 and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology* **60**, 124–133.
- Rodrigues, A. C., Paiva, F., Campaner, M., Stevens, J. R., Noyes, H. A. and Teixeira, M. M. G.** (2006). Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* **132**, 215–224. doi: 10.1017150031182005008929.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P.** (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180.
- Siddall, M. E. and Desser, S. S.** (1992). Alternative leech vectors of frog and turtle trypanosomes. *Journal of Parasitology* **78**, 562–563.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. and Lukes, J.** (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* **22**, 168–174. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.006.
- Sinnappah, N. D., Lim, L.-HS., Rohde, K., Tinsley, R., Combes, C. and Verneau, O.** (2001). A paedomorphic parasite associated with a neotenic amphibian host: phylogenetic evidence suggests a revised systematic position for Sphyrnariidae within anuran and turtle polystomatineans. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**, 189–201. doi: 10.1006/mpev.2000.0877.
- Stevens, J. R., Noyes, H. A., Schofield, C. J. and Gibson, W.** (2001). The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology* **48**, 1–56. doi: 10.1016/S0065-308X(01)48003-1.
- Werner, J. K.** (1993). Blood parasites of amphibians from Sichuan Province, People's Republic of China. *Journal of Parasitology* **79**, 356–363.
- Werner, J. K. and Walewski, K.** (1976). Amphibian trypanosomes from the McCormick forest, Michigan. *Journal of Parasitology* **62**, 20–25.
- Woo, P. T. and Bogart, J. P.** (1984). *Trypanosoma* spp. (Protozoa: Kinetoplastida) in Hylidae (Anura) from eastern North America, with notes on their distribution and prevalences. *Canadian Journal of Zoology* **62**, 820–824.
- Zickus, T.** (2002). The first data on the fauna and distribution of blood parasites of amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica* **12**, 197–202.

A new lineage of closely related trypanosomes of anurans (Bufonidae and Leptodactylidae) and sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Brazilian Amazonia

R. C. Ferreira^a; M. Campaner^a; A. A. de Souza^b; C. L. A Takata^a; T. V. Barret^c; J. J. Shaw^a & M. M. G. Teixeira^{a*}

^a Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-900, Brasil .

^b Secção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde, Belém, PA, Brasil.

^c Grupo de Biologia Vetorial e Eco-epidemiologia de Trypanosomatidae na Amazonia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil.

Running Title: A lineage of trypanosomes from Brazilian anurans and sand flies

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank database under the accession numbers listed in Table 1

* Corresponding author: *E-mail address:* mmgteix@icb.usp.br. Fax: 55 11 3818 7417

Abstract

Analysis of the phylogenetic relationships among trypanosomes from several vertebrate and invertebrate hosts disclosed a new lineage of trypanosomes circulating among anurans and sand flies in Brazilian Amazonia. This assemblage of closely related trypanosomes and its relationship with other anuran trypanosomes and other trypanosomatid genera infecting sand flies was determined by comparing whole SSUrDNA sequences from: a) Thirteen isolates of anuran (toad and frog) trypanosomes from the Brazilian biomes of Amazonia, the Pantanal and the Atlantic Forest; b) six anuran trypanosome isolates from Europe, North America and Africa; and c) Six isolates of *Trypanosoma* and three of genus *Endotrypanum* from sand flies from Brazilian Amazonia. Trees produced using both Parsimony and Bayesian methods supported the monophyly of anuran trypanosomes and revealed 4 clades (An01-04) within the main clade of anuran trypanosomes. Parasites nested within each clade share a high sequence similarity, whereas significant genetic distances separate these clades. Clade An04 is composed of trypanosomes from exotic anurans, whereas the Brazilian isolates are distributed into three clades: a) clade An01, containing mostly isolates from Hylidae; b) clade An02, comprising mostly isolates from Bufonidae; and c) clade An03, containing only trypanosome isolates from Amazonia. Isolates in clades An01 and An02 were from frogs and toads captured in the three biomes studied, while clade An03 consisted of 3 isolates from toads (Bufonidae), 2 from frogs (Leptodactylidae and Leiuperidae) and six from sand flies. This clade is a new phylogenetic lineage of trypanosomes from anurans and phlebotomine sand flies that share the same ecotopes. To our knowledge, this is the first study describing the morphology and molecular characterization of trypanosomes from sand flies. This study also describes the first molecular phylogenetic affiliation of trypanosomes from anurans and phlebotomines, incriminating these flies as invertebrate hosts and probably also as important vectors of Amazonian terrestrial anuran trypanosomes.

Keywords: *Trypanosoma*; Amphibian parasites, phlebotomine sand flies; phylogeny; evolution; vector-trypanosome relationships; Amazonia; ribosomal genes.

1. Introduction

Protozoan flagellates of the genus *Trypanosoma* (Euglenozoa: Kinetoplastida) are blood parasites infecting all classes of vertebrates transmitted by a range of haematophagous arthropods (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2007). Anurans are exposed to both terrestrial and aquatic haematophagous ectoparasites such as arthropods and leeches, which can serve as hosts and vectors for trypanosomes. Infection of anurans by trypanosomes has been recorded in all continents (Bardsley & Harmsen, 1973; Dessler, 2001). Phylogenetic studies positioned anuran trypanosomes closest to fish trypanosomes in the Aquatic clade, which includes species that infect animals that live all or part of their lives in an aquatic environment. The Aquatic clade was composed of two major subclades, one containing trypanosomes from fishes, turtles and platypus and another comprising all anuran trypanosomes and *T. theezieni*, a species from a terrestrial chameleon (Stevens et al., 2001; Martin et al., 2002; Gibson et al., 2005; Hamilton et al., 2005; 2007; Ferreira et al., 2007). The single trypanosome isolated from an aquatic leech was positioned within the fish trypanosome subclade in all the phylogenetic analyses. Isolates from terrestrial leeches, on the other hand, were closest to wallaby and frog trypanosomes, forming a lineage of Australian trypanosomes, which are very distant from the Aquatic clade (Hamilton et al., 2005).

Anurans may live part or all of their lives in aquatic environments. In such environments they are exposed to aquatic leeches, which have been implicated as vectors of frog and toad trypanosomes. Experimental infections confirmed leech transmission of *T. rotatorium*, *T. inopinatum* and *T. pipientis* from ranids (Dessler et al., 1973; Dessler et al., 1975; Barta et al., 1989;

Martin & Desser, 1991a; Siddall & Desser, 1992). Frogs of Ranidae (ranids) spend most of their adult lives in aquatic habitats, thus increasing their exposure to leech vectors, but adult tree frogs (hylids) and toads (bufonids) only have prolonged contact with the aquatic environment during mating seasons. Accordingly, natural and experimental studies have shown that leeches transmitted trypanosomes to tadpoles and adult ranids (Desser et al., 1973; Reilly & Woo, 1982b) but only to adult toads, suggesting that infection occurred when toads returned to the water to breed (Martin & Desser, 1991a). Several studies also reported aquatic proboscidean leeches as vectors of trypanosomes of fish, lizards, tortoises and salamanders (Telford, 1972; Lom, 1979).

While aquatic leeches are generally considered to be the most important vectors of trypanosomes of more aquatic anurans (especially ranids), haematophagous insects are important vectors among toads and frogs that spend most of their adult lives in terrestrial or arboreal habitats. Experimental infection confirmed that some species of mosquitoes are invertebrate hosts for anuran trypanosomes, but few insects were confirmed to be vectors: *Aedes aegypti*, which does not usually feed on anurans, could be infected with the ranid parasite *T. rotatorium* (from ranids) but was unable to infect *Rana pipiens* (Bailey, 1962). Similarly, *T. rotatorium* infected *Culex territans*, which is known to feed upon anurans, but did not infect *R. pipiens* (Desser et al., 1973; 1975). On the other hand, *A. aegypti* and *C. territans* were able to transmit *T. rotatorium* to hylid and leptodactylid frogs, but not to bufonid toads (Ramos & Urdaneta Morales, 1977). An interesting observation is that the midge *Corethrella wirthi* is attracted by the call of *Hyla cinerea*, and trypanosome infection in these frogs was only found in males (Johnson et al., 1993).

Sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are the vectors of mammalian trypanosomatids belonging to the genera *Leishmania* and *Endotrypanum*, but they have also been found infected by several other genera of this family (Arias et al., 1985; Ryan et al., 1987; Shaw et al., 2003). These insects are the supposed vectors of reptilian trypanosomes (Anderson & Ayala, 1968; Ayala & MacKay, 1971; Cristensen & Telford, 1972; Lainson & Shaw, 1979), bat trypanosomes (McConnell & Correa, 1964), and *T. freitasi* of opossums (Naiff et al., 1989) and, in addition, were found harbouring *T. rangeli* (Arias et al., 1985).

Phlebotomines are small blood-feeding diptera, and, like anurans, are mostly nocturnal. They are frequently observed feeding on these animals and have been shown to act as vectors of toad trypanosomes. The first species described as being transmitted by sand flies was *T. bocagei*, from Chinese and African bufonids, which was transmitted by *Phlebotomus squamirostris* (Feng & Chung, 1940). *T. bufophlebotomi* of toads from USA, morphologically similar to *T. bocagei*, was infective to *Phlebotomus vexator occidentis*, which normally feeds only on reptiles and anurans and shares ground burrows with these animals as diurnal resting sites. In an experimental study, sand flies were infected with trypanosomes by feeding on toads, and transmission occurred through both ingestion of flies and intraperitoneal inoculation of trypanosome culture of flagellates recovered from the gut of sand flies (Anderson & Ayala, 1968). However, it is impossible to state how transmission of anuran trypanosomes occurs under natural conditions, although experiments have shown that oral infection is a highly efficient transmission route to *Hyla crepitans* and *Bufo boreas* fed with trypanosome infected *Aedes aegypti* and *Psychodidae*, respectively. Anuran trypanosomes develop in the gut of sand flies as spheromastigotes and epimastigotes. Metacyclic trypomastigotes, however, have not been found in these flies, pointing to epimastigotes or promastigotes rather than trypomastigotes as the infective form (Ayala, 1971; Desser et al., 1973; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977), as proposed for lizard trypanosomes (Ayala, 1970; Ayala & McKay, 1971).

A significant degree of host-restriction was demonstrated by cross infecting anurans with trypanosomes from distinct anuran families. *T. bufophlebotomi* appears to infect bufonids specifically, as all attempts to infect ranids and hylids were unsuccessful (Ayala, 1970; 1971). *T. fallisi* of *Bufo* sp was not infective to ranids, and *T. ranarum* of *Rana* sp failed to infect bufonids (Martin & Desser, 1991b). Two species of hylid trypanosomes (*T. andersoni* and *T. grylli*) were only infective for *Hyla* spp. (Reilly & Woo, 1982a). Zymodeme analysis distinguished between trypanosomes of toads and frogs, also suggesting host-specificity (Martin et al., 1992). Phylogenetic relationships among anuran trypanosomes showed a significant degree of host specificity and, in addition, suggested host switching between frogs and toads (Martin and Desser, 1991b; Martin et al., 1992; 2002; Ferreira et al., 2007). The aforementioned studies therefore suggest leech transmission of trypanosomes to both ranids and bufonids, whereas in general,

phlebotomines are vectors of bufonid trypanosomes, and culicids vectors of hyliid and leptodactylid trypanosomes. Nevertheless, *T. rotatorium* was experimentally transmitted to ranids by aquatic leeches and to hylids and leptodactylids by mosquitoes, suggesting that both leeches and insects can transmit the same trypanosome species to different anuran species according to their habitats (Desser et al., 1973; 1975; Martin & Desser, 1991a; Siddall & Desser, 1992).

In a recent phylogenetic study based on SSUrDNA sequences of trypanosomes from Brazil, Europe, North America and Africa, we showed that anuran trypanosomes constitute a monophyletic assemblage comprising distinct lineages of isolates associated with both host species and geographic origin, a finding that indicates that these trypanosomes have a complex evolutionary history (Ferreira et al., 2007). Data from this study corroborated previous studies showing high levels of similarity among anuran isolates from the same or close geographic locations, in contrast to the pronounced genetic polymorphism among isolates from regions that are geographically far apart (Lun & Desser, 1996; Martin & Desser, 1992). Besides being one of the largest and most diverse assemblages of trypanosomes, anurans represent fascinating systems for the study of host-parasite relationships because they occupy a wide variety of habitats and are infected by trypanosomes that exhibit different levels of host specificity and are transmitted by leeches and arthropods. Anuran trypanosomes are excellent models for biogeographic and phylogeographic studies because of the wide distribution and biodiversity of their hosts as well as the high level of endemism, with different species living in distinct biomes and inhabiting specific habitats and niches.

In the present study, we compared whole SSUrDNA sequences of trypanosomes isolated from anurans and sand flies in order to: a) infer phylogenetic relationships among anuran trypanosomes of distinct host species from different habitats and biomes separated by large geographic distances; b) investigate the existence of anuran trypanosomes infecting sand flies; and c) analyse the trypanosome assemblages in relation to the phylogeography and biogeography of anurans and sand fly hosts.

2. Material and methods

2.1. Collection sites and isolation of trypanosomes from anurans

Anurans were captured between 2000 and 2005 in Amazonia (the states of Rondônia and Amazonas), the Atlantic Forest (the state of São Paulo) and the Pantanal (the state of Mato Grosso do Sul) according to the recommendations of IBAMA (the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources) with the collaboration of Dr Miguel T. Rodrigues (Department of Zoology, University of São Paulo, Brazil) who also identified the anurans. Taxonomy of anurans was revised according Frost (2006) (Table 1).

Captured individuals were bled by heart puncture using sodium citrate as anticoagulant. The resultant blood samples were examined for the presence of trypanosomes by the microhematocrit and hemoculture methods. Between ~0.2 and 0.5 ml of blood was inoculated into vacutainer tubes containing a biphasic medium for trypanosome isolation as previously described (Ferreira et al., 2007). All cultures were cryopreserved in liquid N₂ and expanded in Grace's medium for DNA extraction. For differentiation of epimastigotes into trypomastigote forms, cultures in BAB-LIT medium were transferred to culture flasks containing a monolayer of insect cells (Hi-5 from *Spodoptera frugiperda*) in Grace's medium containing 10% FBS (fetal bovine serum) and incubated at 25°C.

2.2. Collection sites and isolation of trypanosomes from sand flies.

During epidemiological studies on cutaneous leishmaniasis, sand flies were collected from 1997 to 2004 in the State of Rondonia (Western Amazonia) in the same region (Central region of the state of Rondonia) (Gil et al., 2003) where anurans harbouring trypanosomes were captured (Ferreira et al., 2007), and in Northern region of this State (Alto Rio Madeira). Flies were collected using Shannon and CDC light traps and from resting sites using aspirators. Female sand flies were dissected and their

intestine was placed in a fresh drop of saline and examined for the presence of trypanosomatids under a phase microscopy. Attempted isolations were made from positive intestines by cutting them into small pieces and transferring them to culture tubes as described by Ryan et al., (1987). Cultures were cryopreserved in liquid N₂ and expanded in LIT and Grace media for DNA preparation. Genitalia of flies were removed and mounted in Berlese gum for identification based on spermathecae (Young and Duncan, 1994). Taxonomy of sand flies was revised according to Galati (2003).

2.3. Morphology of trypanosomes from anurans and phlebotomines

For morphological analysis blood smears from anurans were fixed with methanol and stained with Giemsa. Morphological features of cultured epimastigote and trypomastigote forms were described on smears of logarithmic and stationary phase cultures of trypanosomes in Grace medium or co-cultivated with Hi-5 cells, also fixed with methanol and Giemsa stained.

2.4. PCR amplification of SSUrDNA, sequencing and phylogeny

Genomic DNA of cultured trypanosomes was extracted by the classical phenol-chloroform method. The oligonucleotides employed for PCR amplification of whole SSUrDNA were KRD5 and KRD3 (Clark et al., 1995). Sequences were aligned with ClustalX and the alignments refined manually. Phylogenies were inferred by Parsimony (P) and Bayesian analyses (B). Parsimony and Bootstrap analyses were conducted in PAUP* v4b10 with 100 replicates of random addition sequence followed by branch swapping (RAS-TBR) as previously described (Ferreira et al., 2007). Gaps were treated as fifth state, and zero-length branches were collapsed. Bootstrap analysis included only informative sites. A distance matrix was generated using uncorrected *p*-distance. Bayesian analysis was performed in MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Tree searches employed GTR plus gamma and proportion of invariable sites. SSUrDNA sequences determined in this study were aligned with sequences from trypanosomatids belonging to a number of genera (including several anuran trypanosomes) recovered from GenBank (accession number) (Fig. 2).

SSUrDNA sequences determined in this study were aligned with sequences from trypanosomatids belonging to several genera recovered from GenBank (accession number), including the following anuran trypanosomes: *T. rotatorium* (B2-II) (AJ009161); *T. neveulemairei* (AF119809); *T. mega* (AJ223567); *T. fallisi* (AF119806); *T. ranarum* (AF119810) and *T. chattoni* (AF119807). Other trypanosomes nested in the Aquatic clade were also included in the alignment: fish trypanosomes, *T. triglae* (U39584); *T. boissoni* (U39580); *T. cobitis* (AJ009143); *T. granulorum* (UK) (AJ620551); *T. binneyi* from platypus (AJ132351); *T. therezieni* from lizard (AJ223571) and *T. sp* (K&A) from aquatic leech (AJ009167). Trypanosomatids from phlebotomines belonging to genera *Leishmania*, *L. guyanensis* (X53913), *L. amazonensis* (X53912) and *L. tarentolae* (M84225) and a species of *Endotrypanum*, *E. monterogeii* (X53911) were also included in the analyses plus sequences from monoxenous trypanosomatids closely related to these genera: *Leptomonas* sp (X53914); *Crithidia fasciculata* (Y00055); *Wallaceina brevicula* (AF153045) and *Trypanosomatidae* G755 of sand fly (U59491). Sequences of trypanosomes from the following different classes of vertebrate hosts were also included: a) Mammals, *T. vivax* (U22316); *T. brucei rhodesiense* (AJ009142); *T. congolense* (savannah) (AJ009146); *T. congolense* (kilifi) (AJ009144); *T. simiae* (AJ009162); *T. godfreyi* (AJ009155); *T. theileri* (AJ009164); *T. cyclops* (AJ131958); *T. sp* (ABF) of wallaby (AJ620564); *T. microti* (AJ009158); *T. lewisi* (AB242273); *T. rabinowitschae* (AY491765); *T. sp* (H25) of kangaroo (AJ009168); *T. dionisii* (AJ009152); *T. cruzi* (VINCH 89) (AJ009149); *T. cruzi marinkellei* (AJ009150); *T. sp* (bat) (AJ012418) of African bat; *T. conorhini* (AJ012411); *T. rangeli* (AJ009160); b) Birds, *T. bennetti* (AJ223562); *T. corvi* (AY461665); *T. sp* (N335) (AJ223570) of sparrow; *T. avium* (APO1) (AF416559); *T. avium* (SIM3) (AF416563); and c) Crocodile, *T. grayi* (AJ005278). Sequences of trypanosomes from insects added to the aligned sequences were: *T. sp* (CUL1) from a culicid (AF416561) and *T. sp* (OA6) from a hippoboscid fly (AF416562). The following sequences of *Bodo* spp. were used as outgroup of Trypanosomatidae: *Bodo*

saltans (Konstanz) (AF208889); *B. sp* (AY028449); *B. saltans* (Petersburg) (AF208887); *B. uncinatus* (AF208884); and *B. edax* (AY028451). Alignments used in this study are available from the authors upon request.

3. Results

3. 1. Isolation, culture and morphology of anuran trypanosomes

The anuran trypanosomes analysed in the present study were isolated during extensive surveys performed in Amazonia, the Atlantic Forest and the Pantanal. Among the 13 Brazilian isolates examined in this study, 8 had been previously partially characterized by the polymorphism of the ITS and partial sequences (V7-V8 region) of SSUrDNA (Ferreira et al., 2007). These isolates were obtained from distinct species of anurans of the following families: Bufonidae; Leptodactylidae; Leiuperidae and Hylidae (Table 1). Although parasitaemias were always low, trypomastigotes were seen in the blood smears of a number of animals. Morphological analysis of these blood forms revealed highly polymorphic trypomastigotes among different anuran species as well as among individuals of the same species and within blood samples from the same anuran specimens. These trypomastigotes were ascribed to the M1, M3, M5 and M6 morphotypes, which had been defined previously in a large study in which anuran blood trypanosomes were distributed in 11 major morphotypes (Ferreira et al., 2007), and to a new morphotype (M12) detected in this study in the blood of one bufonid (Fig. 1A). Morphotypes are defined according to the following general morphological features: M3 (*T. leptodactyli*-like), forms with S-like or roll-shaped bodies with conspicuous, many-folded undulating membranes and the kinetoplast at the posterior extremity; M5 (*T. fallisi*-like), large and wide trypomastigotes with many longitudinal striations and a large nucleus at the posterior extremity; M6, small forms, with a well-developed undulating membrane and rounded posterior end; M12, forms of intermediary size, with a well-developed undulating membrane and pointed posterior end (Fig. 1A). M6 and M12 comprise the smallest forms and could not be associated with any previously described species of anuran trypanosomes. All these 5 morphotypes appear to be exclusive to bufonid, leiuperid and leptodactylid isolates.

Hemocultures were quite effective in isolating anuran trypanosomes, and the growth behaviour of flagellates from distinct host species was similar. After an initial multiplicative phase as small round bodies that were often clustered into rosettes, logarithmic-phase cultures displayed pleomorphic epimastigotes varying in shape, body size, the length of the free flagellum and the extent to which the undulant membrane had developed. Stationary cultures presented large epimastigotes with a very well developed undulant membrane. Co-cultivation of the flagellates with Hi-5 cells was found to be very effective in inducing differentiation of epimastigotes into trypomastigotes (Fig. 1B).

3. 2. Isolation, culture and morphology of trypanosomes from anurans and sand flies

Flagellates in sand flies from which trypanosomes were isolated in cultures were, in general, observed in small numbers in the anterior and posterior stomach, pylori and gut of flies. However, the specimens of *P. dendrophyla* and *Sciopemyia* sp that harboured isolates 889 and 887, respectively, contained a large number of flagellates in the stomach, pylori, gut and Malpighi tubes. A small number of trypanosome isolates were found in a large collection of *Leishmania* and *Endotrypanum* isolates from sand flies. These were selected due to the presence of epimastigotes or both promastigotes and epimastigotes in the primary cultures. Only epimastigotes were seen in subsequent passages of all selected cultures. General morphological features were shared by trypanosomes from anurans and sand flies. In the logarithmic-phase cultures, sand fly trypanosomes also had small, rounded, multiplicative forms that transformed into epimastigotes of variable shapes and sizes. Despite small differences in growth behaviour, all the trypanosomes from phlebotomines and anurans could be maintained in BAB-LIT and in Grace's media. As with anuran

trypanosomes, a high differentiation rate from epimastigotes into trypomastigotes was observed when sand fly trypanosomes were co-cultivated with monolayers of Hi-5 cells. Under these conditions there were numerous large trypomastigotes, which were mostly roll-shaped with a very well-developed undulant membrane, and a small number of very long or very wide trypomastigotes (Fig. 1B).

3.3. Phylogenetic relationships among trypanosomes from anurans and sand flies

Phylogenetic relationships among trypanosomes of Brazilian anurans and phlebotomine sand flies were inferred using whole SSUrDNA sequences from 19 trypanosomes originated from different species of vertebrate and invertebrate hosts. The alignments used for phylogenetic inferences included 6 available sequences of anuran trypanosomes from North America, Europe and Africa plus 13 new sequences of isolates from Brazilian anurans of the Bufonidae, Leptodactylidae, Leiuperidae and Hylidae families from Amazonia, the Pantanal and the Atlantic Forest (Table 1). Trees produced using the Parsimony and Bayesian methods supported the monophyly of anuran trypanosomes and the position of fish trypanosomes as a marginal group of the anuran clade (100% of bootstrap). The internal branching pattern revealed 4 very well-supported clades of anuran trypanosomes separated by significant genetic distances (clades An01-04).

Clades An01, An02 and An03 harbour Brazilian isolates, whereas trypanosomes from exotic anurans (*T. fallisi*, *T. rotatorium* and *T. ranarum* from North America, *T. neveulemairei* from Europe and *T. mega* from Africa) were all clustered in clade An04 (100% of bootstrap) (Fig. 2). The high heterogeneity within clade An04 (~7.9% average sequence divergence), which was composed of trypanosomes from ranids and bufonids from locations separated by large geographic distances, resulted in long branches for some species. *T. chattoni* from a ranid from USA was the only trypanosome of exotic anurans examined that fell outside clade An04 and was positioned in a separate branch distant from all the other clades (~8.6 to 10.5% sequence divergence). However, despite its peculiar position, when we used a large number of anuran trypanosomes, *T. chattoni* was positioned within the anuran trypanosome clade (100% bootstrap).

Clade An01 was composed of 4 isolates, the majority of which were from hylids: isolates 358, 406, and 646 from the hylids *Phyllomedusa* sp, *Scinax ruber* and *Aplastodiscus leucopygius*, respectively, and isolate 444 from a leptodactylid (*Leptodactylus chaquensis*). This clade showed a high level of homogeneity (~98.6% average sequence similarity) and was closest to clade An02 (~96% shared similarity). Clade An02 (~98% average sequence similarity) was composed of three isolates from bufonids (isolates 346 and 362 from *Rhinella margaritifera* and isolate 858 from *Chaunus ictericus*) and one isolate (316) from a leptodactylid (*Leptodactylus chaquensis*). The isolates nested in clades An01 and An02 are from the Pantanal, the Atlantic Forest and Amazonia (Fig. 2, Table 1).

Clade An03 consisted of five anuran trypanosomes captured in Amazonia that clustered together with six isolates from phlebotomines (100% of bootstrap) that were also from Western Amazonia (the state of Rondonia). This clade (~2.3% average divergence) was composed of isolates from Bufonidae (isolates 339 and 364 from *Chaunus marinus* and 399 from *Rhinella margaritifera*), Leiuperidae (isolate 408 from *Engystomops petersi*) and isolate 398 from Leptodactylidae (*Leptodactylus pentadactylus*) (Fig. 2, Table 1). Even though the isolates from sand flies clustered into Clade An03, they were significantly polymorphic when compared with each other (~2.2% average divergence) and with the anuran isolates nested in this clade. Nevertheless, they are separated by a very large distance (13.5% divergence) from other sand fly trypanosomatids from the same location that clustered together with *Endotrypanum monterogeii* (~99.8% similarity), a trypanosomatid closer to *Leishmania* (Fig. 2). Both *Endotrypanum* and *Leishmania* are the commonest trypanosomatid genera found in Amazonian sand flies.

3.4. Biogeographic and phylogeographic analyses of anuran and sand fly trypanosome assemblages

Trypanosome isolates from anurans and sand flies that nested in clade An03 form a lineage of trypanosomes that appears to be restricted to Amazonia. The anuran hosts of the members of this clade belong to the closely related families of Bufonidae, Leiuperidae and Leptodactylidae and come from the same biome and hydrographic basin, where they share terrestrial habitats and aquatic breeding environments. In addition, the anurans and sand flies from which they were isolated share nocturnal activity, terrestrial habitats and ecological niches (burrows at ground level). These results incriminate sand flies as invertebrate hosts and, very likely, as important vectors of trypanosomes for species of the Bufonidae, Leiuperidae and Leptodactylidae families in Brazilian Amazonia.

All the hyid trypanosomes, which were from distinct biomes, clustered in clade An01, whereas isolates of bufonids were distributed into clades An02 and An03 (Brazilian isolates) and An04 (North American, European and African isolates). Isolates of leptodactylids were distributed in three clades (An01-03) (Table 1; Fig. 2). Isolates of bufonids and leptodactylids were more closely related to each other when their hosts had the same or close geographic origin. Accordingly, isolates from *Chaunus ictericus* and *Leptodactylus chaquensis* (species restricted to southern South America) captured in southeast and central Brazil (the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul) clustered together into clade An02. Although isolated from anurans of the same genera but different species, isolates 339 and 364 from *Chaunus marinus* and 398 from *Leptodactylus pentadactylus* were separated from the isolates of clade An02 (~5.6% sequence divergence) and clustered into clade An03, which comprises exclusively isolates from Amazonia. The only exceptions were isolates of *Rhinella margaritifera* from the same collecting site in Amazonia, which were positioned in clades An03 and An02 (Fig. 2; Table 1).

Overall, results from this study suggest that lineages of anuran trypanosomes are linked to the phylogenetic relationships of their hosts. Accordingly, isolates from the same species or even from the same family of anurans generally cluster together. Significant congruence between phylogeographic and ecogeographic patterns of anurans and trypanosome lineages also suggests that biome, hydrographic basins, habitat and specific ecological niches also appear to be determinants for lineage distribution of anuran trypanosomes. However, phylogenetic analysis also suggested host switching of trypanosomes among closely related and/or sympatric species of frogs and toads (bufonids and leptodactylids) (Table 1; Fig. 2).

4. Discussion

The present study investigated the phylogenetic relationships among trypanosomes of anurans and sand flies and evaluated the degree of polymorphism among them by comparing whole SSUrDNA sequences. Phylogenies inferred using Parsimony and Bayesian analyses demonstrated that anuran trypanosomes form a monophyletic assemblage. This corroborates our previous studies using partial SSUrDNA sequences of anuran trypanosomes (Ferreira et al., 2007) and concurs with a study of Gibson et al. (2005) using a large set of fish isolates. However, our studies contradict the positioning of *T. chattoni*, from an North American ranid, closest to fish trypanosomes (Martin et al., 2002) and the alleged polyphyly of amphibian trypanosomes based on separation of *T. chattoni* from other 5 anuran trypanosomes (Hamilton et al., 2007). The latter two studies were based on SSUrRNA sequences from 6 anuran trypanosomes available in Genbank, which were all also included in the present study.

Our previous analysis of phylogenetic relationships among trypanosomes from Brazilian anurans inferred using ITS1 and partial SSU ribosomal sequences suggested some pattern of association of genotypes and clades of trypanosomes with their host and geographical origin (Ferreira et al., 2007). Confirming our previous findings, in this study we demonstrated that the assemblage of anuran trypanosomes is composed of 4 clades (An01-An04) separated each other by significant genetic distances, which appear

to be associated with host phylogeny, biogeographic and phylogeographic patterns. Brazilian trypanosomes were distributed in three clades (An01-An03) whereas trypanosomes from exotic anurans composed the clade An04.

All the isolates from hylids clustered tightly together in clade An01, even when they originated from biomes separated by large geographic distances. Only one isolate of leptodactylid fell within this clade. Although living in sympatry with bufonids and leptodactylids inhabiting terrestrial ecotopes, all the hylids examined in our study live in arboreal ecological niches. Interestingly, hylid trypanosomes were separated phylogenetically from trypanosomes of other anuran families and from those of sand flies from the same capture location, suggesting that there are other vectors for the sympatric hylid trypanosomes. We are currently analysing a large collection of hylid trypanosomes, and preliminary results suggest that they are more related to each other than to isolates from any other anuran family, even when isolated from host species inhabiting distant hydrographic basins (Ferreira et al., in preparation).

In contrast to hylid trypanosomes (clade An01), isolates from terrestrial toads (Bufonidae) and frogs (Leptodactylidae and Leiuperidae), which are anuran families phylogenetically more related to each other than to the Hylidae, belong to clades An02 and An03. In general, trypanosome isolates of these clades are more closely related to each other when their hosts are from the same biomes. Accordingly, clade An02 harboured isolates of anurans from the Pantanal and Atlantic Forest (central and southeast Brazil, respectively), whereas isolates nested in clade An03 were from Amazonia (northern Brazil). Therefore, phylogeographic analysis revealed that clades An02 and An03 are predominantly related to their hosts' biomes (the Pantanal/Atlantic Forest or Amazonia, respectively). Isolates of *Rhinella margaritifera* from Amazonia were distributed in both these clades, in agreement with the presence of this species in Amazonia and Pantanal. There is a high degree of anuran species endemism in the biomes investigated. A vicariant event, most likely caused by Miocene marine introgressions, is considered to be the cause of the restricted distribution of Brazilian anuran species in the hydrographically separated basins of Amazonia, the Pantanal and the Atlantic Forest. However, recent dispersion is thought to have led to contact between anuran populations from neighbouring regions of Amazonia (Rondônia) and the Pantanal (Garda & Cannatella, 2006).

Clade An04 contains trypanosomes from exotic anurans, which come from extremely distant locations and belong to different families, genera or species. The species from which these trypanosomes were isolated do not occur in Brazil. Clustering of trypanosomes of European and North American ranids within clade An04 is in agreement with the hypothesis that the North American ranid population arose from European ancestors. The larger genetic distance separating bufonid trypanosomes from Brazil, Africa (*T. mega*) and North America (*T. fallisi*) corroborates the high divergence of bufonids inhabiting these regions evidenced by the phylogeny of Bufonidae (Pramuk, 2006).

Trypanosomes in general are usually transmitted cyclically or mechanically by bloodsucking invertebrates. Arthropods (insects and ticks) are vectors of trypanosomes infecting mammals and birds, whereas hirudinean annelids (leeches) are vectors of those infecting aquatic vertebrates. However, while fish trypanosomes appear to be exclusively transmitted by freshwater and marine leeches, there is evidence of the role of leeches, flies and mosquitoes in the transmission of trypanosomes from amphibians and reptiles (Bardsley & Harmsen, 1973; Telford, 1972; Lom, 1979; Dessler, 2001; Hamilton et al., 2007). The life cycles and habitats of anurans affect their availability for potential vectors. While aquatic leeches are considered the most important vectors for more strictly aquatic vertebrates, the basking habits of anurans enhance their exposure to haematophagous insects, which are important vectors of trypanosomes among frogs and toads that spend a great deal of their lives on land in terrestrial or arboreal niches (Bardsley & Harmsen, 1973; Anderson & Ayala, 1968; Dessler et al., 1973; 1975; Johnson et al., 1993).

The present work is the first to describe the morphological and molecular characterization of trypanosomes isolated from wild-caught sand flies. The 6 trypanosomatids from the Amazonian sand flies clustered together in clade An03 with 4 isolates from toads and one from a frog. This clade represents a phylogenetic lineage of very closely related trypanosomes that is distinct from all other clades of anuran trypanosomes. The present study is also the first to use molecular phylogeny to demonstrate the presence of anuran trypanosomes in sand flies. The results of the study suggest that some species of sand flies are vectors of this particular

trypanosome lineage (An03) among anurans, which appear to be restricted to the Brazilian Amazon region. Previous field and experimental studies incriminated sand flies and culicids as vectors of anuran trypanosomes (Anderson & Ayala, 1968; Desser et al., 1973). However, neither trypanosomes from sand flies nor from culicids closely related to anuran trypanosomes were disclosed to date in phylogenies of *Trypanosoma*. Phylogenetic analyses used to address patterns of coevolution within *Trypanosoma* indicate that most trypanosome clades are largely associated with particular vertebrate and/or invertebrate hosts (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2005; 2007; Rodrigues et al., 2006; Maia da Silva et al., 2007; Ferreira et al., 2007). However, several vectors are not strictly restricted to one trypanosomatid clade, as corroborated in this study in which sand flies were found infected by distantly related species of genera *Trypanosoma* and *Leishmania/Endotrypanum*. Regarding anuran trypanosomes, *T. rotatorium* was experimentally transmitted to anurans of different families by both aquatic leeches and mosquitoes (Bardsley & Harmsen, 1973; Bailey, 1962; Ramos & Urdaneta-Morales, 1977). (Contra: Martin et al., 1992)

Our previous study revealed high morphological and genetic polymorphism among anuran trypanosomes (Ferreira et al., 2007). In this study, we showed that cultured trypanosomes from phlebotomines could be morphologically similar to anuran trypanosomes. Previous studies have shown that the general morphology of anuran trypanosomes found in sand flies is similar to that of *Leishmania*, *Endotrypanum* and reptilian trypanosomes in the gut of naturally and experimentally infected sand flies (Anderson & Ayala, 1968). Thus, although epidemiological studies of *Leishmania* vectors preferentially favour the examination of phlebotomines that feed on warm-blooded rather than cold-blooded vertebrates, infection of these flies with other trypanosomes could not be discarded. There are several reports of unidentified trypanosomatids in sand flies, particularly in non-anthropophilic species (Shaw et al., 2003; Rotureau et al., 2006).

Sand fly diversity and population abundance was found to vary with ecotope. In addition, associations between particular genera/subgenera of *Phlebotomus* and complexes/species of *Leishmania* and *Endotrypanum*, coupled with preferential feeding of the fly on the host and their distribution within specific niches, suggest an evolutionary fit between these parasites and their vectors. A combination of stratification by height, ecological niches, activity periods, resting sites and feeding preferences affects the potential of sand flies to be colonized by distinct trypanosomatids and transmit these flagellates to different vertebrate hosts (Arias et al., 1985; Ryan et al., 1987; Freitas et al., 2002; Shaw et al., 2003; Rotureau et al., 2006).

Several phlebotomine species feed on anurans, and there is evidence that some feed preferentially on these animals (Anderson & Ayala, 1968; Desser et al., 1973; 1975; Johnson et al., 1993). There is little information on the biology of sand flies from which we isolated the anuran trypanosomes characterized in this study. *Sciopemyia* spp and *E. infraespinosa* are found in burrows at ground level and are nocturnal, as are the trypanosome-infected anurans captured in the same habitat. On the other hand, we found *Endotrypanum* in two *P. dendrophyla*, an arboreal species that occurs in the canopy, where contact with sloths, the vertebrate hosts of this flagellate, is favoured. *Leishmania* or *Endotrypanum* have never been recorded in *E. infraespinosa*, *S. sordelli* or *S. servulolimae*, but trypanosomes have been described in the first two species (Freitas et al., 2002; Gil et al., 2003; Shaw et al., 2003; Rotureau et al., 2006). These data suggest that sand flies from which anuran trypanosomes were isolated are zoophilic and feed on cold-blooded rather than warm-blooded vertebrates, as already demonstrated for *S. sordelli* (Tesh et al., 1971).

The results presented in this paper point to phlebotomines as hosts and potential vectors of trypanosomes among terrestrial toads and frogs. Phylogenetic and biogeographic analyses supported vector/parasite association and a trypanosome lineage circulating among these anurans and sand flies in Brazilian Amazonia. Overall, data from this study revealed a considerable degree of concordance between the phylogeny, biogeography and phylogeography of anurans and the lineages (clades An01-04) of anuran trypanosomes, suggesting long and continuous association of these parasites with their hosts and some patterns of codivergence. However, co-speciation patterns might simply reflect allopatric speciation events of both hosts and parasites. Closer examination disclosed several incongruences between lineages of parasites and anuran phylogenies, with host switches among bufonids, leiuperids and leptodactylids, which shared the same ecological niche. These data pointed to more important role of host

switching than co-speciation in the lineage assemblages of anuran trypanosomes. Most of the host switches evidenced in this study are associated to ecological structure of anurans and sand flies and, probably, to episodes of biotic expansion of anurans, suggesting a role of ecological fit in the anuran trypanosome assemblages. Ecological fitting refers to interspecific associations characterized by ecologically specialized, yet phylogenetically conservative, resource utilization. No matter how ecologically specialized an association between species, if geographical and/or ecological circumstances change, a parasite may switch to a new host species simple because they are sources of the same specialized resources. This has been considered a common process in host-parasite associations (Brooks & Ferrao, 2005). Host fitting resulting from biological adaptation of trypanosome lineages to closely related hosts leading to host switching appears to have played an important role in the evolution of the genus *Trypanosoma* (Hamilton et al., 2007).

The data from this study demonstrated that anuran and their trypanosomes have a complex evolutionary history, suggesting some patterns of host-parasite codivergence with host-switching, probably mediated by vectors, within an overall biogeographic and ecologic framework. It appears that anuran habitats, which determine their exposure to leeches and/or insect vectors; hydrographic basins (Amazonia, Pantanal and Atlantic Forest); ecological niches; and recent contact among populations from neighbouring biomes, with dispersion of both parasites and hosts from their areas of origin, all play important roles in the evolutionary history of anuran trypanosomes. However, the evolutionary history of anuran trypanosomes is far from being clearly understood. Elucidation of lineage segregation and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes and their vectors requires analysis of larger numbers of isolates from vertebrate and invertebrate hosts from a wide phylogeographic and ecogeographic range.

Acknowledgements

We are indebted to several collaborators and students for their inestimable help in the fieldwork during captures of anurans and sand flies. We specially thank Dr. Miguel T. Rodrigues for his invaluable help in the identification of anurans, which were all deposited in the amphibian collection of the Museum of Zoology of the University of São Paulo. We thank Dr. Erney P. Camargo for helpful criticisms of the manuscript. The fieldwork in Rondonia was carried out in the ICB5 field laboratory in Monte Negro. This work was supported by grants from the Brazilian agencies CNPq and FAPESP. Robson C. Ferreira is the recipient of a scholarship from FAPESP.

References

- Anderson JR, Ayala SC (1968) Trypanosome transmitted by Phlebotomus: first report from the Americas. *Science* **161**, 1023-1025.
- Arias JR, Miles MA, Naiff RD, *et al.* (1985) Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 1098-1108.
- Ayala SC (1970) Two new trypanosomes from California toads and lizards. *Journal of Protozoology* **17**, 370-373.
- Ayala SC (1971) Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. *Journal of Protozoology* **18**, 433-436.
- Ayala SC, McKay G (1971) *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. *Journal of Protozoology* **18**, 430-433.
- Bailey JK (1962) *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. *Experimental Parasitology* **12**, 155-163.
- Bardsley JE, Harmsen R (1973) The trypanosomes of anura. *Advances in Parasitology* **11**, 1-73.
- Barta JR, Boulard Y, Desser SS (1989) Blood parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of its parasites with those of eastern North American ranids in the context of host phylogeny. *Transactions of the American microscopical Society* **108**, 6-20.
- Brooks DR, Ferrao AL (2005) The historical biogeography of co-evolution: emerging infectious diseases are evolutionary accidents waiting to happen. *Journal of Biogeography* **32**, 1291-1299.
- Christensen HA, Telford SR (1972) *Trypanosoma thecadactyli* sp. n. from forest greckoes in Panama, and its development in the sandfly *Lutzomyia trinidadensis*. *Journal of Protozoology* **9**, 403-406.
- Desser SS (2001) The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *Journal Parasitology* **87**, 152-160.
- Desser SS, McIver SB, Jez D (1975) Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. *International Journal for Parasitology* **5**, 507-509.
- Desser SS, McIver SB, Ryckman A (1973) *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *Journal of Parasitology* **59**, 353-358.
- Feng LC, Chung HL (1940) *Phlebotomus squamirostris* Newstead, transmitter of *Trypanosoma bocagei* França in the toad, *Bufo bufo gargarizans* (Cantor). *Chinese Medical Journal Supplement* **3**, 198-211.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, *et al.* (2007) Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology in press*.
- Freitas RA, Naiff RD, Barrett TV (2002) Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapá, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 53-59.
- Frost DR, Grant T, Faivovich J, *et al.* (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **297**, 1-370.
- Galati EAB (2003) Classificação de Phlebotominae. In: *Flebotomíneos do Brasil* (ed. Lainson R), pp. 23-52. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Garda AA, Cannatella DC (2007) Phylogeny and biogeography of paradoxical frogs (Anura, Hylidae, Pseudoeurycea) inferred from 12S and 16S mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution in press*.
- Gibson WC, Lom J, Peckova H, Ferris VR, Hamilton PB (2005) Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using SSU rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. *Parasitology* **130**, 405-412.
- Gil LH, Basano SA, Souza AA, *et al.* (2003) Recent observations on the sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna of the State of Rondonia, Western Amazonia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 751-755.

- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR (2007) Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **in press**.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC (2005a) A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology* **35**, 431-443.
- Hoch A, Ryan L, Vexenat JA, Rosa AC, Barretto AC (1986) Isolation of *Leishmania braziliensis braziliensis* and other trypanosomatids from phlebotomines in a mucocutaneous leishmaniasis endemic area Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **81(Suppl.)**, 63.
- Johnson RN, Young DG, Butler JF (1993) Trypanosome transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaoboridae) to the green treefrog, *Hyla cinerea* (Anura: Hylidae). *Journal of Medical Entomology* **30**, 918-921.
- Lainson R, Shaw JJ (1979) The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: *Biology of Kinetoplastida* (eds. Lumsden WHR, Evans DA), p. 738. Academic Press.
- Lom J (1979) *Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish* Academic Press, London.
- Lun ZR, Desser SS (1996) Analysis of isolates within species of anuran trypanosomes using random amplified polymorphic DNA. *Parasitology Research* **82**, 22-27.
- Maia da Silva F, Junqueira ACV, Campaner M, *et al.* (2007) Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular Ecology* **in press**.
- Martin DS, Desser SS (1991a) Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A light and electron microscopic study. *Parasitology Research* **77**, 18-26.
- Martin DS, Desser SS (1991b) Infectivity of cultured *Trypanosoma fallisi* (Kinetoplastida) to various anuran species and its evolutionary implications. *Journal of Parasitology* **77**, 498-500.
- Martin DS, Desser SS, Hong H (1992) Allozyme comparison of three *Trypanosoma* species (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of toads and frogs by starch-gel electrophoresis. *Journal of Parasitology* **78**, 317-322.
- Martin DS, Wright AD, Barta JR, Desser SS (2002) Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences. *Journal of Parasitology* **88**, 566-571.
- McConnell E, Correa M (1964) Trypanosomes and other microorganisms from Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *Journal of Parasitology* **50**, 523-528.
- Naiff RD, Barrett TV, Freitas RA (1989) Isolation of *Trypanosoma freitasi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from *Psychodopygus clausi* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84**, 273-275.
- Pramuk JB (2006) Phylogeny of South American *Bufo* (Anura: Bufonidae) inferred from combined evidence. *Zoological Journal of the Linnean Society* **146**, 407-452.
- Ramos B, Urdaneta-Morales S (1977) Hematophagous insects as vectors for frog trypanosomes. *Revista de Biología Tropical* **25**, 209-217.
- Reilly BO, Woo PTK (1982a) The biology of *Trypanosoma andersoni* n. sp. and *Trypanosoma grylli* Nigrelli, 1944 (Kinetoplastida) from *Hyla versicolor* LeConte, 1825 (Anura). *Canadian Journal of Zoology* **60**, 116-123.
- Reilly BO, Woo PTK (1982d) Susceptibility of the leech, *Batrachobdella picta* (Verrill) to *Trypanosoma andersoni* Reilly and Woo and *Trypanosoma grylli* Nigrelli (Kinetoplastida). *Canadian Journal of Zoology* **60**, 1441-1445.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, *et al.* (2005) Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* **132**, 215-224.

- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Rotureau B, Gaborit P, Issaly J, *et al.* (2006) Diversity and ecology of sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coastal French Guiana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75**, 62-69.
- Ryan L, Lainson R, Shaw JJ (1987) Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará State, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania braziliensis* in the Serra dos Carajás. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 353-355.
- Shaw JJ, Rosa AT, Souza A, Cruz AC (2003) Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: *Flebotomíneos do Brasil* (eds. Rangel EF, Lainson R). Fiocruz.
- Siddall ME, Desser SS (1992) Alternative leech vectors for frog and turtle trypanosomes. *Journal of Parasitology* **78**, 562-563.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W (2001) The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology* **48**, 1-56.
- Telford SR (1995) The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles. In: *Parasitic protozoa* (ed. Kreier JP), pp. 161-223. Academic Press, New York.
- Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM (1971) Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **20**, 150-156.

A. Blood forms of anuran trypanosomes

B. Culture forms
anuran trypanosomes

sand fly trypanosomes

Figure 1. Microphotographs (Giemsa-stained) selected to illustrate the morphological diversity of trypanosomes nested into clade An03, the new lineage of closely related trypanosomes of anurans, bufonids and leptodactylids, and sand flies from Brazilian Amazonia: A, trypomastigotes found in blood smears of bufonids (a, c, d, f, g, h, i, j) or leptodactylids (b, e) of the following morphotypes (M): a-f, M3 (*T. leptodactily*-like); g, M5 (*T. fallisi*-like); h, M6; i-j, M12 (M6 and M16 were not associated with any previously reported trypanosome species). B, Culture forms of isolates from anurans (339, 364) or sand flies (120, 888). 1, Rosettes of small round forms in recent cultures; 2, Logarithmic-phase culture epimastigote forms; 3, Stationary-phase (~15 days) trypomastigote forms; 4-6, Stationary-phase trypomastigote forms induced when the flagellates were co-cultivated with Hi-5 insect cells. k, kinetoplast; f, flagellum; n, nucleus.

Figure 2. Phylogenetic trees inferred by Parsimony (A) and Bayesian (B) analysis of SSU rDNA sequences (based on an alignment of 3016 characters) of 54 trypanosomes, including 6 isolates from sand flies (◆) and 13 isolates from anurans of the Hylidae (●), Leptodactylidae (■), Bufonidae (▲), Leiuperidae (□) and Ranidae (◆) families from Brazil (BR), Africa (AFr), North America (NA) and Europe (EU). The Brazilian isolates from anuran and sand flies included in the analysis are from the Atlantic Forest (AF), the Pantanal (PA) and Amazonia (AM). The numbers at nodes correspond to Parsimony percentage bootstrap values derived from 100 replicates (A) or to Bayesian posterior probability values derived from 100 replicates (B).

Table 1. Hosts, biomes and geographical origin of trypanosome isolates from anurans and sand flies.

Trypanosomatid		Host origin		Geographic origin		Accession number
Isolate (TryCC) ^a		Family	Species	Biome ^b / Niche	Country/ State	Genbank SSUrDNA
Trypanosomes from anurans						
408		Leptodactylidae	<i>Engystomops petersi</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
444		Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	PA /terrestrial	BR/MS	
316		Leptodactylidae	<i>Leptodactylus chaquensis</i>	PA /terrestrial	BR/MS	
398		Leptodactylidae	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
858		Bufonidae	<i>Chaunus ictericus</i>	AF/ terrestrial	BR/SP	
364		Bufonidae	<i>Chaunus marinus</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
339		Bufonidae	<i>Chaunus marinus</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
346		Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
362		Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
399		Bufonidae	<i>Rhinella margaritifera</i>	AM/ terrestrial	BR/RO	
<i>T. mega</i>		Bufonidae	<i>Bufo regularis</i>		Congo	AJ009157
<i>T. fallisi</i>		Bufonidae	<i>Bufo americanus</i>		Canada	AF119806
646		Hylidae	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	AF/ arboreal	BR/SP	
358		Hylidae	<i>Phyllomedusa</i> sp	AM/ arboreal	BR/RO	
406		Hylidae	<i>Scinax rubber</i>	AM/ arboreal	BR/RO	
<i>T. rotatorium</i> B2II		Ranidae	<i>Rana catesbeiana</i>		Canada	AJ009161
<i>T. neveulemairei</i>		Ranidae	<i>Rana esculenta</i>		Yugoslavia	AF119809
<i>T. ranarum</i>		Ranidae	<i>Rana pipiens</i>		USA/MN	AF119810
<i>T. chattoni</i>		Ranidae	<i>Rana pipiens</i>		USA/MN	AF119807
Trypanosomatids from sand flies						
103 (M-17147)	T ^c	Psychodidae	<i>Evandromyia infraspinosa</i>	AM/ground level	BR/RO	
890 (IM-5212)	E ^d	Psychodidae	<i>Lutzomyia gomezi</i>	AM/canopy	BR/RO	
102 (M-17035)	E	Psychodidae	<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	AM/ canopy	BR/RO	
889 (IM-5174)	E	Psychodidae	<i>Psathyromyia dendrophyla</i>	AM/ canopy	BR/RO	
888 (IM-5173)	T	Psychodidae	<i>Sciopemyia servulolimae</i>	AM/ ground level	BR/RO	
101 (M-17033)	T	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	AM/ ground level	BR/RO	
120 (M-17036)	T	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	AM/ ground level	BR/RO	
1155 (M-7790)	T	Psychodidae	<i>Sciopemyia sordellii</i>	AM/ ground level	BR/PA	
887 (IM-5171)	T	Psychodidae	<i>Sciopemyia</i> sp	AM/ ground level	BR/RO	

a, TryCC, correspond to number codes of isolates cryopreserved in the Trypanosomatid Culture Collection of the Department of Parasitology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

b, Geographic origin (biomes) of anurans or sand flies from which cultures were isolates: AM, Amazonia; AF, Atlantic Forest; PA, Pantanal.

c, T corresponds to species of genus *Trypanosoma*; d, E corresponds to species of genus *Endotrypanum*