Laerte Bento Viola

**Diversidade morfológica e molecular e filogenia de
isolados Brasileiros de tripanossomas de cobras, jacarés
e lagartos**

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

**Área de concentração:
Relação Parasita-Hospedeiro**

**Orientador:
Profa. Dra. Marta Maria Gerales
Teixeira**

**São Paulo
2007**

RESUMO

Viola L. B. Diversidade morfológica e molecular e filogenia de isolados Brasileiros de tripanossomas de cobras, jacarés e lagartos [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Tripanossomas vêm sendo descritos em lagartos, tartarugas, crocodilos e cobras de todos os continentes há muito tempo. Esses tripanossomas têm sido classificados de acordo com a morfologia de formas sanguíneas e hospedeiro de origem. No entanto, esses critérios tradicionais não são suficientes para a descrição de espécies, gerando várias sinonímias. A classificação confiável de tripanossomas requer a utilização de parâmetros tradicionais em conjunto com análises filogenéticas moleculares. Apesar de diversas descrições de tripanossomas em répteis na América do Sul, nenhuma cultura havia sido estabelecida e apenas seis isolados haviam sido incluídos em análises filogenéticas, que se posicionavam como um grupo polifilético em todas as filogenias. Com o intuito de avaliar a diversidade morfológica e molecular, e as relações filogenéticas entre esses tripanossomas, répteis foram capturados na Mata Atlântica, Pantanal e Amazônia. Levantamentos de tripanossomas no sangue desses animais, realizados por microhematócrito e hemocultura, revelaram, em geral, prevalências e parasitemias baixas nos grupos examinados: cobras (2,4%), jacarés (11,6%) e lagartos (2,3%). Vinte e sete isolados foram estabelecidos em cultura: 9 de lagartos, 8 de cobras e 10 de jacarés. Esses isolados apresentaram diferenças morfológicas e de crescimento em cultura. As culturas obtidas de lagartos são as primeiras da América do Sul, enquanto as de jacarés e cobras são as únicas disponíveis desses animais. As análises filogenéticas de tripanossomas de répteis realizadas neste estudo usando seqüências dos genes SSU rRNA e *gGAPDH* corroboram a polifilia de tripanossomas de répteis. Apesar da significativa divergência de seqüências, os 8 isolados de cobra formaram um grupo monofilético que incluiu também um tripanossoma de flebotomíneo. Esse grupo se posicionou mais perto do clado formado por isolados de lagartos da África e América do Norte formando um clado constituído por isolados de cobras e lagartos. A composição desse clado sugere uma associação com hospedeiros da ordem Squamata e que flebotomíneos sejam importantes na transmissão destes tripanossomas. As análises de polimorfismo revelaram dois genótipos entre os isolados de jacarés, que se posicionaram juntos em um clado que também contém tripanossomas de crocodilo africano (*T. grayi*) e de aves, sugerindo uma associação com hospedeiros do grupo Archosauria. Os 9 isolados de lagarto obtidos (8 do Brasil e um de Moçambique, África) agruparam juntos, constituindo um grupo monofilético posicionado próximo de tripanossomas de anuros, distante de todos os outros isolados de lagartos. Assim, filogenias geradas usando análises independentes e combinadas dos genes SSU rRNA e *gGAPDH* corroboram a complexidade e histórias evolutivas separadas de tripanossomas de cobras, jacarés e lagartos. Os dados

morfológicos e moleculares resultantes deste estudo permitiram distinguir 7 novas espécies de tripanossomas: duas de cobras, duas de jacarés e três de lagartos.

Palavras-chave: Trypanosoma, Répteis, Genes ribossômico, Filogenia, Flebotomíneos, Taxonomia.

ABSTRACT

Viola L B. Morphological and molecular diversity and phylogeny of Brazilian isolates of trypanosomes from snakes, caimans and lizards [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Trypanosomes have been described since long in lizards, tortoises, crocodiles and snakes of all continents. Classification of these trypanosomes has been done according to the morphology of blood forms and host of origin. Nevertheless, these traditional criteria are not sufficient for species description, generating numerous synonymies. Reliable classification of reptilian trypanosomes requires analysis based on both traditional parameters and molecular phylogeny. Despite several descriptions of trypanosomes infecting reptiles in South America, no culture has been established until the present study, and only six species were included in phylogenetic studies. Data suggested a complex evolutionary history for these trypanosomes, which were clearly positioned as a polyphyletic group in all phylogenies. Aiming to evaluate morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships of reptilian trypanosomes, reptiles were captured in the Atlantic Forest, Pantanal and Amazonia biomes. Surveys for trypanosomes in blood samples carried out by microhaematocrit and hemoculture methods disclosed, in general, low prevalences and parasitemias in all groups examined: snakes (2,4%), caimans (11,6%) and lizards (2,3%). Twenty-seven isolates were established in continuous cultures: 9 from lizards, 8 from snakes and 10 from caimans. Cultures of these isolates displayed distinct morphology and growth behavior, representing the first cultures of lizard trypanosomes from South America and the only available cultures from caimans and snakes. The phylogenetic analysis of the reptile trypanosome performed using SSU rRNA and *gGAPDH* gene sequences corroborated the polyphyly of reptile trypanosomes. Despite significant sequence divergence, the 8 snake isolates formed a monophyletic assemblage that included a trypanosome from a sand fly, which was positioned closest to the clade formed by lizard isolates from Africa (*T. varani*) and North America (*T. scelopori*). The clade harboring snake and lizard trypanosomes suggests an association with Squamata hosts, with evidence that sand flies play an important role in the transmission of these trypanosomes. Polymorphism analysis revealed two genotypes of caiman trypanosomes positioned together in a clade that also comprises isolates from crocodile (*T. grayi*) and birds, suggesting a pattern of association with archosaurian hosts. All the 9 lizard isolates obtained in this study (8 from Brazil and one from Mozambique, Africa) clustered together constituting a monophyletic group positioned closest to anuran trypanosomes and distant from all other lizard isolates. Therefore, phylogenies generated using independent and combined analysis of SSU rDNA and *gGAPDH* genes corroborated the great complexity and separated evolutionary histories of trypanosomes from snakes, caimans and lizard. Altogether, morphological and molecular data from this study permitted the

identification of 7 new trypanosome species: two from snakes, two from caimans and three from lizards.

Keywords: Trypanosome, Reptile, Ribosomal genes, Phylogeny, Phebotomines, Taxonomy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia do gênero *Trypanosoma*

Os parasitas do gênero *Trypanosoma* são protozoários uniflagelados pertencentes ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963; Cavalier-Smith, 1981; 1998; 2004). A ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963) se caracteriza pela presença do cinetoplasto, que é uma região especializada da única mitocôndria destes organismos, constituída por moléculas circulares de DNA concatenadas, localizadas na base do flagelo e que contém o DNA mitocondrial (Simpson, 1987, Stuart e Feagin, 1992).

A monofilia do filo Euglenozoa está bem estabelecida por critérios morfológicos e moleculares; entretanto, a posição deste filo em relação aos outros protozoários é ainda bastante controversa (Simpson e Roger, 2004). Estudos filogenéticos que incluíram um grande número de cinetoplastídeos e de espécies de outras classes do filo Euglenozoa apóiam a hipótese de que os cinetoplastídeos são mais próximos filogeneticamente dos diplomonídeos do que dos euglenídeos, e que os tripanossomatídeos formam um grupo monofilético que evoluiu dos bodonídeos de vida livre (Maslov *et al.*, 2001; Preisfeld *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Simpson e Roger, 2004; Moreira *et al.*, 2004). Entretanto, como as hipóteses são baseadas em filogenia molecular, diferentes histórias evolutivas foram propostas para os cinetoplastídeos, dependendo dos organismos analisados, dos genes utilizados, das análises realizadas e dos grupos externos escolhidos (Lukes *et al.*, 2002; Stevens e Rambaut, 2001; Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Hughes e Piontkivska, 2003a; Von der Heyden *et al.*, 2004; Simpson e Roger, 2004).

As espécies da ordem Kinetoplastida estão divididas em duas subordens: a) Trypanosomatina, cujos membros são todos endoparasitas obrigatórios; b) Bodonina, que compreende protozoários de água doce ou salgada (vida livre), ectoparasitas ou endoparasitas de animais aquáticos. A subordem Trypanosomatina apresenta apenas a família Trypanosomatidae, com uma grande diversidade de hospedeiros, de plantas a animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, com ampla distribuição nos diferentes continentes. Essa família compreende parasitas monoxênicos, que apresentam apenas um hospedeiro invertebrado, e heteroxênicos, quando participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros, um invertebrado e um vertebrado ou vegetal (Wallace, 1966, 1979; Vickerman, 1994; Simpson *et al.*, 2006).

De acordo com a taxonomia tradicional, que é baseada em parâmetros morfológicos, hospedeiros de origem e nos ciclos de vida, os tripanossomatídeos estão classificados em 8 gêneros: *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas* (heteroxênicos) e *Crithidia*, *Leptomonas*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* (monênicos) (Wallace, 1966; 1979). Novos gêneros foram recentemente propostos: *Wallaceina*

e *Sergeia* (Merzlyak *et al.*, 2001; Svobodová *et al.*, 2007)

Novas propostas de classificação dos tripanossomatídeos têm sido geradas em estudos realizados com um grande número de espécies, baseados em características morfológicas, biológicas e moleculares, e no posicionamento taxonômico dos membros do filo Euglenozoa. Inicialmente, Cavalier-Smith (1981) posicionou apenas os euglenídeos e cinetoplastídeos no filo Euglenozoa, que mais tarde passou a incluir os diplomemídeos (Dolezel *et al.*, 2000; Preisfeld *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Cavalier-Smith, 1998; 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 (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).

Em um estudo baseado em filogenia molecular foi proposta a reclassificação dos organismos da classe Kinetoplastea em duas subclasses: a) Prokinetoplastina, contendo as espécies basais *Ichtyobodo necator* e *Perkinsiella amoebae*; b) Metakinetoplastina, compreendendo a ordem Trypanosomatida e três novas ordens, Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida. De acordo com esta classificação a ordem Trypanosomatida abriga 11 gêneros da família Trypanosomatidae: a) *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania*, *Sauroleishmaniam*, *Trypanosoma*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Rynchoidomonas* (Moreira *et al.*, 2004).

A diversidade de hospedeiros das espécies do gênero *Trypanosoma* é imensa, com centenas de espécies descritas em vertebrados, abrangendo peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. As espécies deste gênero apresentam ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados hematófagos. A maioria das espécies se desenvolve em artrópodes hematófagos, que pertencem a diversas ordens e famílias. Em geral, os tripanossomas de mamíferos são transmitidos por moscas e hemíperos e pulgas, enquanto os de aves pode ser veiculados por uma variedade de artrópodos. Os tripanossomas de peixes e outros vertebrados aquáticos são transmitidos por sanguessugas. Entre os anuros e lagartos terrestres, tripanossomas são transmitidos, principalmente, por flebotomíneos e mosquitos (culicídeos) (Hoare, 1972; Molineux, 1977; Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007b).

A maior parte dos estudos sobre tripanossomatídeos têm se concentrado nos patógenos humanos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. A maioria dos tripanossomas não é patogênica para o homem, o que tem comprometido o conhecimento da diversidade desses organismos. Recentemente, estudos bastante abrangentes de características biológicas, celulares, bioquímicas e moleculares de um grande número de flagelados do filo Euglenozoa estão sendo realizados a fim de validar, ou não, as novas propostas de classificação dos cinetoplastídeos, inclusive de alguns gêneros de tripanossomatídeos e subgêneros de *Trypanosoma* bastante controversos (Lukes *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 2001; Hughes e Piontkivska, 2003b;

Moreira *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 2007).

Os parasitas do gênero *Trypanosoma* podem se apresentar sob as formas amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota, definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante. As formas tripomastigotas são encontradas nos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sangüíneos) e invertebrados (tripomastigotas metacíclicos). As demais formas são espécies-dependentes, ocorrendo nos vertebrados (amastigotas intracelulares) e invertebrados (promastigotas e epimastigotas) (Hoare, 1972).

Hoare (1972) dividiu os tripanossomas de mamíferos nas secções Stercoraria e Salivaria, de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado. O local de desenvolvimento e diferenciação das formas infectantes nos invertebrados determinam a via de transmissão dos tripanossomas, que pode ser com as fezes (transmissão contaminativa) ou com saliva (transmissão inoculativa) (Hoare, 1972).

A Secção Salivaria compreende as espécies que no inseto vetor (mosca tsétsé) se desenvolvem no tubo digestivo, algumas podem também se desenvolver nas glândulas salivares (*T. brucei*). Todas essas espécies são transmitidas com a inoculação, durante a picada do vetor, de formas tripomastigotas metacíclicas junto com a saliva. Esta secção compreende os subgêneros *Duttonella*, *Trypanozoon*, *Pycnomonas*, *Nannomonas*, que abrangem todos os tripanossomas africanos geralmente patogênicos para seus hospedeiros mamíferos. *T. vivax*, *T. evansi* e *T. equiperdum* se adaptaram à transmissão mecânica e, por esta razão, são as únicas espécies deste grupo que ocorrem fora do continente Africano, sendo as duas primeiras existentes no Brasil (Hoare, 1972; Ventura *et al.*, 2000; 2001; Cortez *et al.*, 2006).

Na secção Stercoraria, que compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewis*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (Hoare, 1964; 1972), estão classificadas as espécies que se desenvolvem exclusivamente no tubo digestivo do inseto vetor, sendo transmitidas pela contaminação com formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas com as fezes dos vetores. Os tripanossomas dessa secção apresentam ampla distribuição geográfica. Entretanto, algumas espécies como *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) e *T. rangeli* (*Herpetosoma*) são encontradas apenas nas Américas Central e do Sul (Hoare, 1972; Guhl e Vallejo, 2003; Maia da Silva *et al.*, 2004 a,b; 2007). A maioria das espécies desta secção não infecta o homem e não é patogênica para seus hospedeiros vertebrados, com exceção de *T. cruzi*.

Figura 1. Morfologia das formas sanguíneas observadas nas primeiras descrições de tripanossomas em répteis (revisado em Wenyon, 1965; *T. cecili*, Laison, 1977).

Apenas os tripanossomas de mamíferos foram classificados em secções, subgêneros, espécies e subespécies. Ao contrário desses tripanossomas, não existem parâmetros taxonômicos claramente definidos e aceitos 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 a morfologia, o hospedeiro de origem e a origem geográfica como critérios taxonômicos. Esta conduta gerou várias espécies de tripanossomas sem critérios confiáveis. Muitas espécies não têm sido corroboradas com os estudos filogenéticos moleculares (Figura 1).

1.2. Filogenia da família Trypanosomatidae

A origem do parasitismo na família Trypanosomatidae é um tema bastante estudado e discutido. Diversas teorias tentam explicar se os organismos 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. Com o advento dos estudos filogenéticos moleculares foi demonstrado que o parasitismo de invertebrados e vertebrados, que levou ao surgimento dos ciclos heteroxênicos, ocorreu, independentemente, várias vezes ao longo da evolução dos tripanossomatídeos (Vickerman, 1994; Maslov e Simpson, 1995; Haag *et al.*, 1998; Wrigth *et al.*, 1999; Dolezel *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2001; Lukes *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2007).

De acordo com estudos filogenéticos recentes os tripanossomatídeos, provavelmente divergiram de bodonídeos de vida livre (Simpson *et al.*, 2002; Simpson e Roger, 2004; Moreira *et al.*, 2004). Desses estudos surgiu a hipótese de um bodonídeo aquático ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao parasitismo no intestino, dando origem aos tripanossomatídeos de insetos. Tripanossomatídeos parasitas de insetos hematófagos devem ter sido transmitidos para vertebrados e se adaptaram ao parasitismo, levando, assim, ao surgimento dos gêneros heteroxênicos, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma*. Os tripanossomatídeos passaram então a circular entre insetos e vertebrados terrestres. De acordo com essa hipótese, o gênero *Trypanosoma* é monofilético e a origem dos tripanossomas de peixes, anfíbios e sanguessugas deve ter sido um evento secundário (Hamilton *et al.*, 2004; 2007; Simpson, 2006).

Estudos filogenéticos iniciais baseados em seqüências de SSUrRNA sugeriram que o gênero *Trypanosoma* era polifilético (Maslov *et al.*, 1996). Estudos posteriores, baseados neste mesmo gene e incluindo um número maior de taxa, demonstraram a monofilia do gênero *Trypanosoma* (Haag *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1999b; 2001). Esses estudos foram questionados em um estudo baseado no mesmo gene, utilizando diferentes “outgroups” e diferentes métodos de inferências filogenéticas, cujos resultados mostraram a polifilia do gênero *Trypanosoma* (Hughes e Piontkivska, 2003).

Entretanto, outros estudos filogenéticos, também recentes, evidenciaram outras topologias para as árvores filogenéticas dos tripanossomatídeos, discordando das hipóteses de que as espécies monoxênicas de insetos foram os primeiros a divergir na família Trypanosomatidae. Esses estudos corroboram a monofilia dessa família e a posição dos bodonídeos, porém, sugerem que os primeiros organismos a divergir foram os tripanossomas africanos da Secção Salivaria e que o gênero *Trypanosoma* é polifilético (Haag *et al.*, 1998; Hughes e Piontkivska, 2003; Piontkivska e Hughes, 2005).

Seqüências codificadoras de proteínas utilizadas para inferir a história evolutiva do gênero *Trypanosoma* apontaram a monofilia deste gênero (Wiemer *et al.*, 1995; Hashimoto *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 1996). Estudos baseados em seqüências do gene *gGAPDH* (Hannaert *et al.*, 1998) e HSP90 (Simpson *et al.*, 2002) também sustentaram a monofilia do gênero *Trypanosoma*.

Filogenias realizadas com um grande número de espécies, representativas de todos os grupos e linhagens, baseadas em seqüências independentes e combinadas dos genes SSUrRNA e *gGAPDH*, demonstraram a monofilia do gênero *Trypanosoma* (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004; 2005a; 2007). Esses estudos apóiam a hipótese de uma origem comum de todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, com os tripanossomas do clado aquático (peixes e anuros) sendo os primeiros a divergir do ancestral comum (Stevens *et al.*, 1998; 1999b; 2001; Lukes *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2004; 2005a).

Apesar da controvérsia a respeito da filogenia da família Trypanosomatidae e da monofilia do gênero *Trypanosoma*, na maioria dos estudos filogenéticos foram definidos, inicialmente, três grandes clados no gênero *Trypanosoma*: clado *T. brucei*, clado *T. cruzi* e clado Aquático. Com a inclusão de novas taxa nos estudos filogenéticos novos clados foram estabelecidos: clado *T. lewisi*, clado *T. theileri*, clado *T. cyclops*, clado *T. avium*, clado *T. avium/T. corvi* e clado de lagartos (Stevens *et al.*, 1998; 1999b; 2001; Hamilton *et al.*, 2004; 2005a; 2007) (Figura 2).

Clado *T. brucei*: Neste clado foram posicionados todos os tripanossomas de origem africana que infectam mamíferos, incluindo o homem. As espécies deste clado divergem bastante das demais espécies de tripanossomas, sugerindo uma história evolutiva distinta, confinada à África e associada com moscas tse-tsé. (Stevens *et al.*, 1999; 2001).

Clado *T. cruzi*: Este clado é constituído pelas espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi* e tripanossomas exclusivos de morcegos) além de um tripanossoma de canguru isolado na Austrália. Análises biogeográficas sugerem que este clado pode ter se originado no super-continente América do Sul/ Antártica/ Austrália em um ancestral dos marsupiais, após a separação da África (Stevens *et al.*, 1999b; 2001). *T. rangeli* foi separado desse clado em estudos recentes (Maia da Silva *et al.*, 2004 a ;2007).

Clado Aquático: Compreende principalmente tripanossomas de vertebrados aquáticos e anfíbios, inclui um isolado de ornitorrinco e um isolado de tartaruga. Aparentemente, este clado está relacionado com os vetores sanguessugas aquáticas. Jakes *et al.*, (2001 a,b) mostrou um forte relacionamento entre *T. binneyi* (ornitorrinco) e *T. chelodina* (tartaruga), que pode ser indicativo de um evento de troca de hospedeiro mediada por sanguessugas. O clado aquático foi recentemente dividido nos clados peixe e anuro, nenhum monofilético (Hamilton *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007).

Figura 2. Árvore baseada na SSU rDNA (1986 caracteres) utilizando seqüências de tripanosomas e tripanossomatídeos, construída pelo método de máxima verossimilhança (ML). Os números correspondem aos valores de suporte por "bootstrap" (ML), probabilidade a posteriori (Bayesiana), suporte por "bootstrap" (parcimônia) e suporte por distância de ML. (*) corresponde a valores iguais a 100% em todos os testes e (-) a valores menores que 50%. Tripanossomas em negrito representam espécies de tripanossomas de répteis. Modificada de Hamilton et al., (2007).

Clado *T. lewisi*: Este clado compreende diversos tripanossomas de roedores e um tripanossoma de coelho. Os organismos desse grupo são transmitidos por pulgas e apresentam grande especificidade pelo hospedeiro vertebrado (Hamilton *et al.*, 2005b).

Clado *T. theileri*: Este clado agrupa tripanossomas de hospedeiros da Ordem Artiodactyla (boi, búfalo, cabra, ovelha, cervo, etc) que são muito relacionados. Tabanídeos desempenham um importante papel na transmissão destes tripanossomas (Rodrigues *et al.*, 2003; 2006).

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

Clados *T. avium*/*T. corvi*: Esses subclados são compostos por tripanossomas de aves formando um clado que compreende a maioria dos isolados de aves, exceto *T. benetti* (Votýpka *et al.*, 2004).

1.3. Taxonomia e evolução dos répteis

Segundo as definições dos “répteis” atuais, este grupo constitui a classe Reptilia de vertebrados tetrápodos e ectotérmicos que estão divididos em três grupos: Chelonia (tartarugas), Archosauria (crocodilos e aves) e Lepdosaria (lagartos, serpentes, tuataras). Como todos os vertebrados que possuem quatro patas, pernas ou apêndices, estes animais evoluíram de um ancestral aquático durante o período Devoniano, cerca de 408-360 milhões de anos atrás. Por volta de 360 milhões de anos surgiram os primeiros anfíbios (labirintodontes), que viviam à beira dos rios e pântanos, pois ainda não conseguiam se desligar totalmente da água. No Permiano surgiram os Seymouria que apresentavam características de anfíbios e répteis que sofreram inúmeras transformações e, pouco a pouco, formou-se um grupo de animais que podia sobreviver sem voltar à água, os répteis. Os répteis mais primitivos (cotilossauros) assemelhavam-se anatomicamente aos anfíbios primitivos, vivendo a maior parte do tempo na água e colocando seus ovos na terra. A conquista do ambiente terrestre por esses vertebrados aquáticos foi um importante evento evolutivo que necessitou de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais (Carroll, 1988; Benton e Harper, 1997; Clack, 2002).

Os répteis são encontrados principalmente nas regiões tropicais, com um menor número de espécies vivendo em regiões temperadas e nenhuma na Antártida. Esses animais podem ser ovíparos, ovovivíparos e vivíparos. A maioria das espécies de répteis é insetívora, mas existem lagartos herbívoros (como as iguanas), omnívoros (alguns lacertídeos), durófagos e alguns são predadores ativos (especialmente lagartos monitores do gênero *Varanus* e várias serpentes) (Evans, 2003).

Os animais classicamente chamados de répteis são representados por quatro ordens: Squamata (lagartos, ~8.000 espécies); Testudinata (tartarugas, ~ 300 espécies); Crocodylia (crocodilos, gaviais e jacarés: 23 espécies); Rhynchocephalia (tuataras, 2 espécies) (Pough *et al.*, 2003).

Inúmeros estudos baseados em análises morfológicas e filogenéticas moleculares demonstraram que as classes Reptilia e Aves são muito relacionadas e que os répteis não formam um grupo monofilético (Gauthier, 1986, 1994; Hedges e Poling, 1999), (Figura 3). Embora lagartos, serpentes e jacarés ainda continuem sendo chamados de répteis, são classificados no táxon Diapsida, grupo que inclui as Aves e espécies das ordens Crocodylia, Rhynchocephalia, Squamata (lagartos, serpentes e amphisbaenia), além de grupos fósseis, entre eles os dinossauros (Rest *et al.*, 2003; Evans, 2003; Iwabe *et al.*, 2005; Pough *et al.*, 2003). Portanto, todos os membros do grupo denominado Reptilia, exceto os anapsídeos (quelônios), são diapsídeos. O nome Diapsida significa “dois arcos” e refere-se à presença de duas aberturas, uma superior e outra inferior, na região temporal do crânio (Benton, 1985).

A história evolutiva do grupo Diapsida é bastante complexa, essa linhagem evolui sob múltiplas formas, ocupando diferentes nichos ecológicos desde o período Carbonífero (350 milhões de anos), quando eles eram representados pelos primeiros diapsídeos (*Petrolacosaurus*) que eram mais similares aos lagartos atuais (Reisz, 1977). Os Diapsidas atuais são divididos em dois grupos, Archosauromorpha e Lepidosauromorpha. Archosauromorpha inclui, além dos extintos Dinossauros, Crocodylia e Aves atuais. Lepidosauromorpha contém Tuatara e todas as espécies de Squamata (Pough *et al.*, 2003).

Figura 3. Relacionamento entre os principais grupos de “répteis”. (A) Filogenia clássica baseada em dados morfológicos e de fósseis (Romer, 1966, Benton 1997). (B) Filogenia baseada em máxima verossimilhança de seqüências combinadas de 11 proteínas nucleares (1943 aminoácidos). Barra indica substituições de aminoácidos por sítio. (C). Filogenia consenso de seqüências combinadas de 4 genes que codificam proteínas nucleares (785 aminoácidos). Os valores nos nós das árvores correspondem aos valores de suporte segundo os métodos: “interior branch test”, análise de “bootstrap” de neighbor-joining, máxima verossimilhança e máxima parsimônia, respectivamente. (Hedges & Poling, 1999).

O ancestral de todos os representantes da Superordem Archosauria provavelmente surgiu há ~250 milhões de anos, no Permiano e seus descendentes, incluindo os dinossauros, rapidamente se espalharam por todos os continentes e se tornaram os vertebrados dominantes na terra durante a maior parte do Mesozóico. Dessa linhagem, atualmente existem vivos apenas as aves e os crocodilianos (Pough *et al.*, 2003). Os crocodilianos modernos são animais semi-aquáticos, mas apresentam patas bem desenvolvidas e algumas espécies realizam extensos movimentos pela terra. Eles estão atualmente incluídos na classe Archosauromorpha, ordem Crocodylia. Essa ordem apresenta duas famílias: Alligatoridae, que abrange os

gêneros *Alligator*, *Caiman*, *Melanosuchus* e *Paleosuchus* e Crocodylidae, que compreende os gêneros *Crocodylus*, *Osteolaerus*, *Tomistoma* e *Gavialis*. A posição da família Gavialidae também é controversa segundo dados morfológicos e moleculares. Os estudos morfológicos posicionam esta família como grupo ancestral dos crocodilianos e as filogenias moleculares recentes posicionam esta família dentro da família Crocodylidae (Roos *et al.*, 2007).

As espécies de Squamata representam o segundo maior grupo de tetrápodes vivos (~8000 espécies); duas vezes mais espécies do que os mamíferos (Zug, 1993, Vidal e Hedges, 2005). Os lagartos vivem em regiões que variam desde florestas a regiões desérticas, possuem hábitos distintos (arborícola, terrestre, aquático e fossorial), podem ser insetívoros, onívoros, herbívoros ou eficientes predadores e variam de poucos centímetros a mais de 3 metros de comprimento. São animais amplamente dispersos e muito diversificados, agrupados em diversas linhagens, dificultando assim os estudos taxonômicos e filogenéticos. Existem muitas controvérsias sobre o relacionamento entre os principais grupos (infraordem) de Squamata (Hedges e Poling, 1999; Vidal e Hedges, 2005; Douglas *et al.*, 2006), principalmente pela falta de depósitos fósseis registradas durante o período Triássico (Evans, 2002).

Ainda hoje, mesmo com estudos filogenéticos baseados em seqüências mitocondriais completas, as relações filogenéticas entre as espécies de Crocodylia, Squamata e Testudinata ainda não estão completamente esclarecidas. As relações filogenéticas e taxonômicas entre os répteis ainda parece ser um assunto bastante polêmico e controverso. Diferentes hipóteses tentam explicar a história evolutiva desses animais, que apresentam pontos muito polêmicos como a origem das serpentes (terrestre ou marinha) e a posição delas em relação aos lagartos (Douglas *et al.*, 2006).

A posição das tartarugas como ancestral de todos os répteis ou como grupo irmão de Archosauria é ainda polêmica. Os primeiros estudos filogenéticos posicionavam Testudines como ancestral de todos os outros vertebrados. Gauthier *et al.* (1988a, b, c) posicionou as espécies de Testudines como grupo irmão dos Diapsidas (Lepidosauria e Archosauria). Outros trabalhos têm sugerido diferentes filogenias. Rieppel (1994, 1995) e DeBraga e Rieppel (1997) posicionaram Testudines em um clado monofilético com Lepidosauria, grupo irmão de Archosauria, mantendo os Mammalia ancestrais desses vertebrados. Estudos filogenéticos moleculares recentes mostraram que Archosauromorpha (crocodilianos e aves) são mais relacionados com as tartarugas do que com Lepidosauromorpha (Squamatas e Tuatara); formando um grupo monofilético composto por Archosauromorpha e tartarugas (Zardoya e Meyer, 1998; Hedges e Poling, 1999; Rest *et al.*, 2003; Iwabe *et al.*, 2005) (Figura 3).

1.4. Tripanossomas de répteis – Diapsida

1.4.1. Taxonomia e filogenia

Ao contrário dos tripanossomas de mamíferos, não existem propostas de classificação para os tripanossomas de répteis. Até o momento, aproximadamente 80 espécies do gênero *Trypanosoma* foram descritas nestes animais em todos os continentes: 42 em lagartos, 14 em quelônios, 3 em crocodilianos e 21 em serpentes (Tabela 1, 2 e 3).

Tradicionalmente, estes parasitas são classificados de acordo com a morfologia das formas sanguíneas, hospedeiro de origem e origem geográfica. Infelizmente, estes parâmetros taxonômicos não são suficientes e muitas espécies devem ser sinônimas, enquanto outras foram classificadas apenas como *Trypanosoma* sp. (Telford, 1995).

Os lagartos são os únicos animais, além dos mamíferos, que são infectados por espécies do gênero *Leishmania*, classificadas no subgênero *Sauroleishmania* sendo essas espécies não infectivas para os mamíferos e vice-versa (Telford, 1975, Lainson e Shaw, 1987; Noyes *et al.*, 1998).

Os estudos filogenéticos moleculares do gênero *Trypanosoma* analisaram 6 isolados de tripanossomas de répteis. Apesar do pequeno número de amostras, esses estudos já demonstraram a polifilia deste grupo, que foi dividido em três ramos distantes nas árvores filogenéticas: (Figura 2)

a) *T. theezieni* (Brygoo, 1963a), isolado de um camaleão africano (*Chamaeleo brevicornis*), agrupou com isolados de anuros, próximos de isolados de peixes e de quelônio (*T. chelodina*) que juntos formam o “clado aquático”

b) *T. varani* (Taylor, 1929), isolado de lagarto africano (*Varanus exanthematicus*), *T. scelopori* (Ayala, 1970) de lagarto Norte Americano (*Sceloporus occidentalis*) e *T. sp.* gecko de lagarto africano (*Tarentola annularis*) formam um grupo, denominado clado dos lagartos, proposto por Hamilton *et al.* (2007), posicionado próximo do clado *T. brucei*, que compreende parasitas de mamíferos de origem africana.

c) *T. grayi*, tripanossoma de crocodilo africano transmitido por tsétsé, é o único isolado de crocodiliano nas análises filogenéticas e foi posicionado próximo de *T. bennetti* (isolado de ave) (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004, 2005, 2007).

Tabela 1 Espécies de tripanossomas de lagartos descritos em diferentes famílias.

Família	Hospedeiro de origem Espécie	Espécie de tripanossoma	Origem geográfica	Referência
Gekkonidae	<i>Phelsuma madagascariensis</i>	<i>T. peterri</i>	EUR (Turquia)	Brygoo (1966b)
	<i>Hemidactylus brookii</i>	<i>T. garnhami</i>		Grewal (1955) ^a
	<i>Tarentola mauritanica</i>	<i>T. platydactyli</i>	EUR (Tunisia)	Catouillard (1909) ^a
	<i>Hemidactylus turcicus</i>	<i>T. turcici</i>		Marinkelle e Al-Mahdawi (1980) ^a
	<i>Lygodactylus luteopicturatus</i>	<i>T. lygodactyli</i>	AF (Tanzânia)	Telford (1995a)
	<i>L. grotei</i>	<i>T. lygodactyli</i>		
	<i>Hemidactylus platycephalus</i>	<i>T. lygodactyli</i>		
	<i>Cnemaspis barbouri</i>	<i>T. cnemaspi</i>	AF (Tanzânia)	Telford (1995a)
	<i>Hemidactylus platycephalus</i>	<i>T. cnemaspi</i>		
	<i>Lygodactylus luteopicturatus</i>	<i>T. uluguruensis</i>	AF (Tanzânia)	Telford (1995a)
	<i>L. grotei</i>	<i>T. uluguruensis</i>		
	<i>Hemidactylus platycephalus</i>	<i>T. uluguruensis</i>		
	<i>Hemidactylus platycephalus</i>	<i>T. kimbozae</i>	AF (Tanzânia)	Telford (1995a)
	<i>Thecadactylus rapicaudal</i>	<i>T. thecadactyli</i>	AC (Panamá)	Christensen e Telford (1972)
	<i>Gonatodes albogularis</i>	<i>T. gonatodi</i>	AC (Panamá)	Telford (1979b)
	<i>Gonatodes teniae</i>	<i>T. torrealbai</i>	AS (Venezuela)	Telford (1979b)
	<i>Phyllodactylus ventralis</i>	<i>T. torrealbai</i>		
	<i>Eublepharis kuroiwae</i>	<i>T. ryukyuense</i>	AS (Japão)	Miyata (1977) ^a
	<i>Gekko gecko</i>	<i>T. gekkonis</i>	AS (Tailândia)	Telford (1995a)
	<i>Hemidactylus frenatus</i>	<i>T. phlebotomi</i>	AS (Índia)	Mackie (1914) ^a
	<i>Phyllurus platurus</i>	<i>T. phylluri</i>	AUS (Austrália)	Mackerras (1961) ^a
	<i>Hemithysconyx caudiscincus</i>	<i>T. gallayi</i>	AF	Bouet (1909) ^a
	<i>Hemidactylus triedrus</i>	<i>T. pertenuae</i>	AS (Sri Lanka)	Robertson (1908) ^a
	<i>H. leschenaulti</i>	<i>T. pertenuae</i>		Mello e Lobo (1938) ^a
	<i>H. brookii</i>	<i>T. pertenuae</i>		
	<i>Hemidactylus leschenaulti</i>	<i>T. leschenaulti</i>	AS (Sri Lanka)	Robertson (1908) ^a
	<i>Hemidactylus gleadowii</i>	<i>T. hemidactyli</i>	AS (Índia)	Mackie et al. (1923) ^a
	<i>H. coctoei</i>	<i>T. hemidactyli</i>		
	<i>Thecadactylus rapicaudal</i>	<i>T. ocumarensis</i>	AS (Venezuela)	Scorza e Dagert (1955) ^a
Cordylidae	<i>Zonosaurus madagascariensis</i>	<i>T. betschi</i>	EUR (Turquia)	Brygoo (1966a)
	<i>Cordylus cordylus</i>	<i>T. zonuri</i>	AF (Tanzânia)	Telford (1995b)
	<i>Cordylus tropidosternum</i>	<i>T. cordyli</i>	AF (Tanzânia)	Telford (1995b)
Lacertidae	<i>Takydromus smaragdinus</i>	<i>T. takydromi</i>	AS (Tailândia)	Telford (1982) ^a
	<i>T. sexlineatus</i>	<i>T. takydromi</i>		
Chamaeleonidae	<i>Chamaeleo gracilis</i>	<i>T. chamaeleonis</i>	AF (Sudão)	Weynon (1909b) ^a
	<i>Chamaeleo brevicornis</i>	<i>T. therezieni</i>	AF (Madagascar)	Brygoo (1963b)
Scincidae	<i>Mabuya multifasciata</i>	<i>T. scincorum</i>	AS (Burma)	Telford (1982) ^a
	<i>M. macularia</i>	<i>T. scincorum</i>		
	<i>Sphenomorphus maculatus</i>	<i>T. scincorum</i>		
	<i>Mabuya raddoni</i>	<i>T. boueti</i>	AF (Guiné)	Martin (1907) ^a
	<i>Egernia striolata</i>	<i>T. egerniae</i>	AUS (Austrália)	Mackerras (1961) ^a
	<i>E. cunninghami</i>	<i>T. egerniae</i>		
	<i>Mabuya quinquetaeniata</i>	<i>T. mabulae</i>	AF (Sudão)	Weynon (1909b) ^a
	<i>Mabuya maculilabris</i>	<i>T. martini</i>	AF (Congo)	Schwartz (1931) ^a
	<i>M. striata</i>	<i>T. martini</i>		
	<i>Mochlus fernandi</i>	<i>T. mochli</i>	AF (Congo)	Van den Berghe et al. (1957) ^a
	<i>Mabuya perroteti</i>	<i>T. perroteti</i>	AF (Guiné)	Franca (1911) ^a
	<i>Mabuya mabouya</i>	<i>T. rudolphi</i>	AS (Brasil)	Carini e Rudolphi (1912) ^a
Iguanidae	<i>Oplurus sebae</i>	<i>T. domerguei</i>	AF (Madagascar)	Brygoo (1965b) ^a
	<i>Sceloporus teapensis</i>	<i>T. serveti</i>	AC (México)	Pelaez e Streber (1955) ^a
	<i>Uranoscodon superciliosus</i>	<i>T. superciliosae</i>	AS (Brasil)	Walliker (1965)
	<i>Plica umbra</i>	<i>T. plicae</i>	AS (Brasil)	Laison et al. (1975)
	<i>Sceloporus occidentalis</i>	<i>T. scelopori</i>	AN (Califórnia)	Ayala (1970)
Anguidae	<i>Gerrhonotus multicarinatus</i>	<i>T. gerrhonoti</i>	AN (Califórnia)	Ayala e McKay (1971)
Varanidae	<i>Varanus niloticus</i>	<i>T. varani</i>	AF (Nigéria)	Weynon (1909b) ^a
	<i>Varanus exanthematicus</i>	<i>T. varani</i>		Taylor (1929) ^a

AS, Ásia; AUS, Austrália; AF, África; AC, América Central; AN, América do Norte; AS, América do Sul; EUR, Europa; a, revisado em Telford, 1995.

1.4.2. Hospedeiros vertebrados, prevalência e distribuição geográfica de tripanossomas de répteis

Já foram descritos cerca de 80 espécies de tripanossomas em répteis sendo os lagartos o grupo com maior número de espécies descritas (42 espécies) (Tabela 1), seguido das serpentes (21) (Tabela 2), tartarugas (14) e, por último, dos crocodilianos (3) (Tabela 3). A maioria dos estudos indica uma prevalência muito baixa de tripanossomas em répteis (Telford, 1995).

As serpentes constituem um dos grupos menos estudados de tripanossomas. Provavelmente a baixa prevalência por tripanossomas e a parasitemia extremamente baixa apresentada pelas serpentes, seja o fator limitante mais importante na escassez de estudos com tripanossomas de serpentes.

Existem poucos estudos de prevalência de tripanossomas em serpentes, a maioria deles com serpentes brasileiras. Pessoa e Fleury (1969) relataram prevalências bastante altas em serpentes com hábitos aquáticos, de 10% do tripanossoma *T. constrictor* em *Boa constrictor* e de 13% para *T. salamantae* em *Epicrates cenchria*. Pessoa *et al.* (1974) examinaram 2113 serpentes brasileiras e encontraram apenas 18 animais positivos para tripanossoma, em 6 espécies de 45 examinadas, que mostraram uma grande variação de prevalência entre as espécies analisadas: 29% em *Rachidelus brazili*, 14% em *Boa constrictor*, 0.7% em *Xenodon merremi*, 3% em *X. neuwiedii*, 3% em *Epicrates cenchria* e 2% em *Crotalus durissus* (Tabela 2).

Tabela 2 Espécies de tripanossomas de serpentes descritos em diferentes famílias.

Família	Hospedeiro de origem Espécie	Espécie de tripanossoma	Origem geográfica	Referências
Colubridae	<i>Helicops modestus</i>	<i>T. brazili</i>	AS (Brasil)	Brumpt (1914) ^a
	<i>Xenodon merremi</i> *	<i>T. butantanense</i>	AS (Brasil)	Arantes e da Fonseca (1931)
	<i>Nerodia fasciata</i>	<i>T. hydrae</i>	AN (USA)	Ayala et al. (1983)
	<i>Natrix anoscopus</i>	<i>T. closeli</i>	AF	Bouet (1909) ^a
	<i>Grayia smithi</i>	<i>T. closeli</i>		
	<i>Thamnophis sirtalis</i>	<i>T. thamnophis</i>		Fantham e Porter (1953) ^a
	<i>Enhydris enhydris</i>	<i>T. enhydris</i>		Mandal (1978) ^a
	<i>Erythrolamprus aesculapii</i>	<i>T. erythrolampri</i>	AS	Wenyon (1909a) ^a
	<i>Liopholidophis lateralis</i>	<i>T. haranti</i>	ÁF (Madagascar)	Brygoo (1965b)
	<i>Rachidelus brazili</i>	<i>T. hogei</i>	AS (Brasil)	Pessoa (1968)
	<i>Cyclagras gigas</i> *	<i>T. mattogrossense</i>	AS (Brasil)	Da Fonseca (1935)
	<i>Philodryas nattereri</i>	<i>T. phylodriasi</i>	AS (Brasil)	Pessoa (1928)
	<i>Xenochropis piscator</i>	<i>T. primeti</i>	ÁSI (Vietnã)	Mathis e Leger (1909) ^a
	<i>Hypsirhina chinensis</i> *	<i>T. primeti</i>		
	<i>Psammophis sibilans</i>	<i>T. psammophis</i>	ÁF (África do Sul)	Fantham e Porter (1950) ^a
	<i>Enhydris plumbea</i>	<i>T. rostellata</i>		Lun (1985) ^a
Boidae	<i>Boa constrictor</i>	<i>T. constrictor</i>	AS (Brasil)	Pessoa e Fleury (1969)
	<i>Epicrates cenchria</i>	<i>T. salamantae</i>	AS (Brasil)	Pessoa e Fleury (1969)
Pythonidae	<i>Python sebae</i>	<i>T. sebae</i>	ÁF (África do Sul)	Fantham e Porter (1950) ^a
Elapidae	<i>Naja nigricollis</i>	<i>T. najae</i>	ÁF (Sudão)	Wenyon (1909b) ^a
	<i>Naja nigricollis</i>	<i>T. voltariae</i>	ÁF (Gana)	MacFie (1919) ^a
Viperidae	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	<i>T. yaegeri</i>	AN (USA)	Ayala et al. (1983)
	<i>Crotalus durissus</i>	<i>T. cascavelli</i>	AS (Brasil)	Pessoa e de Biasi (1972)

Espécies cuja taxonomia foi alterada (*Xenodon merremi* = *Waglerophis merremi*; *Cyclagras gigas* = *Hydrodynastes gigas*;

Hypsirhina chinensis = *Enhydris chinensis*); ASI, Ásia; AF, África; AN, América do Norte; AS, América do Sul; a, revisto em Telford, 1995.

Tabela 3 Espécies de tripanossomas de tartarugas e crocodilianos descritos em diferentes famílias.

Família	Hospedeiro de Origem Espécie	Espécie de tripanossoma	Origem geográfica	Referência
Testudines				
Chelidae	<i>Chelodina longicollis</i>	<i>T.chelodina</i>	AUS (Austrália)	Mackerras (1961) ^a
Chelidae	<i>Emydura kreftii</i>	<i>T.chelodina</i>		
Chelidae	<i>E. macquari</i>	<i>T.chelodina</i>		
Chelidae	<i>E. latisternum</i>	<i>T.chelodina</i>		
Chelidae	<i>Elseya dentata</i>	<i>T.chelodina</i>		
Chelidae	<i>Platemys platycephala</i>	<i>T.platemysi</i>	AS (Guiana)	Floch e abbonenc (1942) ^a
Emydidae	<i>Emyda vittata</i>	<i>T.vittatae</i>	ASI (Sri Lanca)	Robertson (1908) ^a
Emydidae	<i>Chrysemys picta</i>	<i>T.chrysemidis</i>	AN (USA)	Roudabush e Coatney (1937) ^a
Emydidae	<i>Graptemys geographica</i>	<i>T.chrysemidis</i>		
Chelydridae	<i>Chelydra serpentina</i>	<i>T.chrysemidis</i>		Woo (1969) ^a
Trionychidae	<i>Trionyx spiniferus</i>	<i>T.chrysemidis</i>		Jefferson (1965) ^a
Trionychidae	<i>Lissemys punctata</i>	<i>T.ballihaensis</i>		Ray (1987) ^a
Trionychidae	<i>Lissemys punctata</i>	<i>T.lissemysi</i>		Saratchandra (1980) ^a
Trionychidae	<i>Trionyx gangeticus</i>	<i>T.gangetica</i>		Singha (1978) ^a
Geoemydidae	<i>Chinemys reevesi</i>	<i>T.damoniae</i>	ASI	Laveran e Mesnil (1902) ^a
Testudinidae	<i>Testudo esculenta</i>	<i>T.testudinis</i>	AS (Guiana)	Floch e Abonnenc (1942) ^a
Testudinidae	<i>Kinixys homeana</i>	<i>T.leroi</i>	AF (Mali)	Commes (1919) ^a
Pelomedusidae	<i>Pelusius s. sinuatus</i>	<i>T.mocambicum</i>	AF (África do Sul)	Pienaar (1962) ^a
Pelomedusidae	<i>Pelusius s. zuluensis</i>	<i>T.neitzi</i>	AF (Moçambique)	Travassos Santos Dias (1952) ^a
Pelomedusidae	<i>Pelusios subniger</i>	<i>T.pontyi</i>	AF	Bouet (1909) ^a
Pelomedusidae	<i>Pelusios s. zuluensi</i>	<i>T.sheppardi</i>	AF (Moçambique)	Travassos Santos Dias (1952) ^a
Crocodylia				
Crocodylidae	<i>Osteolaemus tetraspis</i>	<i>T.grayi</i>	AF (Nigéria)	Macfie (1919) ^a
Crocodylidae	<i>Crocodylus niloticus</i>	<i>T.grayi</i>		Lloyd et al. (1924) ^a
Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	<i>T.cecili</i>	AS (Brasil)	Lainson (1977)
Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	<i>T.takedai</i>	AS(Brasil)	Nunes e Oshiro (1986)

ASI, Ásia; AUS, Austrália; AF, África; AS, América do Sul; AN América do Norte; a, revisto em Telford, 1995.

Hoare (1931a,b) mostrou em seus estudos com *T. grayi*, o único tripanossoma de crocodiliano estudado, que a prevalência entre os crocodilos não é muito baixa, mas a parasitemia sim, sendo rara a presença de parasitas no sangue periférico, tanto em animais naturalmente infectados como em animais infectados experimentalmente. No Brasil, Nunes e Oshiro (1990) analisaram jacarés (*Caiman crocodilus yacare*) do Pantanal e observaram uma prevalência de tripanossomas de 46% nesta população com a técnica de microhematócrito, enquanto exames de esfregaços sanguíneos revelaram raras formas tripomastigotas. Em estudo realizado com jacarés da região Amazônica (*Caiman crocodilus crocodilus* e *Paleosuchus trigonatus*) foram examinados 74 animais e apenas três deles da primeira espécie apresentaram parasitemia, com raras formas tripomastigotas circulantes ou encontradas em tecidos (Lainson, 1977) (Tabela 3).

Tripanossomas em lagartos já foram descritos em diversas famílias. As famílias Gekkonidae e Sincidae são as mais comumente parasitadas e que apresentam maiores índices de prevalência. Na família Iguanidae, *T. serveti* foi relatado em 10% dos *Anolis tropidonotus*, em 19% dos *Sceloporus variabilis* e 9% dos *Corytophanes hernandezi* no México (Lowichik *et al.*, 1988). Também no México, este parasita foi descrito em 18% dos *Sceloporus teapensis* (Pelaez e Streber, 1955). Na América do Norte (Califórnia), *T. scelopori* foi relatado em 5% dos *Sceloporus occidentalis* (Ayala, 1973). No Brasil, *T. plicae* foi encontrado em 10% dos lagartos *Plica umbra* (Lainson *et al.*, 1975).

Na família Gekkonidae, maiores prevalências parecem estar mais relacionadas à região geográfica do que à espécie do hospedeiro. Na América central (Panamá), tripanossomas foram encontrados em 28% de *Gonatodes albogularis* (Telford, 1979). *T. phylluri* foi descrito em 16% de *Phyllurus platurus* na Austrália (Mackerras, 1961). Na Europa (Itália), *T. platydactyli* foi observado em 35% de *Tarentola mauritanica* (Adler e Theodor, 1935). Na África (Tanzânia), a espécie de lagarto mais parasitada foi *Hemidactylus platycephalus*, que apresentou quatro espécies de tripanossomas: *T. uluguruensis* (30%), *T. cnemaspi* (30%), *T. kimbozae* (15%) e *T. lygodactyli* (2%). Outras espécies de tripanossomas foram relatadas neste continente: *T. lygodactyli* em *Lygodactylus picturatus* (7%) e em *L. grotei* (4%), e *T. uluguruensis* em *L. picturatus* (20%) e *L. grotei* (16%) (Telford, 1995a). Em Madagascar, tripanossomas similares a *T. domerquei* foram descritos em 4 a 20% de *Phelsuma lineatum* (Brygoo, 1963a)

Na família Scincidae, a maior prevalência foi descrita nas espécies *Mochlus fernandi*, com prevalência de 100% para *T. mochili*, embora não se conheça o número total de animais examinados (van den Berghe *et al.*, 1964). O gênero mais parasitado dos Scincidae é *Mabuya*, no qual foi descrito *T. scincorum* em *M. multifasciata* na Tailândia (17%) e em Burma (11%) (Telford, 1982). Na África, *T. boueti* se encontra bastante disperso, sendo encontrado em 25% das *M. striata* da Etiópia, em 7% da Tanzânia, em 10% das *M. maculilabris* do Zaire, em 20% no Kenya e em 15% na Tanzânia (Ashford *et al.*, 1973; Telford, 1995).

Na família Chamaeleonidae, tripanossomas foram descritos em *T. chamaeleonis* no Sudão (África) (Wenyon, 1909a) e *T. therezieni* em 11% dos *Chamaeleo brevicornis* examinados em Madagascar. Tripanossomas morfológicamente distintos foram detectados em *Chamaeleo nasutus* (3%) e em *Chamaeleo willsi* (1 de 6) examinados em Madagascar (Brygoo, 1963a,b).

Na família Varanidae, apenas *T. varani* foi descrito em diversas partes da África. A primeira descrição foi de Wenyon (1909b) em um lagarto da espécie *Varanus niloticus* e, posteriormente, Taylor (1929) encontrou esse tripanossoma em *V. exanthematicus*. Na Nigéria, 67% de *V. exanthematicus* se apresentaram infectados com *T. varani* (Lloyd *et al.*, 1924). Além destes tripanossomas, lagartos (*V. niloticus*) também já foram descritos naturalmente infectados com *T. brucei*, parasita que causa tripanossomíases em mamíferos na África (Njagu *et al.*, 1999).

Na família Lacertidae, Telford (1982) descreveu *T. takydromi* em lagartos *Takydromus sexlineatus* (8%) na Tailândia e *T. smaragdinus* (1,2%) nas Ilhas Ryukyu no Japão.

T. chelodinae, parasita de tartaruga, foi recentemente descrito com uma prevalência de 30% em três espécies de tartarugas (*Chelodina longicollis*, *Elseya latisternum* e *Emydura signata*) na Austrália (Jakes *et al.*, 2001 a, b).

1.4.3. Desenvolvimento de tripanossomas de répteis nos hospedeiros vertebrados

Tripanossomas são encontrados no sangue dos répteis apenas na forma tripomastigota e estágios intracelulares nunca foram descritos (Telford, 1995) (Figura 4).

Arantes e da Fonseca (1931a) relataram que tripomastigotas de *T. butantanense* se dividiam por fissão binária no sangue periférico de serpentes da espécie *Xenodon merremi*. Um outro tripanossoma de serpente, *T. hydrae*, divide por fissão binária longitudinal desigual no sangue da serpente *Nerodia fasciata*, seu hospedeiro natural. Através de inoculação de sangue infectado com *T. hydrae*, foi possível infectar outras serpentes e observar a parasitemia que apresentou um declínio após infecção inicial (Ayala et.al., 1983).

Estudos realizados com *T. grayi* (Hoare, 1929; 1931) demonstraram que este parasita é extremamente raro no sangue periférico dos crocodilos, tanto nos animais infectados naturalmente quanto experimentalmente. A infecção pode durar pelo menos dois anos, tempo que os autores acompanharam a infecção. As formas tripomastigotas sangüíneas são muito grandes (de 68 a 91µm), largas região central, com cinetoplasto pequeno e próximo ao núcleo, que se apresenta bem arredondado e central, com membrana ondulante bem desenvolvida e flagelo curto.

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de tripanossomas de répteis. Tripanossoma de serpente (a, b); lagarto (c, e); jacaré (d, f).

Os estudos de especificidade pelo hospedeiro de origem em tripanossomas de répteis são muito raros. Algumas espécies de tripanossomas são relatadas como restritas aos seus hospedeiros de origem e outras podem infectar mais de um hospedeiro (Grewal, 1955; Pessôa e Fleury, 1969; Woo, 1969; De Biasi et.al., 1975). *T. butantanense* (parasita da serpente *Xenodon merremi*) foi capaz de infectar experimentalmente outras seis espécies de serpentes não peçonhentas e três espécies peçonhentas, sendo que outras espécies de serpentes se mostraram refratárias (Arantes e Fonseca, 1931). Similarmente, o parasita de *Chamaeleo brevicornis* (*T. therezieni*) pode infectar outras espécies de camaleão, embora não tenha sido capaz de infectar outros lagartos (*Phelsuma lineatum* e *Zonosaurus* sp.), serpente (*Mimophis mahafalensis*), tartaruga (*Pyxis arachnoides*) e anuro (*Rana mascariensis*) (Brygoo, 1963b).

Praticamente não existem trabalhos que avaliem a patogenicidade de tripanossomas para répteis. O trabalho de Hoare (1931) sugere que *Trypanosoma grayi* não é patogênico para seu hospedeiro natural, *Crocodilus niloticus*. A infecção permanece por vários anos sem causar qualquer sinal de patologia para o animal. As observações de Brygoo (1963b) parecem ser as únicas em lagartos. Nos seus estudos, *T. therezieni* não se mostrou patogênico para seu hospedeiro natural *Chamaeleo brevicornis*. Porém, quando infectou outras espécies de camaleão, causou a morte em 100% dos animais.

1.4.4. Desenvolvimento de tripanossomas de répteis nos hospedeiros invertebrados e mecanismos de transmissão

A participação de insetos hematófagos na transmissão de tripanossomas a hospedeiros vertebrados é um fenômeno bem conhecido para tripanossomas de mamíferos (Hoare, 1972; Molyneux, 1977), aves (Molyneux, 1977; Votýpka *et al.*, 2002; 2004), anuros (Anderson e Ayala, 1968; Ayala, 1970; 1971; Dessler *et al.*, 1973; 1975) e répteis (Shortt e Swaminath, 1931; Adler e Theodor, 1935; Ayala, 1970; Ayala e McKay, 1971; Minter-Goeble *et al.*, 1993).

Tripanossomas são encontrados em infecção experimental em vetores, ou em culturas, nas formas promastigotas, amastigotas, epimastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas metacíclicas, dependendo da espécie parasita (Telford, 1995).

Pouco se conhece sobre vetores de tripanossomas de répteis. Espécies que parasitam répteis aquáticos, aparentemente são transmitidas por sanguessugas, enquanto que os tripanossomas de répteis terrestres aparentemente são transmitidos por flebotomíneos (Telford, 1995).

A primeira descrição do ciclo de vida e transmissão destes tripanossomas foi feita por Robertson (1909), que descreveu o desenvolvimento de *T. vittatae*, um parasita de tartaruga (*Emyda vittata*) em uma espécie de sanguessuga do gênero *Glossosiphonia*, o provável hospedeiro invertebrado, e também na sanguessuga da espécie *Paecilobdella granulosa*. *T. grayi* é o único tripanossoma de réptil que teve seu ciclo de desenvolvimento descrito completamente, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no vetor (tse-tsé) (Hoare, 1929; 1931 a,b).

T. grayi é o único tripanossoma comprovadamente transmitido por tse-tsé, além dos tripanossomas africanos da Secção Salivaria que são parasitas de mamíferos. Entretanto, nessa espécie a transmissão não ocorre por inoculação, mas sim de forma contaminativa, provavelmente por deposição de fezes contaminadas na boca e por ingestão das próprias moscas pelos crocodilos. A infecção se dá via mucosa bucal pela ingestão de fezes e/ou das moscas que contém os tripomastigotas metacíclicos que penetram via mucosa, caem na corrente sanguínea dos crocodilos e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos (Hoare, 1929; 1931a; 1972). A primeira descrição de *T. grayi* em tsé-tsé foi em *Glossina fuscipes* e, posteriormente, em *G. palpalis* e *G. tachinoides*, mas nunca em *G. morsitans*, os principais vetores das tripanossomíases de mamíferos (Lloyd e Johnson, 1924 a, b; Molyneux, 1977).

A mosca tsé-tsé ingere as formas tripomastigotas sanguíneas de *T. grayi* do sangue dos crocodilos que, no vetor, se diferenciam em formas epimastigotas no intestino médio, que se dividem e no intestino posterior, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, formas arredondados na extremidade posterior (Figura 5).

Figura 5. Ciclo biológico de *Trypanosoma grayi*.
Modificado de Hoare (1931).

O tripanossoma *T. grayi*-like F₄ (isolado de *Glossina pallidipes*) se desenvolve experimentalmente em tse-tsé (*G. morsitans morsitans* e *G. palpalis gambiensis*), mas não em flebotomíneo (*Phlebotomus duboscqi*). Por outro lado, esses flebotomíneos permitiram o desenvolvimento de *T. varani* V54 (de *Varanus exanthematicus*), o qual não se desenvolveu em tse-tsé (Minter-Goedbloed *et al.*, 1993). Esse estudo comprova que tsé-tsé pode transmitir diversas espécies de tripanossomas, uma vez que o isolado *T. grayi*-like F₄ não se agrupou com outros isolados dessa espécie nas filogenias moleculares, indicando que deve pertencer à outra espécie de tripanossoma (Hamilton *et al.*, 2004; 2005a).

Diversos vetores podem estar envolvidos na transmissão de tripanossomas de répteis, principalmente por esse grupo englobar animais que vivem em diferentes ecótopos, e muitas vezes vivem em diferentes ambientes durante a vida, proporcionando contato com maior diversidade de vetores. Tripanossomas de vertebrados aquáticos são geralmente transmitidos por sanguessugas (Hamilton *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007; Viola *et al.*, Anexo 1).

Sanguessugas terrestres e aquáticas são amplamente distribuídas no mundo. 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 pouco restritas a uma espécie de hospedeiro, geralmente parasitam apenas uma classe de vertebrados.

Doflein (1901) sugeriu pela primeira vez que sanguessugas fossem os verdadeiros vetores de tripanossomas de peixes (Pinto, 1923). Além de peixes (revisado em Molyneux, 1977), a transmissão de tripanossomas por sanguessugas é um dos mecanismos aceitos para as espécies que parasitam anfíbios (Bardsley e Harmsen, 1973; Molyneux, 1977), répteis (Siddall e Desser, 1992; Molyneux, 1977) e mamíferos (Hoare, 1972; Hamilton *et al.*, 2005a; 2007). Esses últimos são transmitidos por sanguessugas ou artrópodes. Nesses modelos não são observados 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*. Estes gêneros de sanguessugas foram implicados na transmissão de tripanossomas australianos de “wallaby” e de anuro (Hamilton *et al.*, 2005a).

Quando uma sanguessuga se alimenta de répteis aquáticos, o tripomastigota ingerido transforma-se em epimastigota no esôfago ou estômago da sanguessuga, divide-se por fissão binária em células filhas de tamanhos variados que vão se desenvolver em epimastigotas bastante polimórficos, que por sua vez se transformam em tripomastigotas metacíclicos, estágio infectante para os hospedeiros vertebrados (Woo, 1969). Siddall e Desser (1992) observaram formas tripomastigotas indistinguíveis de *T. chrysemydis*, mais de 4 meses após uma sanguessuga (*Placobdella ornata*) ter se alimentado em uma tartaruga (*Chelydra serpentina*) infectada com tripanossoma. Brumpt (1914) descreveu o desenvolvimento de *T. brasili*, parasita da serpente *Helicops modestus* em sanguessugas (*Placobdella brasiliensis* e *P. catenigera*). Após alimentação em serpentes parasitadas ele observou nas sanguessugas formas epimastigotas após 4 dias, e tripomastigotas após 19 dias. Neste estudo, foi observado o desenvolvimento do parasita no estômago da sanguessuga, sem invasão da probóscide, sugerindo que a transmissão do parasita ocorre por ingestão da sanguessuga pelo hospedeiro vertebrado.

Formas epimastigotas e promastigotas do *T. hogei*, parasita da serpente (*Rachidelus brasili*) foram descritas em sanguessuga (*Haementeria lutz*) (Pessoa e Fleury, 1969). Até o momento nenhum estudo demonstrou o ciclo completo de tripanossomas de répteis em sanguessugas.

Um fato interessante referente à transmissão de protozoários por hirudíneos é que, a transmissão, aparentemente só ocorre em sanguessugas providas de probóscide, enquanto as sanguessugas portadoras de maxilares parecem não desempenhar papel algum na propagação dos protozoários (Pinto, 1923).

Ainda não existem estudos que comprovem o real papel dos mosquitos na transmissão de tripanossomas para répteis, assim como existem para anuros (Desser *et al.*, 1973). *T. salamantae*, parasita de serpente (*Epicrates cenchris crassus*) se desenvolveu em *Culex dolosus*, porém, os estágios infectantes não foram encontrados (De Biasi *et al.*, 1975). Mosquitos *Culex pipens fatigans* alimentados em camaleão infectado com *T. theezieni* apresentaram formas epimastigotas em divisão no intestino. Porém, os parasitas desapareceram entre 48 e 60 horas após alimentação (Brygoo, 1963b).

Além da mosca tse-tsé, flebotomíneos têm sido confirmados como vetores de tripanossomas de répteis exclusivamente terrestres (Telford, 1995; Ferreira *et al.*, in press). O desenvolvimento do parasita nos

flebotomíneos ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante a alimentação, seguido de diferenciação em amastigotas, esferomastigotas e epimastigotas, que possivelmente são as formas infectantes para lagartos (Telford, 1995). *T. phlebotomi* parasita do lagarto *Hemidactylus frenatus* se desenvolveu em flebotomíneo *Sergentomyia babu shortti* (Shortt e Swaminath, 1931). Neste gênero de flebotomíneos também foram descritas formas epimastigotas nas porções médias e finais do intestino de *Sergentomyia bedfordi* alimentada em *Mabuya striata* na Etiópia (Ashford *et al.*, 1973). Formas epimastigotas de *T. thecadactyli*, parasita de *Thecadactylus rapicauda*, foram descritas no intestino posterior de *Lutzomyia trinidadensis*. Em infecções com *T. scelopori* e *T. gerrhonoti* (parasitas de *Sceloporus occidentalis* e *Gerrhonotus multicarinatus*), epimastigotas foram encontradas na cárdia, esôfago e estômago de *Lutzomyia vexator occidentis* (Christensen e Telford, 1972; Ayala e McKay, 1971). Estudos experimentais demonstraram que *T. varani*, parasita do lagarto (*Varanus exanthematicus*) se desenvolve bem no flebotomíneo *Phlebotomus dubosqi*, mas não em *Glossina morsitans* e *G. palpalis* (Minter-Goedbloed *et al.*, 1993).

Outro mecanismo de transmissão importante de tripanossomas em répteis deve ser através da ingestão do vetor, pois vários répteis se alimentam de invertebrados dos mais diferentes grupos. A transmissão por via oral foi comprovada experimentalmente para *T. grayi* em crocodilos (Hoare, 1929), *T. therezieni* em camaleões (*Chamaeleo lateralis*) (Brygoo, 1963b) e *T. phylodriasi* em serpentes (De Biase *et al.*, 1975).

1.5. Critérios taxonômicos tradicionais para a classificação de tripanossomas de répteis

Tradicionalmente, a taxonomia da família Trypanosomatidae está baseada em características morfológicas e nos ciclos de vida dos parasitas. Porém, além do grande pleomorfismo, algumas formas são encontradas em vários gêneros, subgêneros e espécies. Diferentes espécies de tripanossomas podem diferir em diversos aspectos tais como: tamanho e forma do corpo, tamanhos e posição do cinetoplasto e do núcleo, no grau de desenvolvimento da membrana ondulante e do flagelo. O conjunto destas características é utilizado na classificação de espécies de *Trypanosoma* (Hoare, 1972).

Algumas espécies de tripanossomas de répteis apresentam formas tripomastigotas no sangue com características morfológicas variáveis. Porém, esses parâmetros são de difícil utilização na classificação de tripanossomas porque, além do pleomorfismo, a parasitemia é sempre baixa. Além disto, as formas de cultura variam com o meio de cultura utilizado e tempo de cultivo e as forma observadas no sangue do hospedeiro nem sempre correspondem à espécie isolada em cultura, o que tem gerado muitos erros de classificação de tripanossomas (Maia da Silva *et al.*, 2004a). Os requerimentos nutricionais para o cultivo de tripanossomas são bem variáveis entre diferentes espécies. Diferenças no comportamento em cultura podem ser usadas

como um critério preliminar na distinção de espécies de tripanossomas, porém, similaridades nos requerimentos de cultivo não refletem necessariamente similaridades filogenéticas entre espécies.

A origem geográfica também é um parâmetro utilizado na classificação dos tripanossomas. Entretanto, a existência de espécies amplamente distribuídas e a falta de conhecimento sobre a distribuição da grande maioria das espécies tornam esse critério de pouca utilidade na classificação de espécies. Porém, utilizado em conjunto com a filogenia molecular, é possível fazer estudos filogeográficos dos parasitas e de seus hospedeiros (Maia da Silva, 2007; Hamilton *et al.*, 2007).

O conjunto de características biológicas tais como, ciclo 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" (Hoare, 1972).

A análise de restrição de hospedeiros pode ser utilizada como critério taxonômico. A maioria das espécies apresenta alguma restrição ao hospedeiro vertebrado, que pode ser da mesma ordem ou gênero ou espécie-específica (Hoare, 1972; Ferreira *et al.*, in press). Porém, este critério não deve ser utilizado isoladamente, já que alguns animais podem ser infectados por diversas espécies de tripanossomas. A generalização da restrição ao hospedeiro levou à prática de classificar os tripanossomas de répteis de acordo com a espécie do hospedeiro de origem. Geralmente, quando um tripanossoma é encontrado no sangue de uma espécie de réptil nunca descrita infectada, é considerado como nova espécie. Esses parâmetros não podem ser utilizados para as espécies que apresentam grande especificidade pelos hospedeiros vertebrados e que têm hospedeiros invertebrados difíceis de criar e manter em laboratório, como os répteis.

Os tripanossomas de répteis são exclusivamente classificados de acordo com a morfologia das formas sanguíneas e o hospedeiro de origem. Infelizmente, estes parâmetros taxonômicos não são suficientes devido à extrema variabilidade morfológica, existência de espécies morfológicamente indistinguíveis, falta de informações sobre a especificidade por hospedeiros, etc.

1.6. Marcadores moleculares utilizados na caracterização, taxonomia e filogenia de tripanossomas

Diversos genes, seqüências e métodos vêm sendo utilizados na detecção, identificação, taxonomia e filogenia de tripanossomas. Os mais utilizados são: a) Gene ribossômico; b) Gene gGAPDH; c) Gene "spliced leader" ou de mini-exon; d) Minicírculos de kDNA; e) RAPD - Random amplification of polymorphic DNA; f) Caracterização cromossômica – Cariotipagem; g) Polimorfismo de loci de microsatélites. Poucos marcadores moleculares foram utilizados no estudo dos tripanossomas de répteis, sendo a maioria dos dados restritos aos genes SSU rDNA do gene ribossômico.

1.6.1. 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. Os genes que codificam as moléculas de RNA ribossômico (rRNA) consistem de unidades de repetição, que são compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) intercaladas por um espaçador intergênico (IGS), que se repetem em "tandem" no genoma mais de 100 vezes. Quando transcritas (RNA Polimerase I) cada unidade de transcrição origina um pré-rRNA que é processado dando origem aos rRNAs maduros 18S (SSU, subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU), subunidade maior que nestes organismos é constituída por dois fragmentos de alto peso molecular, 24S α e 24S β e quatro subunidades de rRNAs de baixo peso molecular (S1, S2, S4 e S6). As subunidades 18S e 24S são constituídas por seqüências altamente conservadas e intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (ITS 1, 2 e 3, espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) que são flanqueados pelo espaçador intergênico (IGS), que apresenta seqüências altamente variáveis (Figura 6).

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

As seqüências ribossômicas têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os tripanossomatídeos de praticamente todos os gêneros, assim como entre estes organismos e representantes de outras famílias da ordem Kinetoplastida. As diferenças de conservação destas regiões têm sido utilizadas para identificar gêneros, espécies e cepas de tripanossomatídeos.

Os genes ribossômicos estão distribuídos universalmente e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos sendo os mais utilizados para inferências de relacionamentos filogenéticos entre os tripanossomatídeos. Esses genes são facilmente isolados e podem ser comparados com inúmeras seqüências já depositadas em bancos (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 excelentes como ferramentas na identificação e em estudos filogenéticos dos tripanossomatídeos. Seqüências da subunidade menor, SSU, que possui oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández *et al.*, 1990) 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.

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 tamanho e de sítios de restrição no gene ITS amplificado por PCR revelaram variabilidade inter e intraespecífica dos gêneros *Leishmania* (Schönian *et al.*, 2000) e *Trypanosoma*, diferenciando linhagens de *T. cruzi* (Fernandes *et al.*, 1999 b; Mendonça *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002), de *T. rangeli* (Maia da Silva *et al.*, 2004b) e de *T. theileri* (Rodrigues *et al.*, 2006), espécies de tripanossomas Africanos (Desquesnes *et al.*, 2001; Njiru *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2006) e de tripanossomas de anuros (Ferreira *et al.*, 2007).

São muito raros os estudos de genes ribossômicos de tripanossomas de répteis. Os estudos filogenéticos moleculares analisaram seqüências de SSU rRNA de apenas 6 tripanossomas de répteis. Apesar do pequeno número de amostras, todas as análises filogenéticas demonstraram a polifilia deste grupo, que foi dividido em três ramos distantes nas árvores filogenéticas (Stevens *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2004, 2005 a, 2007) (ver item 1.2).

1.6.2. Gene Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal - gGAPDH

Em parasitas da família Tripanosomatidae existe um grande número de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e glicerol, que participa da conversão de glicose e glicerol em 3-fosfoglicerato, localizadas em uma organela chamada glicosoma. A compartimentalização dessas enzimas de glicólise nos tripanossomas difere dos outros eucariotos estudados, onde a glicólise ocorre no citosol. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal (*gGAPDH*) é uma enzima glicolítica essencial aos Cinetoplastídeos (Hannaert *et al.*, 1992). Nos genomas completos de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. mexicana* foram encontrados três genes de GAPDH, dois codificam uma enzima glicosomal (*gGAPDH*) e o outro codifica uma enzima citosólica (cGAPDH), mais relacionado com genes bacterianos (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática dos genes de GAPDH.

Os genes de *gGAPDH* são de cópia única e como são codificadores de proteínas estão sujeitos a diferentes pressões seletivas e apresentam taxas de evolução menores comparados com os genes SSU rDNA. Esses genes têm se revelado excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis de seqüências de organismos geneticamente

distantes, em análises de seqüências independentes ou combinadas com seqüências de SSU rDNA (Hamilton *et al.*, 2004).

Estudos filogenéticos de tripanossomatídeos baseados em seqüências do gene *gGAPDH* indicaram a monofilia do gênero *Trypanosoma* e segregaram os tripanossomas em três principais clados: *T. brucei*, *T. cruzi* e clado aquático, corroborando os resultados obtidos com análises filogenéticas utilizando o gene SSU rRNA. Existem seqüências disponíveis em bancos de dados do gene *gGAPDH* de tripanossomas de todas as classes de vertebrados, inclusive de isolados de anuros, peixes, aves e de répteis (*T. grayi*, *T. varani*, *T. scelopori*, *T. sp gecko* e *T. theezieni*) (Hamilton *et al.*, 2004, 2005a).

1.6.3. Gene "spliced leader" ou de mini-exon

A maioria dos genes dos Kinetoplastida não apresentam introns e seus transcritos são 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. O processamento de mRNA nos tripanossomatídeos através deste mecanismo resulta na adição, na extremidade 5' dos mRNAs maduros, da seqüência de 39 nucleotídeos denominada "spliced leader" RNA (SLRNA) ou "mini-exon derived RNA" (med-RNA) (Agabian, 1990).

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 seqüências 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 (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática da unidade de repetição do gene "Spliced leader"

Os genes SL dos tripanossomatídeos apresentam introns e regiões intergênicas heterogêneas. Essa variabilidade vem sendo explorada para a identificação de marcadores úteis na identificação de espécies de: *Leishmania* (Fernandes *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1998; Marfurt *et al.*, 2003); *Endotrypanum* (Fernandes *et al.*, 1993); *Phytomonas* (Teixeira *et al.*, 1996; 2000; Godoi *et al.*, 2002); *Crithidia* (Fernandes *et al.*, 1997) e tripanossomas africanos (Sturm *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2001). Estas seqüências também são úteis na tipagem de linhagens de *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1966; Fernandes *et al.*, 1998; Brisse *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2001), *T. rangeli* (Grisard *et al.*, 1999; Maia da Silva *et al.*, 2007) e *T. theileri* (Rodrigues, 2004). Seqüências do gene SL vêm sendo utilizadas no estudo da variabilidade genética entre tripanossomatídeos de insetos, revelando uma grande complexidade em todos os gêneros (Westenberger *et al.*, 2004).

As seqüências do gene SL são úteis apenas para inferir graus de relacionamento genético entre espécies muito relacionadas, para análise de variabilidade genética e como alvo para diagnóstico de tripanossomatídeos (Serrano *et al.*, 1999 b; Gibson *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2001). Quando a aplicabilidade de seqüências do gene SL em estudos filogenéticos foi avaliada em uma análise com 27 espécies de tripanossomas, apenas as seqüências de espécies muito relacionadas puderam ser alinhadas com confiabilidade devido ao polimorfismo nas regiões espaçadoras (Gibson *et al.*, 2000).

Além de *Leishmania*, esse gene tem sido bastante utilizado com finalidades taxonômicas no estudo dos tripanossomatídeos de insetos e dos tripanossomas de mamíferos. Porém, pouco se conhece sobre esse gene em tripanossomas de outras classes de hospedeiros. O seqüenciamento dos genes SL de tripanossomas de anuros revelou que a unidade de repetição é a menor entre todos os tripanossomas estudados, 280pb e 294pb para *T. mega* e *T. rotatorium*, respectivamente. Além da similaridade de tamanho, essas espécies apresentam seqüências conservadas, mesmo no espaçador intergênico (Gibson *et al.*, 2000).

Análises de gene SL de tripanossomas de peixes, anuros, aves e répteis foram realizadas apenas com poucos isolados, sendo *T. grayi*, *T. sp* gecko e *T. varani* os únicos isolados de répteis analisados até o momento (Gibson *et al.*, 2000). A caracterização do tamanho do “repeat” do gene SL desses tripanossomas de répteis através de seqüenciamento revelou uma homogeneidade de tamanho de ~700pb, sendo *T. sp* gecko o menor (705pb) e *T. grayi* o maior (761pb). A similaridade das seqüências desses 3 tripanossomas se mostrou maior entre os isolados de lagartos *T.sp* gecko e *T. varani* (92% similaridade) que também se mostram relacionados nas análises filogenéticas (Hamilton *et al.*, 2005, 2007). Estudos preliminares realizados em nosso laboratório revelaram unidades de repetição diferentes para espécies diferentes de tripanossomas de serpentes, jacarés e lagartos, indicando a aplicabilidade desse marcador na taxonomia desses tripanossomas (Viola *et al.*, em preparação).

1. 6. 4. Moléculas do DNA do cinetoplasto - kDNA

Os kinetoplastidas modificaram sua única mitocôndria, alterando o conteúdo de DNA e sua organização, gerando o cinetoplasto, uma região rica em moléculas de DNA (kDNA) concatenadas em uma única rede. O kDNA consiste de moléculas dupla-fita circulares, entre 5000-10000 minicírculos e 40-50 maxicírculos. 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, 1987; Stuart e Feagin, 1992) (Figura 9).

Figura 9. Estrutura e organização do cinetoplasto de tripanossomatídeos. (A) microscopia eletrônica de transmissão; (B) Organização das moléculas de minicírculo que formam a rede de kDNA e (C) representação esquemática das regiões conservadas de cada minicírculo.

As reconstruções filogenéticas sugerem que a origem evolutiva da rede concatenada de kDNA, aparentemente, ocorreu no ancestral da família Trypanosomatidae, uma vez que os minicírculos dos bodonídeos não são concatenados. Porém, moléculas minicírculo-like são encontradas nestes flagelados (Lukes *et al.*, 2002). Aparentemente, os tripanossomatídeos divergiram dos demais eucariotos logo que o ancestral desta linhagem incorporou bactérias aeróbicas simbiotes que deram origem às mitocôndrias (Simpson e Maslov, 1999; Simpson *et al.*, 2002; Lukes *et al.*, 2002; 2005; Roy *et al.*, 2007).

Os minicírculos dos tripanossomatídeos são extremamente heterogêneos no tamanho e na sequência interespecificamente. Intraespecificamente, estas moléculas diferem na sequência, mas são, geralmente, homogêneas em tamanho. A maioria dos tripanossomas estudados apresenta minicírculos com tamanhos entre ~0.9-1,2kb. Entretanto, algumas espécies de tripanossomas apresentam tamanhos muito distintos, variando de 465bp em *T. vivax* (Borst *et al.*, 1985) a ~10kb em *T. avium* (Yurchenko *et al.*, 1999; Lukes e Votýpka, 2000).

Ao contrário dos tripanossomas de mamíferos e de aves, pouco se conhece sobre a estrutura e organização das moléculas de kDNA dos tripanossomas de peixes, anuros e de répteis. Os minicírculos de kDNA desses tripanossomas são maiores do que os de tripanossomas de mamíferos (Martin e Desser, 1990; Jirku *et al.*, 1995; Yurchenko *et al.*, 1999; Lukes e Votýpka, 2000; Votýpka *et al.*, 2004). As moléculas de minicírculos de tripanossomas de peixes apresentam mais de 5,0kb (Jirku *et al.*, 1995) e as do tripanossoma de anuro *T. mega* apresentam ~2.3kb e grande heterogeneidade de sequências (Simpson, 1987; Martin e

Desser, 1990). Os estudos ultraestruturais revelaram diferenças na forma e tamanho do cinetoplasto de diferentes espécies de tripanossomas de aves e de anuros (Steinert e Novikoff, 1960; Martin e Desser, 1990; Yurchenko *et al.*, 1999; Lukes e Votýpka, 2000; Votýpka *et al.*, 2004).

Estudos recentes têm sugerido uma correlação entre o tamanho das moléculas de minicírculos de kDNA e as medidas do cinetoplasto observadas por microscopia eletrônica. As moléculas maiores se organizam gerando estruturas cilíndricas mais altas, porém, com menor diâmetro quando comparada com as estruturas geradas por moléculas pequenas de minicírculos de kDNA (Lukes e Votýpka, 2000). A organização característica das fibrilas de kDNA gerando estruturas morfológicamente distintas, de acordo com o tamanho e classes de moléculas de kDNA, tem sido adotada como parâmetro taxonômico para tripanossomas de aves (Votýpka *et al.*, 2004).

Entre os tripanossomas de “répteis”, apenas *T. scelopori* foi estudado quanto à organização de suas moléculas de kDNA, que apresentam três classes de minicírculos que variam de 1,7 kb a 2,3 Kb (Yurchenko *et al.*, 1999). Este trabalho também determinou as seqüências dos minicírculos amplificados com a utilização de oligonucleotídeos complementares às regiões conservadas dessas moléculas (CSB), revelando uma grande heterogeneidade entre elas (Yurchenko *et al.*, 1999). Nenhum trabalho foi realizado visando o estudo estrutural dos tripanossomas de répteis por microscopia eletrônica.

Estudos preliminares realizados em nosso laboratório indicam uma grande heterogeneidade de moléculas de minicírculos quando foram comparados tripanossomas de serpentes, jacarés e lagartos. Os resultados revelaram tamanhos e classes diferentes dessas moléculas de acordo com a espécie hospedeira do isolado. Comparados com as análises filogenéticas geradas nessa tese, esses resultados indicam que o tamanho das moléculas de kDNA pode ser utilizado como um marcador de espécies. Análises realizadas por microscopia eletrônica com esse tripanossomas indicaram uma significativa associação entre a estrutura e tamanho do cinetoplasto e o tamanho das moléculas de minicírculo de kDNA (Viola *et al.*, em preparação) (Figura 10).

Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando o cinetoplasto de tripanossomas de lagartos, serpentes e jacarés (A); Padrões de classes de minicírculos de kDNA de tripanossomas de lagartos, serpentes e jacarés (B).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Filogenias de Tripanossomas de Serpentes Inferido por Seqüências de SSUrDNA, sua Possível Transmissão por Flebotomíneos e Avaliação Taxonômica através de Análises Morfológicas, Moleculares e Infecções Cruzadas.

Anexo 1. Phylogeny of Snake Trypanosomes Inferred by SSUrDNA Sequences, their Possible Vectoring by Phlebotomines, and Taxonomic Appraisal by Molecular, Cross-Infection and Morphological Analysis.

Examinamos através das técnicas de microhematócrito e hemocultura o sangue de 459 serpentes pertencentes a 37 espécies. Os resultados revelaram baixa prevalência de tripanossomas, que foram encontrados em Viperidae (*Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*) e Colubridae (*Pseudoboa nigra*). Culturas de tripanossomas de *C. durissus* e *P. nigra* foram indistinguíveis, tanto na morfologia como no comportamento. Estudos morfológicos e de crescimento de um tripanossoma isolado de flebotomíneo (*Viannamyia tuberculata*) foram similares aos resultados obtidos com os tripanossomas de serpentes. Experimentos de infecção cruzada não revelaram restrição aos hospedeiros; sendo infectadas 3 espécies de serpentes com tripanossoma de *C. durissus*. Estudos filogenéticos baseados na SSUrDNA revelou que tripanossomas de serpentes agrupam com o tripanossoma de flebotomíneo, formando uma nova linhagem filogenética de *Trypanossoma* próxima do clado de tripanossomas de lagartos transmitidos por flebotomíneos. O grupo monofilético formado por tripanossomas de lagartos e serpentes sugere uma certa associação entre as histórias evolutivas destes tripanossomas e seus hospedeiros Squamatas. Além disso, os dados indicam fortemente que estes tripanossomas são transmitidos por flebotomíneos. Falhas na taxonomia utilizada nos tripanossomas de serpentes são discutidas e parâmetros moleculares precisam ser adaptados e enfatizados. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo filogenético molecular de tripanossomas de serpentes.

4.2 Uma história evolutiva compartilhada de tripanossomas de jacarés da América do Sul, crocodilos africanos e aves é suportada por análises filogenéticas utilizando os genes SSU rDNA e *gGAPDH*.

Anexo 2 A shared ancient evolutionary history of trypanosomes from South American caimans, African crocodiles and birds is supported by phylogenetic analyses using SSU rDNA and *gGAPDH* genes

Neste trabalho demonstramos através de evidências filogenéticas utilizando dados combinados de seqüências dos genes da SSU rDNA e *gGAPDH*, que o grupamento formado por tripanossomas de crocodilianos silvestres do Brasil, Cayman yacare (*Alligatoridae*), capturados no Pantanal e *Trypanosoma grayi*, uma espécie que circula entre crocodilos africanos e mosca tse-tsé, é suportado. Em exames realizados em Cayman yacare para detecção de tripanossomas, foi demonstrado baixas parasitêmias e níveis de infecções foram determinados pelos métodos de microhematócrito (20,93%) e hemoculturas (19,77%). A prevalência de tripanossomas em 86 animais examinados foi de 34,88% e foram obtidos 9 culturas. A morfologia dos tripomastigotas de sangue e tecido dos jacarés foi comparada com as descritas em outros tripanossomas de crocodilianos. Diferenças na morfologia e no crescimento das culturas de tripanossomas de jacarés corroboraram com o polimorfismo molecular que revelaram dois genótipos, sendo 8 isolados pertencentes ao genótipo Cay01 e um isolado definido como Cay02. Estes genótipos correspondem à duas diferentes espécies de tripanossomas. Inferências filogenéticas mostraram que o genótipo Cay01 é bastante relacionado com *T. grayi*, enquanto Cay02 é mais relacionado com o tripanossoma de ave *T. bennetti*. O clado composto pelos isolados de jacarés mais *T. grayi* e *T. bennetti* foram mais relacionados com o clado de tripanossomas de aves composto pelo *T. avium* e *T. corvi*. Juntos, estes dois clados formaram um grupo monofilético compreendendo todos os tripanossomas de crocodilianos e aves, apontando para uma associação entre as filogenias do parasita e do hospedeiro. A estimação do tempo de divergência baseada na composição do clado, na distância genética, biogeográfica e os eventos geológicos, providenciam evidências de uma história evolutiva antiga e compartilhada destes tripanossomas com seus hospedeiros archosaurios.

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;116:543-4.
- Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. Cell. 1990 Jun 29;61(7):1157-60.
- Alvarez F, Cortinas MN, Musto H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of *Trypanosoma* Molecular and Phylogenetic Evolution. 1996;5:333-43
- Anderson JR, Ayala SC. Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: first report from the Americas. Science (New York, NY. 1968 Sep 6;161(845):1023-5.
- Arantes JB, Fonseca F. Pesquisas sobre Trypanosomas. I *Trypanosoma butantanense*, sp. n., parasita da serpente *Ophis merremii* Wagler, 1824. Mem Inst Butantan. 1931a;6:215-22.
- Arantes JB, Fonseca F. Pesquisas sobre Trypanosomas. III. *Trypanosoma merremii*, sp. n., parasita da serpente *Ophis merremii* Wagler, 1824. Mem Inst Butantan. 1931b;6:227-9.
- Ashford R, Bray MA, Foster WA. Observations on *Trypanosoma boueti* in the skink Mabuyatriata (Reptilia) and the sandfly *Sergentomyia bedfordi* in Ethiopia. J Zool. 1973;171:285-92.
- Ayala SC. Two new trypanosomes from California toads and lizards. J Protozool. 1970;17:370-3.
- Ayala SC. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. The Journal of Protozoology. 1971 Aug;18(3):433-6.
- Ayala SC. The phlebotomine sandfly-protozoan parasite community of central california grasslands. Am Midl Nat. 1973;89:266-80.
- Ayala SC, Atkinson C, Vakalis N. Two new trypanosomes from North American snakes. J Parasitology. 1983;69:391-6.
- Ayala SC, McKay JG. *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. The Journal of protozoology. 1971 Aug;18(3):430-3.
- Bardsley JE, Harmsen R. The trypanosomes of anura. Adv Parasitol. 1973;11(0):1-73.
- Benton MJ. Classification and phylogeny of the diapsid reptiles. Zoological Journal of the Linnean Society. 1985(84):97-164.
- Benton MJH, D.A.T. Basic Palaentology: Prentice-Hall 1997.
- Bonen L. Trans-splicing of pre-mRNA in plants, animals, and protists. Faseb J. 1993 Jan;7(1):40-6.
- Bouet G. Sur quelques trypanosomes des vertèbres a sang froid de l'Afrique occidentale française. C R Seances Soc Biol Ses Fil. 1909;66:669-11.
- Bray RS. A check-list of the parasitic protozoa of West Africa with some notes on their classification. Bull Inst Fr Afr Noire, Ser A. 1964(26):238-315.
- Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of Phagotrophic Euglenids (Euglenozoa) as Inferred from Hsp90 Gene Sequences. J Eukaryot Microbiol. 2007;54(1):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 Nov 30;104(2):219-32.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, et al. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. Infection, Genetics and Evolution. 2003;2:173-83.
- 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 Sep;31(11):1218-26.
- Brumpt E. Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomiase de Chagas. Bull Soc Pathol Exot. 1914;7:706-10.
- Bruzik JP, Van Doren K, Hirsh D, Steitz JA. Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. Nature. 1988 Oct 6;335(6190):559-62.

- Brygoo E, R. Contribution à la connaissance de la Parasitologie des Caméléon malgaches. *Ann Parasitol Hum comp.* 1963;38:525-739.
- Brygoo E, R. Hematozoaires de reptiles malgaches. I. *Trypanosoma therezieni* n. sp. parasite des caméléons de Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 1963;31:133-41.
- Brygoo E, R. Description de *Trypanosoma brazili* E. Brumpt 1914. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 1965a;34:47-54.
- Brygoo E, R. Hematozoaires de reptiles Malgaches. III. Deux Trypanosomes nouveaux: *Trypanosoma haranti* n. sp. d'Ophidien et *Trypanosome domerguei* n. sp. parasite d'Iguane. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 1965b;34:47-54.
- Brygoo E, R. Hematozoaires de reptiles Malgaches. V. Notes sur les hemoparasites des Gerrhosaurides de Madagascar avec description d'un trypanosome nouveau: *Trypanosoma betschi* n.sp., parasite de *Zonosaurus* *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 1966(35):165-70.
- Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *J Mol Evol.* 2002;55:757-67.
- 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.
- Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. The phlebotomine sandfly-protozoan parasite community of central California grasslands. *Parasitology Today.* 2000;16:78-82.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* 2003;5(13):1231-40.
- Carini A, and Rudolph, M. Sur quelques hematozoaires de lézards au Brésil. *Bull Soc Pathol Exot.* 1912(5):592-5.
- Carranza S, Arnold EN. Investigating the origin of transoceanic distributions: mtDNA shows *Mabuya* lizards (Reptilia, Scincidae) crossed the Atlantic twice. *Systematics and Biodiversity.* 2003;1(2):275-82.
- Carranza S, Arnold EN. Systematics, biogeography, and evolution of *Hemidactylus* geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 2006 Feb;38(2):531-45.
- Carroll RL. *Vertebrate Paleontology & Evolution*: W. H. Freeman Inc. 1988.
- Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems.* 1981;14:461-81.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev.* 1998;73:203-66.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc R Soc Lond B.* 2004;271:1251-62.
- Chatton E, Blanc G. Le *Leptomonas* de la tarente dans un region indemne de bouton d'orient. Observations et experiences. *Bull Soc Pathol Exot Ses Fil.* 1918(11):595-609.
- Chia NM, Miller JH. Morphological and developmental studies of the snake trypanosome *Trypanosoma hydrae* Ayala, Atkinson, Vakalis, 1983 in experimentally infected hosts and in culture. *The Journal of protozoology.* 1984 May;31(2):352-6.
- Christensen HA, Telford RSJ. *Trypanosoma thecadactyli* sp. n. from forest geckoes in Panama, and its development in the sandfly *Lutzomyia trinidadensis* (Newstead) (Diptera, Psychodidae). *J Protozool.* 1972;19:403-6.
- Clack JA. An early tetrapod from 'Romer's Gap'. *Nature.* 2002 Jul 4;418(6893):72-6.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology.* 2006 Aug;133(Pt 2):159-69.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2002 Sep;97(6):877-80.
- 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(1-2):145-55.

- D'Alessandro A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES HM, ed. *Parasitic Protozoal diseases*. London: Arnold 1999:398-412.
- Dantas-Torres F, Oliveira-Filho EF, Souza BOF, Sá FB. First record of *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) parasitizing *Crotalus durissus cascavella* (Wagler, 1824) (Squamata: Viperidae) in the state of Pernambuco, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*. 2005;72(3):389-90.
- De Biasi P, Pessôa, S. B., Puerto, G. , Fernandes, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpente em meio de cultura. *Mem Inst Butantan*. 1975;39:85-101.
- DeBraga M, and O. Rieppel. Reptile phylogeny and the interrelationships of turtles. *Zool J Linn Soc*. 1997(120):281–354.
- Desquesnes M, McLaughlin, G., Zougrana, A., Dávila, A.M.R. 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):610-4.
- Desser SS, McIver SB, Jez D. Observations on the role of simuliids and culicids in the transmission of avian and anuran trypanosomes. *International Journal for Parasitology*. 1975;5:507-9.
- 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 Apr;59(2):353-8.
- Dirie MF, Wallbanks KR, Molyneux DH, McNamara J. Comparison of *Trypanosoma grayi*-like isolates from west and east Africa. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1991 Feb;85(1):49-52.
- 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;50:1943–51.
- 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;28:3017–21.
- Douglas ME, Douglas MR, Schuett GW, Porras LW. Evolution of rattlesnakes (Viperidae; *Crotalus*) in the warm deserts of western North America shaped by Neogene vicariance and Quaternary climate change. *Molecular ecology*. 2006 Oct;15(11):3353-74.
- Dutton JE, Todd JL, Tobey EN. Concerning certain parasitic Protozoa observed in Africa. *Ann trop Med Parasit*. 1907;1:287-371.
- Evans SE. At the feet of the dinosaurs: the early history and radiation of lizards. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2003 Nov;78(4):513-51.
- Fantham HB, Porter A. The endoparasites of certain South African snakes, together with some remarks on their structure and effects on their hosts. *Proc Zool Soc London*. 1950;120:599-647.
- Fantham HB, Porter A. The endoparasites of some North American snakes and their effects on the ophidia. *Proc Zool Soc London*. 1953;123:867-98.
- 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 Dec 15;90(24):11608-12.
- Fernandes O, Catanho MP, Seguras I, Labradas LR, Derrè R, Saraivas N, et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania* (Viannia) species. *Journal of Parasitology*. 1999a;85:563-8.
- 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 mini-exon gene. *Parasitology*. 1999b;118:161-6.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;66:261-71.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001 Jan-Feb;95(1):97-9.
- Fernandes O, Sturm NR, Derre R, Campbell DA. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1998;95:129-33.

- Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraive WM, et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. J Euk Microbiol. 1997;44:535-9.
- Ferreira RC. Diversity and phylogeny of anuran trypanosomes São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
- 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; *in press*.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitology. Jun 19:1-16.
- Fonseca F. *Trypanosoma matogrossense*, sp. n. Mem Inst Butantan. 1935;9:191-3.
- Freitas RA, Naiff RD, Barrett TV. Species diversity and flagellate infections in the sand fly fauna near Porto Grande, State of Amapa, Brazil (Diptera: Psychodidae. Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002 Jan;97(1):53-9.
- Fuller S, Baverstock P, King D. Biogeographic origins of goannas (Varanidae): a molecular perspective. Molecular phylogenetics and evolution. 1998 Apr;9(2):294-307.
- Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000 Jul-Aug;95(4):557-65.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature. 2003 Feb 27;421(6926):936-9.
- Gauthier J. Saurischian monophyly and the origin of birds *In: The Origin of Birds and the Evolution of Flight*. K. Padian (ed.): Memoirs California Academy of Sciences 1986.
- Gauthier J, A. G. Kluge, & T. Rowe. Amniote phylogeny and the importance of fossils. Cladistics. 1988b(4):105-209.
- Gauthier J, A. G. Kluge, & T. Rowe. The phylogeny and classification of the tetrapods. *In: The early evolution of the Amniota Volume 1: amphibians, reptiles, birds*. M. J. Benton (ed.) Oxford: Clarendon Press 1988c.
- Gauthier JA, Estes, R., and de Queiroz, K. A phylogenetic analysis of Lepidosauromorpha. *In Phylogenetic Relationships of the Lizard Families*. Estes, R. and Pregill, G.K. (eds.) Stanford, California: Stanford University Press 1988a.
- Gauthier JA. The diversification of the amniotes. *In: Major Features of Vertebrate Evolution*. D. R. Prothero and R. M. Schoch (ed.) Knoxville: The Paleontological Society. 1994.
- Gerrero S, Ayala SC. Hemoparasitos de algunos reptiles y anfibios de la selva amazonica del Peru. Rev Biol Inst Med Trop Sao Paulo. 1977;19:283-8.
- 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;107:269-77.
- Gibson W, Stevens J. Genetic exchange in the trypanosomatidae. Adv Parasitol. 1999;43:1-46.
- Gisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology. 1999;118:375-82.
- Gruby M. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. C R Hebd Seances Acad Sci. 1843;55:1134-6.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 - An updated review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2003;98:435-42.
- Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. Int J Parasitol. 2001;31:443-52.

- Haag J, O'Huigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Mar 1;91(1):37-49.
- Hajduk SL, Sabatini RS. RNA Editing, post-transcriptional restructuring of genetic information. In: Smith DF, Parsons M, eds. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. Oxford: Oxford University Press 1996:134-58.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007 Jul;44(1):15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International journal for parasitology*. 2004 Nov;34(12):1393-404.
- 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 Apr 1;35(4):431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiassi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol Ecol*. 2005b Sep;14(10):3167-75.
- Hannaert V, Albert MA, Rigden DJ, da Silva Giotto MT, Thiemann O, Garratt RC, et al. Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2003 Aug;270(15):3205-13.
- Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Oppendoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Oct;55(1-2):115-26.
- Hannaert V, Oppendoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *Molecular Evolution*. 1998;47:728-38.
- 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(7):1989-95.
- Hashimoto T, Nakamura Y, Kamaishi T, Adachi J, Nakamura F, Okamoto K, et al. Phylogenetic place of kinetoplastid protozoa inferred from a protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995;70:181-5.
- Hedges SB, Poling LL. A molecular phylogeny of reptiles. *Science (New York, NY)*. 1999 Feb 12;283(5404):998-1001.
- 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 Jun;41(2):207-12.
- Hoare CA. Studies on *Trypanosoma grayi*. 2. Experimental transmission to the crocodile. *Trans R Soc Trop med Hyg*. 1929;23:39-56.
- Hoare CA. The peritrophic membrane of *Glossina* and its bearing upon the life-cycle of *Trypanosoma grayi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1931;25:57-64.
- Hoare CA. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. life cycle in tsetse-fly and in the crocodile. *Parasitology*. 1931;23:449-84.
- Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool*. 1964;11(2):200-7.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1972.
- Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997;89:295-9.
- Honigberg BM. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, eds. *Progress in Protozoology*. New York: Academic Press 1963:68.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001;17(8):754-5.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science (New York, NY)*. 2001 Dec 14;294(5550):2310-4.

- 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 Apr;20(4):644-52.
- Iwabe N, Hara Y, Kumazawa Y, Shibamoto K, Saito Y, Miyata T, et al. Sister group relationship of turtles to the bird-crocodilian clade revealed by nuclear DNA-coded proteins. *Molecular biology and evolution*. 2005 Apr;22(4):810-3.
- 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;104:2035-42.
- Jakes KA, O'Donoghue, P.J. and Adlard, R. . Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit r RNA analyses. *Parasitology*. 2001a;123: 483-7.
- Jakes KA, O'Donoghue, P.J. , Munroe, P., Adlard, R. . Hemoprotozoa of freshwater turtles in southeastern Queensland, Australia. . *J Wildl Dis*. 2001b;37:12-9.
- Janke A, Arnason U. The complete mitochondrial genome of Alligator mississippiensis and the separation between recent Archosauria (Birds and Crocodiles). *Molecular biology and evolution*. 1997(14):1266-72.
- Janke A, Erpenbeck D., Nilsson M., Arnason U The mitochondrial genomes of the iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodylus*): implications for amniote phylogeny. *Proc R Soc London, B*. 2001(268):623-31.
- Janke A, Gullberg A, Hughes S, Aggarwal RK, Arnason U. Mitogenomic analysis place the gharial (*Gavialis gangeticus*) on the crocodile tree and provide pre-K/T divergence times for most crocodilians. *Journal of molecular evolution*. 2005;61(5):620-6.
- Katakura K, Kawazu SI, Naya T, Nagakura K, Ito M, Aikawa M, et al. Diagnosis of Kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36:2173-7.
- Lainson R. *Trypanosoma cecili* n. sp., a parasite of the South American cayman, *Caiman crocodylus crocodylus* (Linnaeus, 1758) (Crocodylia: Alligatoridae). *Protozoology*. 1977;3:87-93.
- Lainson R, Ishikawa EA, Silveira FT. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002 Nov-Dec;96(6):630-1.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, eds. *The Leishmaniases*. London: Academic Press 1987:1-120.
- Lainson R, Shaw JJ, Landau I. Some blood parasites of the Brazilian lizards *Plica umbra* and *Uranoscodon superciliosa* (Iguanidae). *Parasitology*. 1975;70:119-41.
- Landweber LF, Gilbert W. Phylogenetic analysis of RNA editing: a primitive genetic phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Feb 1;91(3):918-21.
- Laveran A, Mesnil F. Trypanosomes et Trypanosomiasis. Paris: Libraires de L'Académie de Médecine 1904.
- 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.
- Lloyd LL, Johnson WB. The trypanosome infections of tsetse flies in northern Nigeria and a new method of estimation. *Bull Entomol Res*. 1924;14:265-88.
- Lowichik A, Nystuen L, Palma M. Lizard hemoparasites from "Los Tuxtlas" Tropical Biology Station, Veracruz, Mexico. *The Journal of Parasitology*. 1988;74:885-8.
- Lukes J, Guilbride DL, Votycka 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;48:277-99.

- Lukes J, Jirku M, Dolezel D, Kral'ová I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of Ribosomal RNA Genes Suggests That Trypanosomes Are Monophyletic. *Journal of Molecular Evolution*. 1997;44:521-7.
- Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2001;98:7396-401.
- Mackerras MJ. The haematozoa of Australian reptiles. *Aust J Zool*. 1961;9:61-122.
- Maia da Silva F, Campaner M, Junqueira AC, *al. e.* Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular Ecology* 2007.
- 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(5):549-61.
- 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;128:283-94.
- Maia da Silva F, Teixeira MMG. Phylogenetic relationships among *Trypanosoma rangeli* isolates from man, wild mammals and triatomines from distinct geographic regions. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2003;45:41-2.
- 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 Feb;6(2):163-9.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3147-53.
- 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;88:566-71.
- 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 Jan;75(2):197-205.
- Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96:397-402.
- Maslov DA, Simpson L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today*. 1995;11(1):1995.
- Mathis C, Leger M. Sur un nouveau trypanosome des Serpents du Tonkin. *C R Seances Soc Biol Sés Fil*. 1909;67:572-4.
- Mausfeld P, Vences M, Schmitz A, Veith M. First data on the molecular phylogeography of scincid lizards of the genus *Mabuya*. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2000 Oct;17(1):11-4.
- Mendonça MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology*. 2002 Feb;124(Pt 2):177-84.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov A, Alexandrov K, Podlipaev S, Maslov D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001;48(2):161-9.
- Michels PA. Evolutionary aspects of trypanosomes: analysis of genes. *Journal of Molecular Evolution*. 1986;24(1-2):45-52.
- Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006 Dec;1763(12):1463-77.
- Minter-Goedbloed E, Leak CJ, Minter DM, McNamara J, Kimber C, Bastien P, et al. *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: development in vitro and in insect hosts. *Parasitol Res*. 1993;79:329-33.
- Minter-Goedbloed E, Pudney M, Kilgour V, Evans DA. First record of a reptile trypanosome isolated from *Glossina pallidipes* in Kenya. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* (Berlin, Germany). 1983;69(1):17-26.

- Molyneux DH. Vector relationships in the Trypanosomatidae. *Adv Parasitol.* 1977;15:1-82.
- 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;51:2211-9.
- 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;54:1861-75.
- Nilsen TW. Trans-splicing: an update. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1995;73:1-6.
- Njagu Z, Mihok S, Kokwaro E, Verloo D. Isolation of *Trypanosoma brucei* from the monitor lizard (*Varanus niloticus*) in an endemic focus of Rhodesian sleeping sickness in Kenya. *Acta Tropica.* 1999 Mar 15;72(2):137-48.
- Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Davila AM. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res.* 2005;95(3):186-92.
- Noyes H. Can *Trypanosoma* Trees be Trusted? *Parasitology today* (Personal ed. 1998 Feb;14(2):49-50.
- Nunes VLB, Oshiro ET. *Trypanosoma* sp. em jacaré, *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Crocodylia:Alligatoridae). *Semina.* 1990;11(1):62-5.
- Pedroso A, Cupolillo E, Zingales B. 2003. *Mol Biochem Parasitol.* Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation;129(1):79-90.
- Pelaez D, Streber F. Estudios sobre hematozoarios. V. *Trypanosoma serveti* nov. sp. parasito de un Sceloporus de Mexico. *An Esc Nac Cienc Biol (Mexico City).* 1955;8:147-52.
- Perry K, Agabian N. mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia.* 1991;47(2):118-28.
- Pessôa S, B. *Trypanosoma hoguei* n. sp. parasita da falsa muçurana (*Rachidelus brazili* Boul.). *O Hospital, Rio de Janeiro.* 1968;73:1257-60.
- Pessôa S, B. , Fleury G, C. Duas novas espécies de Tripanosomas parasitas de serpentes do Brasil. *Ver Brasil Biol.* 1969 Abril;29(1):81-6
- Pessôa SB. Contribuição ao estudo dos hemoparasitos dos Ophideos. I. Nota. Novo espécie de *Trypanosoma* parasita do *Philodryas nattereri*. *Rev Biol Hyg São Paulo.* 1928;1:51-62.
- Pessôa SB, De Biasi, P. . *Trypanosoma cascavelli* sp. n. parasita da cascavel: *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro.* 1972;15(2):67-70.
- Pessôa SB, de Biasi P, Puerto G. Nota sobre a frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. *Mem Inst Butantan.* 1974;38:69-118.
- Pinto CDM. Ensaio monografico dos Hirudineos. *Rev Mus Paulista.* 1923;13:857-1118.
- Piontkivska H, Hughes AL. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;144(1):94-9.
- Pough FH, Janis, C. M. & Heiser, J. B. . A vida dos Vertebrados. 3a ed. São Paulo: Atheneu Editora 2003.
- 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;51:751-8.
- Reisz RR. *Petrolacosaurus*, the Oldest Known Diapsid Reptile. *Science (New York, NY).* 1977(196):1091-3.
- Rest JS, J. C. Ast, C. C. Austin, P. J. Waddell, E. A. Tibbetts, J. M. Hay, and D. P. Mindell. Molecular systematics of primary reptilian lineages and the tuatara mitochondrial genome. *Mol Phylogenet Evol.* 2003(29):289-97.
- Rieppel O. Osteology of *Simosaurus gaillardoti* and the relationships of stem-group sauropsidia. *Fieldiana Geology.* 1994(1462):1-85.
- Rieppel O. The Genus Placodus: Systematics, Morphology, Paleobiogeography, and Paleobiology. *Fieldiana (Geology), NS.* 1995(31):1-44.

- 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. *Veterinary Parasitology*. 2003 Oct 20;116(3):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 Feb;132(Pt 2):215-24.
- Roos J, Aggarwal RK, Janke A. Extended mitogenomic phylogenetic analyses yield new insight into crocodilian evolution and their survival of the Cretaceous-Tertiary boundary. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007;45(2):663-73.
- 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(2):137-45.
- Ruppert EE, Barnes RD. *Invertebrate Zoology* 1994.
- Salgado ML. *História Ecológica da Terra: Labouriau* 1994.
- Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, et al. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2002 Dec;96(8):755-64.
- Sawyer RT. *Leech biology and behaviour*. Oxford Oxford Science Publications 1986.
- Sazima I, Haddad CFB, eds. *Répteis da Serra do Japi: notas sobre História Natural*. Campinas, S.P.: UNICAMP/FAPESP 1992.
- Schonian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylen S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Mar 5;106(2):239-48.
- Scorza BJV, Dagert Boyer C. *Trypanosoma mega* Dutton and Todd, 1903 y *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 en batracios y una nueva especie en un saurio de Venezuela. *Bol Soc Venezolana Cien Nat, Caracas*. 1955;84(16):205-8.
- 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(6):618-25.
- 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(3):268-79.
- Shortt HE, Swaminath CS. Life history and morphology of *Trypanosoma phlebotomi* (Mackie 1914). *Ind J Med Res*. 1931;19:541-63.
- Siddall ME, Apakupakul K, Bureson 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(3):346-51.
- Siddall ME, Bureson EM. Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I. *Mol Phylogenet Evol*. 1998;9(1):156-62.
- Siddall ME, Desser SS. Alternative leech vectors for frog and turtle trypanosomes. *The Journal of Parasitology*. 1992 Jun;78(3):562-3.
- Siegel TN, Tan KS, Cross GA. Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 2005;25:9586-94.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phylogenet Evol*. 2004;30:201-12.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol*. 2002;19:2071-83.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):168-74.

- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review of Microbiology*. 1987;41:363-82.
- 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;9:265–76.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Mar;83(5):1383-7.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Dec 20;83(2):141-52.
- Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998 Sep-Oct;93(5):669-76.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol*. 2001 Dec;1(2):143-50.
- Stevens JR, Gibson WC. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today*. 1999a Nov;15(11):432-7.
- Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica*. 1999b Oct-Dec;15(4):673-84.
- 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 Jan;118:107-16.
- 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. *International Review of Cytology*. 1992;141:65-88.
- Sturm NR, Murthy VK, Garside L, Campbell DA. The mini-exon gene of *Trypanosoma* (Nannomonas) simiae: sequence variation between isolates and a distinguishing molecular marker. *Acta Tropica*. 1998 Sep 15;71(2):199-206.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(2):423 -32.
- Taylor JE, Rudenko G. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet*. 2006;22:614–20.
- Teixeira MM, Serrano MG, Camargo EP. New data from old Trypanosomatid preparations. *Parasitology today* (Personal ed. 2000 Jun;16(6):261-3.
- Teixeira MM, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Experimental Parasitology*. 1996 Dec;84(3):311-9.
- Telford SR. Saurian malaria in the Caribbean: *Plasmodium azurophilum* sp. Nov., a malarial parasite with schizogony and gametogony in both red and white blood cells. *Int J Parasitol*. 1975.
- Telford SR. A taxonomic reconsideration of some Plasmodium species from iguanid lizards. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1979(54):29–144.
- Telford SR. Evolutionary implications of Leishmania amastigotes in circulatory blood cells of lizards. *Parasitology*. 1979(79):314-24.
- Telford SR. Two new trypanosomes from neotropical gekkonid lizards. *J Parasitol*. 1979;65(6):898-901.
- Telford SR. *Tantilla coronata* Baird and Girard. Southeastern crowned snake. *Cat Am Amphibians and Reptiles*. 1982(308):1-2.
- Telford SR. The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles, *In*: JP Kreier, *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., Vol. 10. San Diego: Academic Press 1995.
- 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 Research*. 1997;25:4876-82.
- Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv Parasitol*. 1995;36:47-115.

- 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;34:445-54.
- 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.
- Ventura RM, Takata CS, Silva RA, Nunes VL, Takeda GF, Teixeira MM. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *The Journal of Parasitology.* 2000 Dec;86(6):1289-98.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994 Dec;24(8):1317-31.
- Vidal N, Hedges SB. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies.* 2005 Oct-Nov;328(10-11):1000-8.
- Viola LB, Campaner M, Takata CSA, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, et al. Phylogeny of Snake Trypanosomes Inferred by SSU rDNA Sequences, their Possible Transmission by Phlebotomines, and Taxonomic Appraisal by Molecular, Cross-Infection and Morphological Analysis. *Parasitology.* in press.
- Vitt LJ. An introduction on the ecology of cerrado lizards. *J, Herpetol.* 1991;25:79-90.
- von der Heyden S, Chao EE, Vickerman K, Cavalier-Smith T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of euglenozoa. *J Eukaryot Microbiol.* 2004 Jul-Aug;51(4):402-16.
- Votýpka J, Lukes J, Oborník M. Phylogenetic relationship of *Trypanosoma corvi* with other avian trypanosomes. *Acta Protozool.* 2004;43:225-31.
- Votýpka J, Oborník M, Volf P, Svobodová M, Lukes J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology.* 2002;125:253-63.
- Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966;18:124-93.
- Wallace FG. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: Lumsden WHR, Evans DA, eds. *Biology of the Kinetoplastida*. New York: Academic Press 1979:213-40.
- Walliker D. *Trypanosoma superciliosae* sp. nov. from the lizard *Uranoscodon superciliosa* L. *Parasitol* 1965;55:601-6.
- Wenyon CM. A trypanosome and a haemogregarine of a tropical American snake *Parasitology.* 1909a;1:314-7.
- Wenyon CM. Report of traveling pathologist and protozoologist. In "Third Report, Wellcome Research Laboratory at the Gordon Memorial College, Khartoum" (A. Balfour, ed.). London: Baillière 1909b (dated 1908).
- Wenyon CM. *Protozoology*. London: Baillière, Tindall and Cassel Ltd 1965.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledon R, Campbell DA, et al. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from *Heteroptera* using the spliced leader RNA gene. *Parasitology.* 2004 Nov;129(Pt 5):537-47.
- Whiting AS, Sites Jr. JA, Pellegrino KCM, Rodrigues MT. Comparing alignment methods for inferring the history of the new world lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetics and Evolutions.* 2006;38:719-30.
- Wiemer EA, Hannaert V, van den IPR, Van Roy J, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanoplasma borelli*: an evolutionary scenario of subcellular compartmentation in kinetoplastida. *Journal of Molecular Evolution.* 1995 Apr;40(4):443-54.
- Woo PTH. Trypanosomes in amphibians and reptiles in southern Ontario. *Can J Zool.* 1969;47:981-8.
- Worthey EA, Schnauffer A, Mian IS, Stuart K, Salavati R. Comparative analysis of editosome proteins in trypanosomatids. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:6392-408.
- 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 Mar 15;99(1):69-76.

Zardoya R, Meyer A. Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Nov 24;95(24):14226-31.

Zug GR. *Herpetology*. San Diego: Academic Press 1993.