Oneida Espinosa Álvarez

Spliced Leader (SL) RNA: análises de genes e regiões intergênicas
com aportes na filogenia, taxonomia e genotipagem
de *Trypanosoma* spp. de todas as classes de vertebrados

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

Área de concentração: Biología da Relação Patógeno-
Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Geraldtes Teixeira

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

São Paulo
2017

RESUMO

Álvarez OE. Análises estruturais, filogenéticas e do polimorfismo de genes *Spliced Leader* (SL) em *Trypanosoma* spp. de diversos hospedeiros vertebrados. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Tripanossomas são parasitas obrigatórios de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados com um número crescente de espécies, linhagens e genótipos sendo descritos nos últimos anos. Análises moleculares têm sido essenciais para conhecer a diversidade e compreender a complexidade e a história evolutiva dos tripanossomas patogênicos (humanos e animais) e não-patogênicos de todas as classes de vertebrados. Além dos marcadores filogenéticos tradicionais (SSU rRNA e gGAPDH genes), sequências do gene Spliced Leader (SL) e regiões intergênicas têm sido empregadas para identificação e genotipagem de tripanossomatídeos. No entanto, os estudos têm se restringido aos tripanossomas patogênicos para o homem e animais domésticos. Nosso principal objetivo neste estudo foi caracterizar sequências do gene SL (envolvido no mecanismo de processamento de RNA via *trans-splicing*) de uma grande amostra de tripanossomas, incluindo representantes de diferentes classes de vertebrados posicionados em todos os clados da árvore filogenética do gênero *Trypanosoma*.

Estruturas primárias e secundárias do gene SL-RNA (exon e intron), e polimorfismo e associação com 5S rRNA de regiões intergênicas (SL-IR), foram comparadas em um contexto evolutivo e, com base nos dados obtidos, utilizadas para definir espécies, linhagens e genótipos. Duas novas espécies de tripanossomas de morcegos, filogeneticamente validadas pela filogenia tradicional, foram aqui caracterizadas: *T. livingstonei* de morcegos capturados em Moçambique (África Oriental) e *T. wauwau* de morcegos da América Central e do Sul. Estes tripanossomas foram posicionados na base do clado *T. cruzi*, e suas relações filogenéticas com outras espécies desse clado foram apoiadas por análises de sequências de SL. O posicionamento destes tripanossomas no Velho e Novo Mundo apoiam a hipótese de que o clado *T. cruzi* foi ancestralmente um grupo de parasitas de morcegos (*bat seeding hypothesis*). Os tripanossomas desse grupo ancestral evoluíram durante um longo tempo nesses hospedeiros e, então, passaram a infectar diferentes mamíferos, provavelmente via processos adaptativos sucessivos mediados por vetores hematófagos dando, assim, origem a *T. cruzi* e *T. rangeli*. Essas duas espécies são parasitas generalistas de mamíferos de diversas ordens, incluindo seres humanos. Análises multilocus, incluindo sequências de SL-RNA, posicionaram *T. rangeli* muito mais filogeneticamente relacionado com *T. vespertilionis* e *T. conorhini*, parasitas do Velho Mundo, do que com *T. cruzi*.

Nesse estudo, foram identificadas três novas espécies de tripanossomas isolados de morcegos e cimiídeos da Guiné-Bissau (África Ocidental), posicionadas nas linhagens contendo *T. vespertilionis* e *T. conorhini*. Esses tripanossomas compartilham estruturas primárias e secundárias de SL-RNA com *T. rangeli*, porém, diferem amplamente em suas sequências de SL-IR. Apesar de *T. cruzi* e *T. rangeli* serem as únicas espécies que infectam o homem e uma grande variedade de mamíferos e de vetores na região Neotropical, as análises filogenéticas apoiam a hipótese de que as histórias evolutivas desses parasitas foram separadas há muito mais tempo do que imaginávamos. Tcbat é o mais novo genótipo de *T. cruzi*, descrito em morcegos brasileiros, que difere de todas as DTUs (*Discret Typing Units*) reconhecidas (Tcl-VI) de *T. cruzi*, apesar de significativamente relacionado com Tcl. Nesse estudo, isolados brasileiros e colombianos foram submetidos a análises multilocus, que corroboraram que Tcbat é bastante relacionado com Tcl, porém, claramente separado dessa e de todas as outras DTUs, validando Tcbat como uma DTU independente. Sequências de SL separaram Tcbat de todas as outras DTUs e revelaram grupos genéticos de Tcbat, provavelmente associados com a origem geográfica dos isolados.

Analizamos as sequências de SL a fim de investigar a diversidade genética inter- e intra-DTUs, com ênfase em isolados humanos da Amazônia e ciclos silvestres de TcI, TcIII e TcIV DTUs. Foram sequenciados mais de 100 isolados brasileiros, que foram comparados com isolados de diferentes origens. As análises de sequências de SL-IR revelaram um número maior de genótipos intra-TcI comparados aos já descritos em diversos países, distribuídos em três grupos genéticos: TcI A, B e C. Pela primeira vez, sequências de SL-IR foram empregadas para avaliar diversidade genética intra-TcIII e TcIV, revelando uma maior diversidade nessas DTUs comparadas à TcI. As linhagens filogenéticas e genótipos descritos estão relacionadas com origem geográfica, alguns grupos genéticos podem ser associados com hospedeiros vertebrados, mas não com ciclos de transmissão domésticos ou silvestres.

Análises comparativas de sequências das diferentes regiões do gene SL, e das regiões intergênicas localizadas entre as repetições de SL-RNA, revelaram marcadores úteis para diagnóstico e taxonomia, permitindo a identificação de subgêneros, espécies, linhagens/DTUs e genótipos. Além disso, todas as informações sobre estruturas secundárias, tamanhos dos transcritos e das regiões intergênicas, e ausência/presença de 5S rRNA na SL-IR foram mapeadas na árvore filogenética permitindo avaliar cenários evolutivos e relações filogenéticas inter- e intra clados do gênero *Trypanosoma*. Os resultados obtidos com esse estudo ampliaram em larga escala nosso conhecimento a respeito da plasticidade e conservação de regiões específicas dos genes SL, e das regiões intergênicas, uma das peculiaridades mais intrigantes desse fascinante grupo de parasitas.

Palavras chave: *Spliced Leader*. Tripanossoma. Trypanosomatidae. *Trypanosoma cruzi*. *Barcoding*. Polimorfismo genético. Filogenia. Taxonomia.

ABSTRACT

Álvarez OE. Structural, phylogenetic and polymorphism analysis of *Spliced Leader* (SL) genes of *Trypanosoma* spp. isolated from vertebrate hosts. [Thesis Ph. D. (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2017.

Trypanosomes are obligate parasites of a great variety of vertebrate and invertebrate hosts with large number of species, lineages and genotypes. Molecular analyses have been essential to understand the complexity of trypanosomes and the evolutionary history of pathogenic in human and livestock, and non-pathogenic species of all classes of vertebrates. In addition to traditional phylogenetic markers (SSU rRNA and gGAPDH genes), Spliced Leader (SL) genes (involved in mRNA processing via trans-splicing) and intergenic regions between SL repeats have been employed for identification and genotyping of trypanosomatids. However, data about SL sequences are mostly restricted to pathogenic species. Our main goal in this study was to characterize SL sequences from a large sampling of trypanosomes of all vertebrate classes representative of the major clades of *Trypanosoma*. Primary and secondary structures of SL-RNA (exon and intron), and intergenic region (SL-IR) polymorphism and association with 5S rRNA, were compared within an evolutionary framework, and then evaluated to define species, lineages and genotypes.

Two new species of trypanosomes from bats, phylogenetically validated as new species, were herein characterized and supported by SL-RNA sequences: *Trypanosoma livingstonei* from bats captured in Mozambique (East Africa) and *T. wauwau* of Neotropical bats from Central and South America. These trypanosomes nested in the clade *T. cruzi*, and their phylogenetic relationships as basal species was strongly supported by SL data. The positioning of these Old and New World trypanosomes support the hypothesis that the ancestors of *T. cruzi* clade were bat-restricted trypanosomes that evolved in these hosts and later jumped different times into other mammals (bat seeding hypothesis), giving origin to *T. cruzi* and *T. rangeli*, which are generalists of mammals including man. Multilocus analysis, including SL-RNA genes, support *T. rangeli* much more closely related to Old World *T. vespertilionis* and *T. conorhini* than to *T. cruzi*. Here, we identified three new species of trypanosomes of bats and bat bugs (cimicid) from Guinea Bissau (West Africa), all clustering with *T. vespertilionis* and *T. conorhini*. These trypanosomes share with *T. rangeli* highly similar SL secondary structures and intron sequences, but largely differed in their SL-IR sequences. Although *T. cruzi* and *T. rangeli* share mammalian hosts and vectors in the Neotropics, phylogenetic results support the hypothesis that these human-infective parasites have long independent evolutionary histories.

T. cruzi Tcbat is a genotype originally described in Brazilian bats that does not cluster into any of the six recognized DTUs (TcI-VI). Here, Brazilian and Colombian Tcbat isolates were submitted to multilocus analysis. Results strongly supported Tcbat as a monophyletic lineage sister to TcI, and clearly separated from all DTUs, then supporting Tcbat as an independent DTU. Highly polymorphic markers including SL sequences revealed genetic groups within Tcbat, likely associated with geographical origin of the isolates. We further explored SL-RNA sequences to assess inter and intra-DTUs genetic diversity, with emphasis in sylvatic cycles of TcI, TcIII and TcIV DTUs. Whole SL sequences were determined for more than 100 Brazilian isolates and compared with those from different origins. Sequences of SL-IR revealed a larger number of intra-TcI genotypes distributed in three genetic groups: TcI A, B and C. For the first time, SL-IR sequences were employed to assess intra-TcIII and TcIVSA genetic diversity, revealing greater diversity within these two DTUs compared with TcI, and supporting phylogenetic lineages that could be associated to geography, but not with domestic or sylvatic transmission cycles. Molecular markers defined by this study can be used to developed DTU and intra-DTU specific PCR assays.

Comparative analyses of different regions of SL repeats revealed sequences useful for diagnostic and taxonomic purposes, allowing the identification of clades/subgenera, species, lineages and

genotypes. In addition, we mapped secondary structures, length of SL repeats, and absence/presence of 5S rRNA inserted into intergenic regions onto current phylogenetic tree to evaluate evolutionary scenarios within and across all major lineages of *Trypanosoma*. Altogether, our findings revealed an evolutionary gradient of SL-RNA repeats in *Trypanosoma* spp. of all major phylogenetic lineages largely contributing to the understanding of both plasticity and conservation trends of SL-RNA one of the most intriguingly feature of these fascinating group of parasites.

Key Words: *Spliced Leader*. Trypanosome. Trypanosomatidae. *Trypanosoma cruzi*. *Barcoding*. Genetic polymorphism. Phylogeny. Taxonomy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos compreendem um grupo de protozoários pertencentes à Classe Kinetoplastida (antiga Ordem Kinetoplastida), caracterizada pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da única mitocôndria destes organismos, constituída por moléculas circulares de DNA (maxicírculos e minicírculos) concatenadas em uma única rede (Breglia et al., 2007). Os maxicírculos correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos e codificam as proteínas necessárias para a atividade mitocondrial, enquanto que os minicírculos codificam os pequenos RNAs-guia (gRNA), que auxiliam na edição dos mRNAs dos maxicírculos mitocondriais (Campbell et al., 2003).

Os cinetoplastídeos dividem-se em duas subclasses: Prokinetoplastina, que inclui os gêneros *Ichthyobodo* e *Perkinsiella*; e Metakinetoplastina, formada pelas ordens Trypanosomatida, que abriga apenas os representantes da família Trypanosomatidae, e Bodonida, que agrupa as antigas ordens Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida (Moreira et al., 2004; Cavalier-Smith, 2016). A família Trypanosomatidae inclui parasitas obrigatórios com ciclos de vida monoxênico (desenvolvimento restrito em hospedeiros invertebrados) e heteroxênico, cujo desenvolvimento se completa com alternância entre hospedeiros invertebrados (principalmente insetos e sanguessugas) e vertebrados (incluindo os humanos) ou plantas (Tabela 1).

Atualmente, quatro subfamílias estão formalmente descritas na família Trypanosomatidae: Strigomonadinae, Blechomonadinae, Leishmaniinae e Phytomonadinae (Figura 1) (Teixeira et al., 2011; Jirku et al., 2012; Votypka et al., 2013; Yurchenko et al., 2014). No entanto, algumas espécies ainda não foram posicionadas em uma subfamília, o que gera lacunas na classificação destes organismos (Yurchenko et al., 2014).

Dentre os tripanossomatídeos heteroxênicos, são várias as espécies conhecidas como agentes de doenças em humanos e animais de interesse veterinário: *Trypanosoma brucei gambiense*, agente etiológico da tripanossomíase humana africana ou doença do sono; *T. cruzi*, que causa a doença de Chagas na América Latina; *T. vivax*, que infecta ungulados na África e América do Sul; e várias espécies de *Leishmania* que causam um espectro de doenças conhecidas como leishmanioses a nível mundial. Igualmente, parasitas do gênero *Phytomonas* infectam plantas, gerando, ocasionalmente, doenças em plantações, que comprometem áreas agrícolas nas Américas Central e do Sul (Camargo, 1999; Jaskowska et al., 2015).

Tabela 1 - Família Trypanosomatidae e gêneros descritos.

Subgêneros de *Leishmania*: *L. Leishmania*, *M. Mundinia*, *P. Porcisia*, *V. Viannia*. Subgêneros de *Trypanosoma*: *D. Duttonella*, *H. Herpetosoma*, *M. Megatrypanum*, *N. Nannomonas*, *P. Pycnomonas*, *S. Schizotrypanum*, *T. Trypanozoon*.

GÊNERO	ESPECIE-TIPO	CICLO DE VIDA	HOSPEDEIRO	REFERÊNCIA
<i>Angomonas</i>	<i>A. deanei</i>	Monoxênico	Diptera (Calliphoridae, Syrphidae) Hemiptera (Reduviidae)	Teixeira et al., 2011
<i>Blechomonas</i>	<i>B. ayalai</i>	Monoxênico	Siphonaptera	Votypka et al., 2013
<i>Blastocrithidia</i>	<i>B. gerridis</i>	Monoxênico	Hemiptera.	Laird, 1959
<i>Crithidia</i>	<i>C. fasciculata</i>	Monoxênico	Hemiptera, Díptera.	Leger, 1902
<i>Endotrypanum</i>	<i>E. schaudinni</i>	Heteroxênico	Vetor: Dípteros (Phlebotominae) Hospedeiros: preguiças	Mesnil, Brimont, 1908
<i>Herpetomonas</i>	<i>H. muscarum</i>	Monoxênico	Dípteros principalmente. Hemípteros predadores Dictyoptera (barata) Planta Rata egípcia Humanos imunodeprimidos	Kent, 1880 Borghesan et al., 2013 Yurchenko et al., 2016
<i>Jaenimonas</i>	<i>J. drosophilae</i>	Monoxênico	Díptera: Drosophilidae	Hamilton et al., 2015
<i>Kentomonas</i>	<i>K. sorsogonicus</i>	Monoxênico	Díptera (Sarcophagidae, Lauxaniidae)	Votypka et al., 2014
<i>Lafontella</i>	<i>L. mariadeanei</i>	Monoxênico	Díptera (Muscidae)	Yurchenko et al., 2016
<i>Leishmania</i>	<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (M.) enrietti</i> <i>L. (S.) tarentolae</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	Heteroxênico	Vetor: Díptera (Phlebotominae principalmente). Alguns carrapatos e Ceratopogonidae. Hospedeiros: Humanos, mamíferos, lagartos	Ross, 1903 Espinosa et al., 2016
<i>Leptomonas</i>	<i>L. butschlii</i>	Monoxênico	Hemiptera.	Kent, 1880
<i>Lotmaria</i>	<i>L. passim</i>	Monoxênico	Hymenoptera (Apidae)	Schwars et al., 2015
<i>Novymonas</i>	<i>N. esmeraldas</i>	Monoxênico	Hemiptera: Rhopalidae	Kostygov et al., 2016
<i>Paratrypanosoma</i>	<i>P. confusum</i>	Monoxênico	Díptera (Culicidae)	Flegontov et al., 2013
<i>Phytomonas</i>	<i>P. serpens</i>	Heteroxênico	Vetor: Hemiptera Hospedeiros: Plantas.	Donovan, 1909
<i>Porcisia</i>	<i>P. hertigi</i>	Heteroxênico	Vetor: Desconhecido Hospedeiros: Porco espinhos.	Espinosa et al., 2016
<i>Sergeia</i>	<i>S. podlipaevi</i>	Monoxênico	Díptera (Ceratopogonidae)	Svodová et al., 2007
<i>Strigomonas</i>	<i>S. oncopelti</i>	Monoxênico	Díptera (Culicidae, Phlebotominae) Hemiptera (Lygaeidae)	Teixeira et al., 2011
<i>Trypanosoma</i>	<i>T. (D.) vivax</i> <i>T. (H.) lewisi</i> <i>T. (M.) theileri</i> <i>T. (N.) congolense</i> <i>T. (P.) suis</i> <i>T. (S.) cruzi</i> <i>T. (T.) brucei</i>	Heteroxênico	Vetor: Hemiptera, Díptera, Pulgas, Sanguessugas, Hospedeiros: Humanos, vertebrados.	Gruby, 1843 Hoare, 1972
<i>Wallacemonas</i>	<i>W. collosoma</i>	Monoxênico	Heteroptera (Gerridae, Saldidae) Díptera (Sarcophagidae)	Kostygov et al., 2014
<i>Zelonía</i>	<i>Z. costaricensis</i>	Heteroxênico	Vetor: Heteroptera (Reduviidae) Hospedeiros: Porco espinhos.	Espinosa et al., 2016

O sistema taxonômico “clássico” dos tripanossomatídeos esteve baseado na combinação de morfotipos e ciclo de vida (monoxênico e heteroxênico). Os morfotipos eram determinados pela posição do cinetoplasto e do flagelo, a forma celular, entre outros caracteres. A maioria dos gêneros mostra um subconjunto de diversos morfotipos, porém só um deles é considerado típico, servindo como um critério taxonômico importante para a definição do gênero (Maslov et al., 2013). Usualmente, distinguem-se oito morfotipos (Figura 2):

Figura 1 - Árvore filogenética bayesiana, baseada na sequência do SSU rRNA, mostrando as principais relações entre os tripanossomatídeos. Verde=Bodonídeos, Amarelo=Monoxênicos, Vermelho= Heteroxênicos. Modificado de Votypka et al., 2015.

- Amastigotas - formas arredondadas sem flagelo extracelular (Figura 2A). No gênero *Leishmania*, são tipicamente encontradas no interior de células do hospedeiro vertebrado; também observadas em outros tripanossomas e em *Phytomonas*, parasitando plantas.
- Promastigotas - formas alongadas, exibindo bolso flagelar estreito e cinetoplasto anterior ao núcleo (Figura 2P). Inicialmente considerados típicos para *Leptomonas*, *Phytomonas* e *Leishmania*, são também observadas nos gêneros *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Wallacemonas* e *Sergeia*, bem como em alguns tripanossomas.
- Coanomastigotas - corpo celular em forma de cevada, com bolso flagelar largo e cinetoplasto anterior ou adjacente ao núcleo (Figura 2C); são consideradas formas típicas do gênero *Crithidia*.

- Endomastigotas - formas arredondadas ou ovais, com flagelo muito curto convoluido ao redor do núcleo (Figura 2EN). Formas características do gênero *Wallaceina* (agora *Wallacemonas*).
- Opistomastigotas - células exibindo bolso flagelar longo e estreito e cinetoplasto posterior ao núcleo (Figura 2O). Definem o gênero *Herpetomonas*.
- Opistomorfos - foram identificadas recentemente nos gêneros *Angomonas* e *Strigomonas* (Figura 2OM).
- Epimastigotas - formas alongadas, com cinetoplasto justanuclear e flagelo aderido ao corpo celular, tornando-se livre na extremidade anterior (Figura 2E). Acreditava-se serem formas específicas para os gêneros *Blastocrithidia* e *Trypanosoma*.
- Tripomastigotas - células alongadas, com cinetoplasto posterior ao núcleo e flagelo aderido ao corpo celular, tornando-se livre na extremidade anterior (Figura 2T). São formas características do gênero *Trypanosoma*.

Figura 2 - Morfotipos básicos dos tripanossomatídeos.

A, amastigota; C, coanomastigota; E, epimastigota; EM, endomastigota; O, opistomastigota; OM, opistomorfo; P, promastigota; T, tripomastigota. Fonte: Maslov et al., 2013

1.1.1 Gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* inclui espécies que realizam seu ciclo de vida em hospedeiros invertebrados e vertebrados e a diversidade dos tripanossomas reflete-se na variedade de ambos os tipos de hospedeiros. Dependendo do tripanossoma, os vetores podem ser dípteros, hemípteros, pulgas, carrapatos e sanguessugas, e os hospedeiros vertebrados podem compreender aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos (Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Stevens, 2008).

A transmissão dos tripanossomas por vetores hematófagos determina que pelo menos uma parte do ciclo de vida ocorra no hospedeiro vertebrado, com a invasão de tecidos (por exemplo, o Sistema Nervoso Central por *T. brucei*) e células (células musculares por *T. cruzi*) (Hamilton et al., 2007). O desenvolvimento no hospedeiro invertebrado é complexo e variado, envolvendo frequentemente ciclos de diferenciação e multiplicação no trato digestório, assim como migrações a diferentes locais de desenvolvimento. As formas infectantes resultantes são ou produzidas nas regiões bucais e então transmitidas durante a alimentação via saliva (por exemplo *T. brucei* e *T. rangeli*), ou na porção posterior do intestino, do que resulta a transmissão via contaminativa pelas fezes. As duas formas podem também ser transmitidas pela ingestão do vetor (Hamilton et al., 2007). Os tripanossomas são parasitos obrigatórios de todos os tipos de vertebrados, nos quais a forma tripomastigota encontra-se livre na corrente sanguínea. As formas intracelulares são encontradas em algumas espécies, por exemplo, *T. cruzi*.

Hoare (1972) subdividiu os tripanossomas de mamíferos nas seções Salivaria e Stercoraria, dependendo do modo de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado. Os tripanossomas da Seção Salivaria, todos transmitidos pela mosca tsé-tsé, foram subdivididos em quatro subgêneros (*Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas* e *Pycnomonas*), com base na morfologia e desenvolvimento no vetor (Hoare, 1972). O grupo como um todo caracteriza-se pela variação antigênica, muito estudada em cepas de *T. (Trypanozoon) brucei*, *T. (T.) evansi*, *T. (T.) equiperdum*, *T. (Nannomonas) congolense* e *T. (Duttonella) vivax*. Estas espécies, juntamente com *T. (N.) simiae* e *T. (N.) godfreyi*, têm cariótipos semelhantes, com DNAs cromossômicos de 50 a 6000 kb (Stevens, 2001).

Os tripanossomas da Seção Stercoraria distribuem-se em três subgêneros. O subgênero *Schizotrypanum* está bem definido quanto a morfologia e multiplicação intracelular sob a forma amastigota em tecidos do mamífero hospedeiro. As espécies do subgênero *Schizotrypanum* parasitam morcegos e uma grande variedade de mamíferos, incluindo humanos. As demais espécies da Seção Stercoraria pertencem aos subgêneros *Megatrypanum* (tripanossomas grandes que se multiplicam como epimastigotas no hospedeiro mamífero) e *Herpetosoma*, que compreende tripanossomas de tamanho médio que se multiplicam como epimastigotas ou amastigotas em hospedeiros mamíferos (Vickerman, 1976; Stevens, 2001).

Análises filogenéticas de diferentes espécies de tripanossomas usando os genes SSU rRNA (subunidade menor do RNA ribossômico) e gGAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal) tem avaliado estes subgêneros e também confirmado que os tripanossomas formam um grupo monofilético subdividido em clados bem suportados (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004, 2007), a maioria dos quais apresenta uma correlação predominante com uma única classe de vertebrados (Figura 3).

Figura 3 - Árvore de Máxima Verossimilhança, baseada na sequência do gGAPDH, mostrando a filogenia do gênero *Trypanosoma*.

Aparentemente, o principal processo evolutivo que levou a diversificação de espécies e deu origem aos clados de tripanossomas foi de adaptação ao hospedeiro ("host fitting"). Em eventos geralmente mediados por vetores, os organismos colonizaram novos hospedeiros ("host-switching"), geralmente espécies filogeneticamente relacionadas, devido a características biológicas compartilhadas. Eventos de co-evolução não foram comprovados, embora eventos de co-divergência não sejam raros (Hamilton et al., 2007). Entretanto, embora algumas espécies sejam generalistas, infectando hospedeiros de diferentes ordens/famílias, alguns clados observados nas árvores filogenéticas apresentam uma forte associação com espécies da mesma ordem ou família, de hospedeiros vertebrados ou de invertebrados (Hamilton et al., 2007, 2012; Viola et al., 2009a,b; Cavazzana et al., 2010; Garcia et al., 2011; Lima et al., 2012). A inclusão de novas espécies de tripanossomas em árvores filogenéticas tem demonstrado que a história evolutiva desses organismos é bastante complexa e que, aparentemente, os diversos clados, estabelecidos nas árvores filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH, não evoluíram segundo um modelo evolutivo comum, parecendo mais terem sido moldados por diversos eventos evolutivos.

A maioria das espécies de *Trypanosoma* estudadas posiciona-se em um número reduzido de clados, correlacionados com fatores como táxon do hospedeiro, ecologia e, especialmente, táxon do vetor (Simpson et al., 2006). A filogenia dos tripanossomas sugere associação da maioria dos clados principalmente com um grupo de vertebrados em particular, ou com seus hospedeiros invertebrados.

1.1.1.1 Clado *T. cruzi*

O clado *T. cruzi* inclui duas espécies de tripanossomas do Novo Mundo que infectam humanos, *T. cruzi* e *T. rangeli*, uma gama de espécies de tripanossomas de morcegos do Novo e do Velho Mundo, além de uma grande variedade de tripanossomas de mamíferos australianos e africanos que vem sendo descobertos e posicionados neste clado continuamente (Figura 4) (Noyes et al., 1999; Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2007, 2009; Paparini et al., 2011; Barbosa et al., 2016a).

Analises filogenéticas baseadas em diversos marcadores moleculares suportam a subdivisão deste clado em dois grupos principais:

- O subclado *Schyzotrypanum*, que tem *T. cruzi* como espécie-tipo e diversas espécies como *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* e *T. erneyi*, estas últimas restritas à ordem Chiroptera. Estes parasitas caracterizam-se por sua capacidade de invadir e se multiplicar, *in vitro*, em células de mamíferos de diferentes ordens. Os vetores desses tripanossomas são hemípteros, triatomíneos e cimicídeos (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991; Cavazzana et al., 2010; Hamilton et al., 2012; Lima et al., 2012).

Figura 4 - Representação gráfica do clado *T. cruzi*, mostrando as espécies que o representam e seus principais hospedeiros. No caso de *T. cruzi* e *T. rangeli*, os hospedeiros estão indicados com estrelas.

- O subclado *T. rangeli*/*T. conorhini*, que compreende a espécie *T. rangeli*, um parasita de mamíferos transmitido por triatomíneos do gênero *Rhodnius* e que se distribui em cinco linhagens genéticas (Stevens et al., 1999; Maia da Silva et al., 2004, 2007, 2009; Hamilton et al., 2007); *T. conorhini*, um parasita cosmopolita de rato doméstico, transmitido por *Triatoma rubrofasciata*, e também descrito em primatas na Ásia; e outras espécies de tripanossomas de primatas, carnívoros e morcegos africanos e australianos (Hamilton et al., 2009; Barbosa et al., 2016a).

Diferentes hipóteses buscam explicar a origem deste grupo. Inicialmente, acreditava-se que o clado *T. cruzi*, composto principalmente por espécies de tripanossomas isoladas na América do Sul, evoluiu no Novo Mundo após a separação do continente africano (Hipótese do Supercontinente do Sul). Esta hipótese foi reforçada pela inclusão de um isolado de canguru australiano, visto que a separação da América do Sul dos continentes Austrália e Antártica ocorreu após a separação da África (Stevens,

Gibson, 1999). No entanto, o posicionamento de espécies africanas no clado *T. cruzi* (Hamilton et al., 2009; Lima et al., 2012) e observações indicando baixa diversidade de espécies de tripanossomas isoladas na América do Sul (Hamilton et al., 2012) permitiram uma explicação filogenética mais parcimoniosa para os relacionamentos dentro do clado: a de que, inicialmente, representantes do clado de tripanossomas de morcego passaram a parasitar mamíferos terrestres, e não o contrário. Isto levou à proposição de uma nova hipótese evolutiva (Teoria do "Bat Seeding"), segundo a qual o ancestral comum do clado é um tripanossoma de morcego, que se diversificou e se dispersou geograficamente (Hamilton et al., 2012). Esta hipótese tem sido corroborada pelo isolamento de tripanossomas de morcego filogeneticamente posicionados na porção basal do clado *T. cruzi* (Lima et al., 2013, 2015a).

1.1.1.2 Clado *T. lewisi*

Trypanosoma lewisi é a espécie-tipo do subgênero *Herpetosoma*, um grupo de parasitas cosmopolita de roedores (Hamilton et al., 2007; Maia da Silva et al., 2010). Os tripanossomas deste clado são considerados espécies altamente restritas aos seus hospedeiros. Diversas espécies deste clado circulam no mundo todo em roedores e alguns lagomorfos, com uns poucos relatos em morcegos e macacos (Maia da Silva et al., 2010).

Os tripanossomas do clado *T. lewisi* são transmitidos por várias espécies de pulgas, nas quais multiplicam-se como epimastigotas, aderidas à superfície do tubo digestório, transformando-se em tripomastigotas metacíclicos, formas eliminadas nas fezes do hospedeiro invertebrado. Os roedores infectam-se ingerindo a própria pulga ou fezes do vetor que acabam retidas no pelo do animal (Hoare, 1972; Maia da Silva et al., 2010). Embora *T. lewisi* não infecte o homem naturalmente, infecções oportunistas têm sido detectadas em primatas humanos e não humanos, indicando que um sistema imune deprimido ou imaturo favorece o desenvolvimento do parasita (Howie et al., 2006; Sarataphan et al., 2007; Maia da Silva et al., 2010).

As análises filogenéticas evidenciam alto grau de relacionamento de todas as espécies do clado *T. lewisi*, que formam um grupo monofilético que reúne *T. lewisi* e espécies morfologicamente indistinguíveis, designadas *T. lewisi*-like, que apresentam grande especificidade por seus hospedeiros (Figura 3). Alguns exemplos de espécies *T. lewisi*-like são: *T. blanchardii*, *T. grosi*, *T. microti*, *T. nabiasi* e *T. otospermophili* (Hoare, 1972; Hamilton et al., 2007; Maia da Silva et al., 2010).

1.1.1.3 Clado *T. theileri*-*T. cyclops*

Trypanosoma theileri é um parasita de ruminantes domésticos (bovinos, bubalinos e ovinos) e silvestres (cervos, antílopes, etc.) e é a espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum*. Os tripanossomas deste clado têm uma alta restrição em relação ao hospedeiro, visto que experimentos de infecção

experimental de ruminantes domésticos com tripanossomas isolados de cervo não foram bem sucedidas (Kingston, Morton, 1975). *T. theileri* tem distribuição mundial, sendo encontrado desde os trópicos até as proximidades do Círculo Ártico, sendo, porém, mais prevalente em áreas tropicais e neotropicais (Rodrigues et al., 2006). Não é considerado patogênico para seu hospedeiro, produzindo, porém, sintomatologia ou infecção detectável quando associado a outros patógenos (*Babesia*, *Anaplasma*, entre outros) e também em animais desnutridos, mantidos sob condições de estresse ou durante a gestação (Hussain et al., 1985; Doherty et al., 1993).

Moscas hematófagas da família Tabanidae e Hippoboscidae são os principais vetores destes tripanossomas. A transmissão dá-se pela via contaminativa, tal como acontece com os tripanossomas do grupo Stercoraria, pela penetração de tripomastigotas metacíclicos (presentes nas fezes do vetor) em mucosas ou lesões; o animal pode também infectar-se pela ingestão das fezes ou do próprio vetor (Rodrigues et al., 2006, 2010; Garcia et al., 2011).

Análises filogenéticas do clado *T. theileri* usando diferentes marcadores moleculares têm demonstrado a existência de pelo menos 10 genótipos associados com o hospedeiro: um genótipo associado com búfalo aquático, quatro com gado, dois com antílope e três genótipos respectivamente associados com cervos, sitatungas e ovelhas. A associação genótipo-hospedeiro foi comprovada pela divergência de tripanossomas isolados de gado e búfalo de uma mesma região e pelo agrupamento em um mesmo genótipo (TthIA) de isolados de búfalo provenientes de diferentes regiões geográficas (Rodrigues et al., 2006, 2010; Garcia et al., 2011).

O clado *T. cyclops*, um grupo pouco conhecido e filogeneticamente relacionado com o clado *T. theileri*, é formado por *T. cyclops*, um tripanossoma identificado em primatas na Ásia (Weinman, 1972), junto com tripanossomas isolados do marsupial “wallaby” e sanguessugas terrestres da Austrália (Hamilton et al., 2005). Considerando observações indicando que *T. cyclops* não se multiplica em insetos da família Reduviidae (*R. prolixus* e *T. rubrofasciata*) (Weinman, 1972), acredita-se que as sanguessugas estejam envolvidas na transmissão destes tripanossomas na Ásia e na Austrália. Sabe-se que estes anelídeos vivem nas mesmas áreas habitadas pelos hospedeiros vertebrados dos representantes do clado e alimentam-se de sangue de todo tipo de vertebrados terrestres (Hamilton et al., 2005).

1.1.1.4 Clado *T. copemani*

Com os estudos recentes de tripanossomas de mamíferos australianos, um novo clado, formado pelas espécies *T. copemani*, *T. gilletti*, *T. pestanai* e *T. vegrandis*, passou a ser consistente nas filogenias (Noyes et al., 1999; Austen et al., 2009; McInnes et al., 2011).

T. copemani parece ser um tanto ubíquo, pois tem sido identificado infectando diferentes espécies de marsupiais australianos (coalas, vombates, quokkas, entre outros) (McInnes et al., 2011; Austen et al., 2016). Igualmente, *T. vegrandis* tem sido encontrado em uma grande variedade de marsupiais, carnívoros e também morcegos (Thompson et al., 2013; Barbosa et al., 2016b). *T. gilletti* tem sido identificado exclusivamente em coalas (McInnes et al., 2011) e *T. pestanai* no texugo europeu *Meles meles* (Hamilton et al., 2004).

Os tripanossomas deste clado agrupam com os tripanossomas do grupo Stercoraria (Thompson et al., 2013). Apesar de os vetores do clado não terem sido identificados, a análise dos ectoparasitas dos hospedeiros vertebrados tem permitido pensar em pulgas, carrapatos, ácaros, mosquitos e moscas como possibilidades. Um tripanossoma isolado do carrapato *Haemaphysalis hystricis* no Japão (Thekiso et al., 2007) e associado ao clado poderia sugerir os carrapatos como potenciais vetores. No entanto, devido à grande diversidade de hospedeiros deste clado, pode também existir uma maior variedade de vetores (McInnes et al., 2011).

1.1.1.5 Clado *T. brucei*

O clado *T. brucei*, também conhecido como clado africano, compreende tripanossomas transmitidos por moscas tsé-tsé, com exceção de *T. evansi* e *T. equiperdum*, espécies não restritas à África e cuja transmissão faz-se pela via mecânica. Os tripanossomas africanos são reconhecidos por serem os agentes causais de doenças graves em humanos e animais de importância pecuária (Lai et al., 2008; Carnes et al., 2015).

O clado *T. brucei* compreende os tripanossomas africanos dos subgêneros *Trypanozoon* (*T. brucei*), *Nannomonas* (*T. congolense*, *T. simiae* e *T. godfreyi*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Pycnomonas* (*T. suis*), todos de origem africana e pertencentes à secção Salivaria (Figura 5) (Hoare, 1972; Adams et al., 2010). A origem deste clado associa-se com a separação da África dos outros continentes (Stevens, Gibson, 1999; Steverding, 2008).

Trypanosoma brucei, espécie-tipo do subgênero *Trypanozoon*, compreende três subespécies: *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, agentes causais da tripanossomíase africana (também conhecida como doença do sono); e *T. b. brucei*, que causa a tripanossomíase animal ou “nagana”. *Trypanosoma brucei* agrupa com *T. evansi* e *T. equiperdum*, agentes causais da “surra” ou “mal de cadeiras” e da “durina” ou “sífilis equina”, respectivamente, patologias que afetam cavalos, camelos e búfalos (Lai et al., 2008). Diferindo de *T. brucei*, espécie restrita à mosca tsé-tsé e, portanto, confinada ao continente africano, *T. evansi* e *T. equiperdum* são cosmopolitas e respectivamente transmitidas mecanicamente por outros insetos hematófagos e pelo intercuro sexual. Estas três espécies são geneticamente idênticas, diferindo principalmente pelo modo de transmissão e o fato de que *T. evansi* e *T. equiperdum*

não possuem o DNA do cinetoplasto ou possuem apenas parte dele. Por essas razões, alguns autores sugerem que *T. evansi* e *T. equiperdum* derivam de *T. brucei* e que deveriam ser consideradas subespécies (Lai et al., 2008; Carnes et al., 2015).

Figura 5 - Representação gráfica do clado *T. brucei* mostrando os subgêneros e as espécies que o compõem. Os hospedeiros para cada subgênero estão indicados pela cor.

Os tripanossomas do subgênero *Nannomonas* desenvolvem-se no intestino médio e na probóscide das moscas tsé-tsé, gerando patogenias severas em suínos domésticos (Sturm et al., 1998). Anteriormente, as espécies eram diferenciadas pelas características morfológicas e comportamentais, com *T. (N.) simiae* caracterizando-se por produzir infecções rápidas e fatais e *T. (N.) congolense* por produzir infecções crônicas leves. Porém, o uso de ferramentas bioquímicas e moleculares facilitou a discriminação das duas espécies, permitindo determinar inclusive três grupos genéticos em *T. (N.) congolense* (Savannah, Forest e Kilifi), que variam quanto a virulência, patogenicidade e distribuição geográfica (Adams et al., 2010; Rodrigues et al., 2014).

Trypanosoma (Duttonella) vivax é um patógeno de ungulados domésticos e silvestres, sendo encontrado na África e nas Américas Central e do Sul. Na África, é transmitido tanto ciclicamente, por

moscas do gênero *Glossina*, quanto mecanicamente, por tabanídeos e outros insetos sugadores de sangue. Nas Américas, é transmitido mecanicamente por insetos hematófagos, sendo que o uso de agulhas contaminadas também tem contribuído para sua dispersão (Ventura et al., 2000; Rodrigues et al., 2015). Este parasita é de importância pecuária por estar associado a diminuição na produtividade dos animais, a surtos com alto índice de mortalidade em bovinos e ovinos e, inclusive, a infecções letais em búfalos em condições de estresse (Rodrigues et al., 2015; Garcia et al., 2016). Análises moleculares têm indicado jumentos como reservatórios assintomáticos deste parasita (Rodrigues et al., 2015) e também uma maior relação entre os genótipos que circulam no Brasil com aqueles do Oeste da África, diferentes dos encontrados nas regiões Leste e Central do continente africano (Ventura et al., 2000; Rodrigues et al., 2015).

O único representante do subgênero *Pycnomonas* é *T. suis*, um tripanossoma encontrado no sangue de suídeos e que se desenvolve nas glândulas salivares, na probóscide e no intestino médio de moscas tsé-tsé (Adams et al., 2010). Passaram-se muitos anos sem relatos de isolamento de *Trypanosoma suis* até que em 2006 um tripanossoma de *Glossina pallidipedes* da região costeira da Tanzânia (Parque Natural Msubugwe) foi caracterizado por parâmetros morfológicos, de comportamento e por filogenias moleculares, que confirmaram a espécie como *T. suis* (Adams et al., 2010; Hutchinson, Gibson, 2015).

1.1.1.6 Clado tripanossomas de aves

As espécies deste clado são parasitas bem sucedidos, amplamente distribuídas e encontradas em aves de todo o mundo, excluindo as regiões polares (Bishop, Bennett, 1992; Zidkova et al., 2012). Sua transmissão se dá em todos os ecossistemas terrestres, incluindo ilhas e países de climas variados, desde que aves e potenciais vetores (insetos hematófagos) estejam presentes. Os tripanossomas de aves são transmitidos por uma grande variedade de insetos hematófagos, incluindo representantes das famílias Simuliidae, Culicidae, Ceratopogonidae, Hippoboscidae e Dermanyssidae (Votykka, Svobodová, 2004; Hamilton et al., 2007). Estudos mostram que tripanossomas de uma mesma linhagem ou espécie podem desenvolver-se satisfatoriamente em aves pertencentes a famílias e ordens diferentes (Sehgal et al., 2001; Valkiunas et al., 2011; Zidkova et al., 2012).

Apesar do grande número de espécies de tripanossomas de aves descritas, existem poucos estudos taxonômicos e moleculares e, portanto, pouca informação disponível sobre este grupo, de forma que ainda são necessários estudos para seu entendimento (Sehgal et al., 2001; Valkiunas et al., 2011; Zidkova et al., 2012). Cabe destacar que muitas das espécies de tripanossomas de aves foram descritas com base em características morfológicas, de forma que a legitimidade de muitas delas ainda

é questionada (Sehgal et al., 2001). Além de três espécies reconhecidas (*T. avium*, *T. bennetti* e *T. corvi*), uma nova espécie (*T. culicavium*) foi isolada de mosquitos *Culex* (Votypka et al., 2012).

Análises do SSU rRNA de vários isolados de tripanossomas de aves africanas demonstraram que apesar das semelhanças morfológicas com *T. avium*, eles correspondem a haplotipos diferentes, revelando uma diversidade genética ainda pouco estudada (Sehgal et al., 2001). Um estudo da biodiversidade dos tripanossomas de aves confirmou sua classificação em pelo menos onze linhagens (Zidkova et al., 2012) e novas espécies continuam sendo descritas (Slapeta et al., 2016).

1.1.1.7 Clado tripanossomas de serpentes

Tripanossomas têm sido isolados de diferentes tipos de répteis, como serpentes, quelônios e crocodilos, mas as informações disponíveis achem-se em grande parte a descrições morfológicas. Estudos anteriores de nosso grupo, voltado à caracterização molecular de isolados de cobras e serpentes, permitiram definir um novo clado, inicialmente formado por dois tripanossomas de serpentes

Figura 6 - Representação gráfica mostrando o relacionamento dos clados de tripanossomas de lagarto e de serpente, mostrando as espécies descritas e seus principais hospedeiros.

brasileiras: *T. cascavelli*, isolada de *Crotalus durissus* e *T. serpentis*, uma nova espécie isolada de *Pseudoboa nigra* (Figura 6; Viola et al., 2008, 2009b). Neste mesmo clado, foi posicionado um isolado de mosquito-palha do gênero *Lutzomyia*, indicando que, tal como ocorre com tripanossomas de lagarto, os tripanossomas de serpentes podem ser transmitidos por flebotomíneos (Viola et al., 2008).

1.1.1.8 Clado tripanossomas de lagartos

Este clado, muito relacionado com o clado dos tripanossomas de serpente, compreende isolados de répteis da ordem Squamata, das famílias Varanidae (*T. varani*) e Phrynosomatidae (*T. scelopori*), e um tripanossoma de Gekkonidae (*T. gecko*) (Figura 6; Hamilton et al., 2007; Viola et al., 2008). Não se tem informação sobre os vetores envolvidos na transmissão dos tripanossomas deste clado, apenas evidência experimental indicando que *T. varani* se desenvolve bem em flebotomíneos, mas não em moscas tsé-tsé (Minter-Goedbloed et al., 1993).

Trypanosoma varani também foi descrito infectando uma espécie de pitón de Gana, *Python regius* (Sato et al., 2009), assim como infectando roedores silvestres em Níger e Uganda (Dobigny et al., 2011; Salzer et al., 2016), o que faz duvidar sobre a especificidade de hospedeiro deste tripanossoma.

1.1.1.9 Clado tripanossomas de crocodilos

A primeira descrição de um tripanossoma de crocodilo foi feita na África e corresponde a espécie atualmente identificada como *T. grayi* (Dutton et al., 1907), também encontrada em moscas tsé-tsé; sua transmissão aos crocodilos ocorre por contaminação oral, com fezes da tsé-tsé ou por ingestão de moscas esmagadas (Hoare, 1931). A inclusão de *T. grayi* no grupo dos tripanossomas de crocodilos favorece a hipótese da origem do clado neste vetor (Viola et al., 2009a).

Análises anteriores associavam o clado crocodiliano com *T. bennetti* isolado de aves, porém, o aumento do número de isolados de crocodilos africanos e americanos permitiu definir um clado bem suportado, separado dos tripanossomas de aves e de lagarto, formado por quatro subclados principais: *T. grayi*, *T. ralphi*, Cay03 e *T. terena* (Figura 7; Viola et al., 2009a; Fermine et al., 2013, 2015). No entanto, nem todos os tripanossomas isolados de crocodilo agrupam nesse clado, pois há isolados de crocodilos brasileiros e de sanguessugas neles coletadas que agrupam no clado aquático, formando o clado *T. clandestinus* (Fermine et al., 2015).

Figura 7 - Representação gráfica mostrando as principais espécies do clado de tripanossomas de crocodilos.

1.1.1.10 Clado aquático

Este clado, que compreende tripanossomas isolados tanto de peixes marinhos como de água doce, de anfíbios e sanguessugas, foi descrito desde as primeiras análises filogenéticas e, progressivamente, foi sendo mais definido (Figura 8; Stevens et al., 2001). De início, sanguessugas aquáticas eram os únicos vetores reconhecidos (Simpson et al., 2006). Posteriormente, infecções experimentais comprovaram a participação de outros vetores, como mosquitos, flebotomíneos e culicídeos (Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2007, 2008).

Além de tripanossomas de peixes e anfíbios, o clado aquático também inclui tripanossomas de ornitorrinco (*T. binneyi*), camaleão (*T. therezieni*), tartarugas aquáticas (*T. chelodina*), lagartos, crocodilos (*T. clandestinus*), entre outros (Noyes et al., 1999; Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004; Simpson et al., 2006; Fermio et al., 2015).

As análises filogenéticas de tripanossomas brasileiros de anuros e sua comparação com isolados de outras regiões do mundo têm permitido observar a separação dos dois grupos de isolados, assim como a subdivisão dos isolados brasileiros em quatro grupos genéticos, que parecem apresentar associação com a família dos anuros coletados ou com o nicho ecológico (Ferreira et al., 2007, 2008).

Figura 8 - Representação gráfica mostrando os principais grupos das espécies de tripanossoma do clado aquático, e seus principais hospedeiros e vetores.

Todos os tripanossomas de peixe formam um único clado dividido em três subclados: peixes marinhos, peixes de água doce e o terceiro formado por isolados de tartaruga e ornitorrinco (Figura 8; Hayes et al., 2014; Lemos et al., 2015). No subclado de água doce, também se observam subgrupos, um deles correspondendo a isolados de bagres brasileiros e sanguessugas neles colhidas, formando um grupo pouco heterogêneo e separado de isolados de peixes da Europa, Ásia e África (Lemos et al., 2015).

1.2 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos por *trans-splicing*

Os genomas dos tripanossomatídeos estão organizados em grandes “clusters” de genes policistrônicos (PGC, “polycistronic gene clusters”), com dezenas a centenas de genes que codificam proteínas, organizados sequencialmente na mesma fita de DNA (Martínez-Calvillo et al., 2010). O processamento em mRNAs monocistrônicos maduros ocorre mediante dois processos: *trans-splicing*, que adiciona uma sequência pequena derivada do *Spliced Leader* RNA (SL-RNA) à extremidade 5’ de

cada mRNA, e *poli-adenilação*, na qual uma cauda de vários resíduos de adenina é adicionada à extremidade 3' (Liang et al., 2003).

Os genes de uma unidade poli-cistrônica normalmente não codificam para proteínas de função relacionada, o que difere bastante do funcionamento dos operons em bactérias e nematóides. Mesmo que todos os genes de um mesmo PGC sejam transcritos simultaneamente, os tripanossomas apresentam mecanismos de regulação pós-transcricional para controlar a abundância e a produção de mRNAs maduros, segundo a fase do ciclo evolutivo do parasito (Martínez-Calvillo et al., 2010). Acredita-se que os principais pontos de controle da expressão gênica atuem ao nível de tradução e degradação do mRNA (Fernández-Moya, Estévez, 2010). Essa inusitada forma de organização genômica resulta em genomas muito densos devido à ausência quase total de íntrons e a ciclos celulares de tempos mais reduzidos (Kramer, 2012).

A sequência do *Spliced Leader* (SL) foi descoberta inicialmente em *T. brucei*, associada aos mRNAs codificados pelos genes de glicoproteínas variantes de superfície, VSG (De Lange et al., 1983). Sequências homólogas foram achadas também em outras espécies de tripanossomatídeos, como *T. cruzi* e *L. collosoma* (Milhausen et al., 1984). O fato de observar-se que a sequência SL não era codificada pelo DNA que flanqueia os genes VSG foi o que determinou sua nomeação como sequência líder (*Spliced Leader*), para indicar que era transcrita por outra região do genoma (Nelson et al., 1983).

Estudos posteriores permitiram entender que a sequência do SL se achava unida a todas as sequências de RNA mensageiro e que provavelmente era adicionada a numerosos transcritos por um processo intermolecular em via *trans*, indicando assim que ela era essencial para a expressão gênica nestes organismos (Murphy et al., 1984; Parsons et al., 1984).

O mecanismo de *trans-splicing*, que consiste na união de dois éxons de RNA de transcritos descontínuos, envolve duas reações de trans-esterificação que formam uma estrutura em forma de Y, onde o SL-RNA transfere uma sequência pequena de 39 nucleotídeos (SL) à extremidade 5' de cada região codificadora presente no pré-mRNA (Figura 9). Desta maneira, as principais funções do mecanismo de *trans-splicing* são a individualização dos mRNAs de transcritos policistrônicos longos e a adição de uma estrutura "cap4" na extremidade 5' dos mRNAs nascentes, a qual é essencial no metabolismo e processamento dos mRNAs para sua estabilidade, transporte intracelular e tradução (Liang et al., 2003; Mayer, Floeter-Winter, 2005; Haile, Papadopoulou, 2007; Lasda, Blumenthal, 2011).

O mecanismo de *trans-splicing* parece semelhante ao de *cis-splicing* de eucariotos superiores e requer a intervenção das subunidades U2 e U4/U6 (Liang et al., 2003). Acreditava-se que o *cis-splicing* não existisse em tripanossomas, mas análises dos genomas de *T. brucei* e *T. cruzi* revelaram a presença da maquinaria para ambos os processos e que o gene da polimerase poli (A) (PAP) é gerado por *cis-splicing* (Mair et al., 2000).

Estudos em *T. brucei* revelaram uma via de silenciamento do SL-RNA (SLS), desencadeada por condições de estresse ambiental (como temperaturas elevadas, pHs extremos ou agentes químicos), que alteram a estrutura do ER, levando a paralisação da produção de mRNAs e a morte celular em três dias. Tem sido sugerido que a via SLS é um tipo de morte celular programada (PCD, “programmed cell death”), semelhante a apoptose mediada por caspases nos eucariotos (Lustig et al., 2007; Goldsmith et al., 2010; Michaeli, 2012).

Figura 9 - Representação esquemática da reação de *trans-splicing*. BP, ponto de ramificação. PPT, porção poli-T. SS, splice site. Fonte: Michaeli, 2011

1.2.1 Evolução do *trans-splicing*

Devido à alta similaridade existente entre os processos de *cis* e *trans-splicing*, sempre surge a dúvida quanto ao processo que surgiu primeiro. Além de usar os mesmos componentes do spliceossomo, ambos os processos envolvem os mesmos sinais presentes na sequência de RNA, que indicam os sítios de clivagem (Lasda, Blumenthal, 2011). Por estes motivos e considerando a ampla distribuição do mecanismo de *trans-splicing* entre os eucariotos (Figura 10), discute-se se este processo surgiu diversas vezes de forma independente durante a evolução do grupo, ou se um mecanismo ancestral comum dos eucariotas foi perdido em várias linhagens (Hastings, 2005; Mayer, Floeter-Winter, 2005; Douris et al., 2010).

Os argumentos que sustentam uma origem comum são a existência do *trans-splicing* em espécies totalmente divergentes, compartilhando muitas características comuns, por exemplo, exon curto, cap hipermetilado, estrutura secundária semelhante e presença do “Sm binding site”, mesmo que a similaridade de sequência seja baixa (Lasda, Blumenthal, 2011). Inversamente, os argumentos que suportariam um cenário evolutivo envolvendo múltiplas origens seriam: 1º) a necessidade de ocorrer mais perdas (no caso de existir um ancestral comum) do que se depreende ao avaliar a distribuição das espécies que apresentam este mecanismo; 2º) a maior facilidade de adquirir o mecanismo de *trans-splicing* do que perde-lo (Roy, Irimia, 2009). Para alguns autores seria muito difícil ou quase impossível perder o mecanismo de *trans-splicing* adquirido (caminho de uma só via), visto que a região do RNA entre o promotor e o sítio de clivagem é removida (“spliced out”) antes da transcrição do RNA. Por esta razão, supõe-se que uma vez perdido o mecanismo, muitos genes não poderiam ser transcritos novamente (Blumenthal et al., 2004; Roy, Irimia, 2009).

Figura 10 - Diversidade de organismos que apresentam o mecanismo do *trans-splicing*.
Fonte: Lasda, Blumenthal, 2011.

A alta divergência da sequência primária do *Spliced Leader* impossibilita o uso de estratégias baseadas em homologia que permitam entender sua evolução e assim determinar qual das duas hipóteses é a mais provável. O único trabalho feito até o momento onde se comparam sequências de SL depositadas nos bancos de dados observou semelhanças de tamanho das sequências do exon dentro do mesmo filo, assim como da sequência GGTA para o sítio de clivagem (G correspondendo ao último nucleotídeo do exon e o motivo GTA ao início do intron) (Bitar et al., 2013). Porém, entre os diferentes filios não há muitas características em comum, dada a divergência das sequências. A única característica observada entre os SL-RNAs é uma semelhança nas estruturas secundárias, dado que todas apresentam três forquilhas (*stem-loops*) e um ponto de bifurcação, resultando em topologia geral em forma de Y (Bitar et al., 2013).

A organização genômica dos genes SL em diferentes organismos varia, dependendo da espécie estudada. Por exemplo, dentro do filo dos dinoflagelados há grande complexidade e diversas peculiaridades nos genes SL, que não são observadas no Filo Euglenozoa. Zhang et al. (2009) encontraram em *Karenia brevis* seis variantes do gene SL, diferindo no tamanho da unidade de repetição e nos genes inseridos na região não transcrita (5S e U6 snRNA), com sequências completas ou parciais distribuídas aleatoriamente no genoma, porém, sempre com sequência e tamanho dos transcritos conservados nas espécies de um mesmo gênero.

1.2.2 Estrutura primária e secundária do SL-RNA

O gene SL, ou mini-exon, consiste em uma pequena sequência altamente conservada que é codificada por uma família de genes com elevado número de cópias (100-200) repetidas em tandem, cuja transcrição é conduzida por um único promotor localizado na extremidade 5' do locus (Lee, van der Ploeg, 1997).

O SL deriva de um RNA nuclear (SL-RNA) de tamanho variável (85-140 nt em tripanossomatídeos), que existe como uma partícula de ribonucleoproteína (RNP) e que é a encarregada de transferir ou doar sua própria extremidade 5' de 39 nucleotídeos ao pré-mRNA (Cross et al., 1991).

Cada unidade de repetição do gene SL divide-se em três partes (Figura 11): um éxon pequeno e muito conservado, um intron moderadamente conservado, que contém um sítio de união rico em uracilas (*Sm binding site*) para a montagem das pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs), e uma região espaçadora ou intergênica altamente variável em tamanho e sequência entre espécies e, até mesmo, entre as repetições de uma mesma espécie; em algumas espécies, dentro da região

espaçadora está inserido um gene 5S rRNA ativo (Figura 11). A região intergênica é essencial para a transcrição dos genes SL, fornecendo os elementos promotores que recrutam os fatores de transcrição para a RNA polimerase (Hitchcock et al., 2007).

Figura 11 - Representação esquemática da estrutura primária do gene SL.

A estrutura secundária do SL-RNA dos organismos que realizam *trans-splicing* é similar, composta de três forquilhas, havendo maior variação em tamanho e sequência na forquilha II e algumas diferenças nas outras duas, de acordo com a espécie (Figura 12). O primeiro "stem loop" corresponde em sua maior parte à sequência primária do éxon do gene SL e, assim, sua estrutura é altamente conservada. Neste loop, encontra-se o sítio de clivagem ("splice site") que se localiza entre dois resíduos G-G. Em seguida, encontra-se o íntron de comprimento variável, dobrado em dois "stem-loops" separados por uma região de fita simples análoga à região "Sm-like" dos snRNAs que se ligam às proteínas nucleares (Liang et al., 2003; Pouchkina-Stantcheva, Tunnacliffe, 2005; Lasda, Blumenthal, 2011). Estudos de reconstrução têm demonstrado que a sequência R-A-(U)_n-G-R é fundamental para o processo de união com estas proteínas (Bruzit et al., 1988).

Figura 12 - Modelo das estruturas secundárias Forma 1 e 2 de *Leptomonas collosoma*. Modificado de Harris et al., 1995.

Variações mutacionais e estruturais da sequência do SL-RNA têm demonstrado que a maior parte dos 39 nt é essencial para o evento de *trans-splicing*, enquanto que o íntron é altamente tolerante

a mutações (Lucke et al., 1996; Goncharov et al., 1998). Tem se comprovado que os “stem-loops” II e III são estruturalmente requeridos, o que justifica porque a sequência do mini-exon é altamente conservada filogeneticamente e como somente a estrutura, mas não a sequência do íntron, é necessária para o processo do *trans-splicing* (Lucke et al., 1996; Sturm et al., 1999).

Estudos também têm mostrado que uma região poli-T de pelo menos 6 resíduos de timina é essencial para a síntese normal dos SL-RNAs, pois a região homo-polimérica é importante para indicar o final da transcrição (Sturm et al., 1999). Igualmente, a interrupção dos resíduos U no consenso AUUUUGG do *Sm binding site* também impede a produção de transcritos SL-RNA (Sturm et al., 1999). Todos estes resultados só demonstram que a estrutura secundária do SL e a sequência do *Sm binding site* são extremamente importantes e por isso mostram-se conservadas nas diferentes espécies de tripanossomas e nematóides (Cross et al., 1991).

O SL-RNA dos tripanossomas possui uma estrutura “cap4” que consiste em um “cap” 7-metilguanossina (m⁷G) na extremidade 5’ e os quatro primeiros nucleotídeos estão metilados (Perry et al., 1987). É necessário que os grupos metila estejam presentes no SL-RNA para serem utilizados no processo de *trans-splicing* (Ullu, Tshudi, 1991).

Análises bioquímicas e biofísicas de sequências sintéticas de SL-RNA de *L. collosoma* mostraram a existência de dois possíveis padrões de dobramento para o primeiro “stem-loop”, correspondente ao mini-exon (Harris et al., 1995). Estas duas estruturas são denominadas Forma 1 e Forma 2 (Figura 12). Estes estudos demonstraram que ambas as formas são termodinâmica e cineticamente possíveis e acredita-se que exista interconversão entre ambas, dependendo do ambiente celular e da presença das proteínas RNP. Análises filogenéticas dos SL-RNAs de 16 espécies de tripanossomas confirmam que são capazes de adotar a Forma 1; no entanto, experimentos químicos demonstraram que a Forma 2, usada para representar a estrutura secundária do SL-RNA de tripanossomatídeos, é a que existe em maior quantidade (Harris et al., 1995).

1.2.3 SL-RNA como marcador molecular

A unidade de repetição do SL-RNA é um marcador molecular que permite avaliar a diversidade dos cinetoplastídeos. Também tem se tornado um alvo ideal para análises preliminares dos tripanossomatídeos visto ser um gene de múltiplas cópias, que combina regiões conservadas e variáveis dentro de um mesmo marcador. No geral, o PCR é realizado utilizando “primers” universais desenhados sobre a porção não variável do SL-RNA, o éxon, o que permite a amplificação da unidade de repetição inteira. Os produtos são normalmente clonados e sequenciados, pois deve-se levar em

conta que cada unidade de repetição representa aproximadamente 1% da informação da sequência do SL-RNA de uma célula e que o uso de apenas uma sequência, aleatoriamente, pode desviar os resultados da análise, dada a alta variabilidade intragenômica existente para este gene (Thomas et al., 2005).

A confiabilidade do SL como um marcador molecular para os cinetoplastídeos tem sido avaliada mediante a comparação das sequências deste gene nos genomas de *L. major* e *T. cruzi*, encontrando-se variabilidade intra-cópias do SL-RNA concentrada em sítios específicos. Provavelmente, existe um mecanismo de manutenção para controlar o aparecimento de mutações, que permite que as cópias avaliadas tenham uma tendência a uma uniformidade progressiva (Thomas et al., 2005).

A desvantagem do SL-RNA como marcador é que devido ao pequeno tamanho e à alta divergência de sequência da região intergênica, não é possível o alinhamento das repetições do SL inteiras, perdendo-se, assim, informação sobre as relações existentes entre grupos filogeneticamente distantes. Não obstante, a região intergênica do SL é considerada um marcador molecular de alta resolução para a reconstrução filogenética, pois é útil para a identificação de marcadores específicos de espécie ou de grupos de espécies (Maslov et al., 2013; Votypka et al., 2013).

A elaboração de dendrogramas a partir dos dados do alinhamento das repetições do SL permite identificar sequências muito relacionadas e muito diferentes. Grupos de repetições definidas por 90% de similaridade representam uma unidade de tipificação (TU, “typing unit”), representando novas espécies potenciais (Maslov et al., 2013; Tyc et al., 2013; Votypka et al., 2013).

Abordagens baseadas no SL têm sido avaliadas em uma série de estudos que analisam a diversidade e as relações hospedeiro-parasito de tripanossomatídeos de insetos Heteroptera (Maslov et al., 2007, 2010, 2013; Yurchenko et al., 2009; Votypka et al., 2010, 2012) e Diptera (Tyc et al., 2013). Os resultados têm permitido descrever TUs novos, que refletem a alta diversidade destes organismos, que, em conjunto com estudos baseados em outros marcadores moleculares, permitem a descrição de novos gêneros (Votypka et al., 2013; Hamilton et al., 2015).

1.2.4 Genes SL em Euglenozoa

Após o descobrimento do mecanismo de *trans*-splicing nos tripanossomatídeos, esse tipo de processamento de RNAs mensageiros foi demonstrado em outros organismos do filo Euglenozoa. Esse é o caso do gênero *Euglena*, que apresenta uma sequência “spliced leader” de 26 nt na maioria dos mRNAs. Embora tenham sido encontrados alguns genes SL-RNA dispersos no genoma, a maioria está

localizada em unidades de repetição de 0,6 kb associadas com o gene 5S rRNA, estimando-se ~ 300 cópias por genoma haplóide (Keller et al., 1992).

Nos bodonídeos, foram observadas diferenças no tamanho e na organização das unidades de repetição do SL nos diversos gêneros. O tamanho do SL-RNA varia entre 93-112 nt nas espécies dos gêneros *Dimastigella*, *Bodo*, *Cryptobia* e *Trypanoplasma*, com unidades de repetição de 300 pb em *Cryptobia helices*, 470 pb em *Bodo saltans*, chegando a superar 800 pb em *Dimastigella* e *Trypanoplasma*. Foram observadas diferenças pontuais no íntron e em regiões não transcritas bastante divergentes, com exceção de alguns blocos idênticos, e presença, em alguns deles, do gene 5S rRNA (exceto *C. helices*). Além disso, em *Dimastigella trypanoformis* e *Trypanoplasma borreli* observou-se a inserção do gene 5S em sentido oposto ao da transcrição do SL-RNA (Maslov et al., 1993; Santana et al., 2001).

Nos diplonemídeos, foram analisadas as sequências das repetições do SL de duas espécies (*Diplonema* sp. 2 e *D. papillatum*), observando-se a presença de um SL-RNA de 110 e 114 pb, respectivamente, com um exon característico de 39 nt com mutações pontuais que os diferenciavam dos bodonídeos e dos tripanossomatídeos. O tamanho da unidade de repetição variou de 0,5 kb em *Diplonema* sp. a 0,6-1,2 kb em *D. papillatum*. Neste último organismo foi observada a presença do gene 5S rRNA, enquanto na outra espécie só se observou um pseudogene de 5S rRNA (Sturm et al., 2001).

1.2.5 Genes SL nos tripanossomatídeos

Devido à presença de múltiplas cópias, o gene SL tem sido utilizado como marcador genético para diagnóstico, assim como para identificar e caracterizar espécies da família Trypanosomatidae. Os primeiros estudos realizados revelaram que o gene SL poderia ser útil para identificar e genotipar *T. cruzi* (Souto et al., 1996; Fernandes et al., 1998, 2001) e espécies de *Leishmania* (Fernandes et al., 1994; Harris et al., 1998; Marfurt et al., 2003).

Estudos realizados com tripanossomatídeos de plantas transmitidos por insetos do gênero *Phytomonas* demonstraram que o gene SL é um excelente marcador para a identificação do gênero, mesmo quando amostras obtidas diretamente de plantas e insetos fixadas em lâminas eram utilizadas (Serrano et al., 1999; Godoi et al., 2002). Um estudo comparativo de genes SL de espécies do gênero *Crithidia* revelou grupos de espécies de acordo com o tamanho e as sequências das unidades de repetição (Fernandes et al., 1997).

Em *Leishmania*, cerca de 200 cópias do gene SL estão organizadas em tandem, que apresentam um éxon extremamente conservado e um íntron moderadamente conservado entre

espécies do mesmo subgênero; a região intergênica varia de acordo com a espécie de *Leishmania*, podendo observar-se repetições entre 200 a mais de 400 pb (Hassan et al., 1992; Fernandes et al., 1994; Van der Auwera et al., 2014). A amplificação de sequências SL tem sido empregada na detecção e identificação de espécies de *Leishmania* em amostras de insetos e pacientes (Marfurt et al., 2003; Paiva et al., 2006).

Com o conhecimento gerado por diversos estudos de que cada espécie de tripanossomatídeo pode ser reconhecida pela respectiva sequência do gene SL (Campbell et al., 1997; Fernandes et al., 1997; Serrano et al., 1999; Merzlyak et al., 2001), esse gene passou a ser utilizado para “DNA barcoding”, permitindo distinguir espécies de todos os gêneros, inclusive em amostras de tubo digestivo de insetos, sem a necessidade de cultivo dos parasitas (Maslov et al., 2007). Igualmente, este marcador tem sido utilizado para determinar TUs para identificar novas espécies potenciais de tripanossomatídeos (Maslov et al., 2007, 2010, 2013; Yurchenko et al., 2009; Votypka et al., 2010, 2012), assim como para confirmar as espécies novas de *Trypanosoma* (Lima et al., 2013, 2015a).

Sequências de SL são úteis para o diagnóstico de *T. cruzi* e *T. rangeli* (Fernandes et al., 2001; Maia da Silva et al., 2007), *T. vivax* (Ventura et al., 2000) e *T. theileri* (Rodrigues et al., 2010). A análise do polimorfismo da região intergênica tem permitido também avaliar o repertório de genótipos de uma determinada espécie, como descrito para: *T. rangeli* (Grisard et al., 1999; Maia da Silva et al., 2007; 2009); *T. vivax* (Ventura et al., 2000); *T. theileri* (Rodrigues et al., 2010; Garcia et al., 2011) e *T. cruzi* (Souto et al., 1996; Nunez et al., 1997; Fernandes et al., 1998, 2001; Brisse et al., 2001; O'Connor et al., 2007; Herrera et al., 2009, 2013; Cura et al., 2010; Lima et al., 2015b).

Embora *T. brucei* seja a espécie mais estudada quanto à regulação da expressão do gene SL, sabe-se muito pouco sobre o repertório e estrutura dos genes SL das demais espécies de tripanossomas africanos, contando-se apenas com dados obtidos pela amplificação do gene e determinação do seu tamanho (Garside, Gibson, 1995). Análises dos transcritos de SL de *T. vivax* do Brasil e do Oeste da África demonstraram uma grande proximidade filogenética entre eles (Ventura et al., 2000). Lai et al. (2008) analisaram sequências do gene SL de *T. brucei*, *T. evansi* e *T. equiperdum* e não conseguiram separar as espécies, corroborando os resultados obtidos com diversos outros genes de alta similaridade das espécies do subgênero *Trypanozoon*.

O único trabalho que analisou repetições completas ou parciais dos genes SL de espécies de tripanossomas de diferentes hospedeiros vertebrados foi o de Gibson et al. (2000). Os resultados revelaram tamanhos das unidades de repetição do SL entre 280 e 1350 pb nas diferentes espécies e transcritos entre 97 e 190 nt. Esse estudo demonstrou alta variabilidade da região intergênica, observando sequências conservadas somente entre isolados da mesma espécie e alta conservação das sequências do éxon (29 de 39 nt invariáveis) entre as espécies do gênero *Trypanosoma*.

1.2.6 Associação SL - 5S rRNA

O gene ribossômico 5S rRNA, que codifica para um dos componentes da subunidade menor do ribossomo, é um gene de múltiplas cópias, altamente conservado e em muitas ocasiões utilizado para inferir relações filogenéticas entre espécies distantes. Sua organização genômica é altamente variável e localiza-se quase sempre dentro das sequências espaçadoras de outros genes de múltiplas cópias (genes ribossômicos, SL-RNA, ubiquitina, snRNAs, tRNAs, entre outros) que apresentam repetição em tandem (Drouing, Tsang, 2012). Aparentemente, esta localização não representa vantagem seletiva para o gene 5S, pois o mesmo é transcrito pela RNA polimerase III e, muitas vezes, os genes aos quais está vinculado são transcritos por outra polimerase (Drouing, Tsang, 2012). No caso do SL-RNA, a transcrição ocorre pela ação da RNA polimerase II, de forma que os genes 5S rRNA e SL-RNA não seriam transcritos simultaneamente (Keller et al., 1992). Simplesmente o fato de possuir promotores internos que permitem funcionalidade independente da posição no genoma do organismo, permite translocação deste gene para qualquer lugar do genoma.

A presença do gene ribossômico 5S na região intergênica do *Spliced Leader* tem sido descrita nas sequências de *Herpetomonas samuelpessoai*, *Bodo caudatus*, *Euglena gracilis*, *T. vivax*, *T. rangeli*, *T. theileri*, *T. livingstonei* e *T. wauwau* (Maslov et al., 1993; Gibson et al., 2000; Maia da Silva et al., 2007; Rodrigues et al., 2010; Lima et al., 2013, 2015a). Em espécies como *T. brucei* e *T. cruzi*, que não apresentam a associação SL-5S rRNA, os genes 5S rRNA estão organizados em tandem, enquanto que em *L. major* estão dispersos inteiramente no genoma e sempre associados com os genes tRNA (Martinez-Calvillo et al., 2010).

A associação entre os genes de mini-exon e o 5S rRNA em alguns tripanossomatídeos e sua localização genômica separada em outros leva a questionar se esta associação é um caráter primitivo ou derivado. Maslov et al. (1993), baseados na análise cladística de ambos os genes, sugeriram que a associação era um estado primitivo e o fato de não estarem vinculados em algumas espécies representava um caráter derivado que ocorreu múltiplas vezes na família Trypanosomatidae. Entretanto, Beauparlant e Drouin (2014) propuseram que o gene 5S teve múltiplas inserções independentes na região intergênica do *Spliced Leader*, indicadas por divergências nas regiões flangeadoras ao gene bem como na posição de inserção, indicando não existir um ancestral comum.

Embora ainda não haja consenso, diversos mecanismos genéticos que estabelecem a homogeneização de genes multicópia no genoma foram demonstrados nos cinetoplastídeos (Maslov et al., 1993). Além disso, a evolução em concerto destes genes em organismos protistas como os tripanossomas acontece muito rápido (Beauparlant, Drouin, 2014), o que permitiria rápida distribuição do gene 5S rRNA entre as repetições do SL, suportando assim qualquer uma das duas hipóteses.

1.3 Marcadores moleculares usados na taxonomia dos tripanossomatídeos

A taxonomia clássica dos tripanossomatídeos foi por muitos anos restrita a uma série de morfotipos, característicos para um determinado gênero (forma celular, posição do núcleo e do cinetoplasto, entre outros), assim como pelo ciclo de vida e o hospedeiro de origem (Hoare, Wallace, 1966; Svodová et al., 2007). Porém, os caracteres morfológicos e comportamentais geraram muitas inconsistências e erros na classificação taxonômica destes organismos, tornando necessário buscar outros caracteres informativos, tais como bioquímicos, moleculares e ultraestruturais, para a descrição dos gêneros e grupos genéticos da família Trypanosomatidae. De todos os caracteres avaliados, o uso de marcadores moleculares tornou-se a metodologia discriminatória de maior poder e resultados confirmatórios, tornando-se a ferramenta mais empregada nas duas últimas décadas para a validação e reclassificação das espécies descritas e o posicionamento dos novos organismos encontrados (Svodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Flegontov et al., 2013; Votypka et al., 2013; Espinosa et al., 2016).

As análises filogenéticas dos tripanossomatídeos envolvem principalmente dois marcadores nucleares: gGAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal) e a subunidade menor do rRNA (18S rRNA) (Jirku et al., 2012; Schwars et al., 2015). Outros marcadores como citocromo B (cyt-b), *Spliced Leader* (SL-RNA), 5S rRNA, entre outros, também têm provado ser muito importantes e de grande utilidade para o entendimento da evolução dos tripanossomatídeos (Hamilton et al., 2004; Svodová et al., 2007).

1.3.1 Gene Ribossômico (rDNA).

Os ribossomos estão compostos por duas subunidades com quatro tipos de RNAs: a subunidade maior (LSU), que contém os rRNAs 28S, 5.8S e 5S, e a subunidade menor (SSU), que contém o 18S rRNA. Estes genes estão organizados em uma unidade de transcrição única denominada "cístron ribossômico" (rDNA), transcrita pela RNA polimerase I, que está presente em múltiplas cópias organizadas como repetições em tandem, constituídas por uma região transcrita e um IGR (espaçador intergênico). Este último consiste de um espaçador não transcrito (NTS) e um espaçador transcrito externo (ETS) (Torres-Machorro et al., 2010).

O cístron ribossômico está organizado pelo componente da subunidade menor (SSU 18S), a espécie molecular de menor tamanho (5.8S) e o restante do componente da subunidade maior (LSU 28S) (Figura 13). Estas regiões codificadoras estão intercaladas dentro dos espaçadores internos

transcritos (ITS), os quais fazem parte do transcrito primário e são removidos durante a maturação do pre-rRNA na via de biogênese do ribossomo (Hernandez, Cevallos, 2014). As subunidades 18S e 28S possuem sequências altamente conservadas e os espaçadores ITS possuem um grau intermediário de conservação (ITS 1-4).

Figura 13 - Representação gráfica do cístron ribossômico de *T. brucei* e *T. cruzi*. Adaptado de Hernandez, Cevallos, 2014.

Uma das características mais notáveis descobertas no protozoário *Trypanosoma brucei* é o processamento do rRNA, durante o qual a subunidade do LSU rRNA fragmenta-se em seis transcritos maduros (Umaer et al., 2014): duas moléculas de alto peso molecular denominadas 24Sα e 24Sβ, e quatro subunidades de rRNAs de baixo peso molecular: S1, S2, S4 e S6 (Sogin et al., 1986).

A subunidade menor (SSU rRNA) tem se tornado um marcador comum para estimar a biodiversidade de uma amostra devido a sua distribuição e funcionamento universal em todos os organismos conhecidos (Sogin et al., 1986), e porque sua sequência e estrutura revelam nove regiões altamente variáveis (V1-V9), das quais V2, V4 e V9 tem sido consideradas as mais adequadas para avaliar a biodiversidade em eucariotos (Hadziavdic et al., 2014). Para o "DNA barcoding" da coleção de tripanossomatídeos foi selecionada a região variável V7V8 da SSU rRNA, após a comparação de um grande número de espécies e isolados, por vários motivos: tamanho de fácil amplificação e sequenciamento; ausência de polimorfismo intra-específico; alinhamentos confiáveis dada a existência de regiões conservadas; presença de regiões polimórficas que permitem identificar novas espécies, linhagens e genótipos; permitem inferir relacionamentos genéticos; excelentes para selecionar os organismos para as filogenias; e podem ser utilizadas em conjunto com outros marcadores moleculares em análises combinadas (Teixeira, 2010).

Sequências do gene ribossômico têm sido bastante utilizadas para inferir relações filogenéticas entre organismos da classe Kinetoplastida (Maslov et al., 2001; Simpson et al., 2006; Lukes et al., 2014; Cavalier-Smith, 2016), para estabelecer os principais grupos naturais dentro da família Trypanosomatidae (Stevens, Gibson, 1999; Merzlyak et al., 2001; Cavazzana et al., 2010) e para a

identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos dentro do gênero *Trypanosoma* (Maia da Silva et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al. 2008; Lemos et al., 2015; Austen et al., 2016).

1.3.2 Gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicosomal – gGAPDH

Nos tripanossomatídeos, o metabolismo dos carboidratos, incluindo a maior parte da via glicolítica e parte do metabolismo do glicerol, ocorre dentro de um peroxissomo especializado, denominado glicossomo (Hannaert et al., 1992), organela que contem as enzimas glicolíticas, entre elas a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A enzima glicosomal é codificada por dois genes acoplados de sequência idêntica, existindo apenas um único gene para a GAPDH citosólica (Figura 14) (Kendall et al., 1990; Hannaert et al., 1992).

Figura 14 - Representação esquemática dos genes GAPDH citosólico e glicosomal.

Os genes de GAPDH têm uma baixa taxa de evolução molecular, sendo assim adequados para estudos evolutivos abrangendo grandes escalas de tempo. De modo similar ao que acontece com sequências da SSUrRNA, sequências do gene gGAPDH são recomendadas para análises filogenéticas e posicionamento taxonômico dos tripanossomatídeos e têm se mostrado úteis para determinar o “barcoding” desses organismos (Hamilton et al., 2007; Lima et al., 2013; Fermينو et al., 2015). Os genes de gGAPDH codificam proteínas e estão susceptíveis a pressões seletivas, apresentando taxas de evolução menores quando comparadas as de genes não codificadores. Por esta razão, genes de gGAPDH têm mostrado um alto potencial para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis, mesmo entre sequências de organismos geneticamente muito distantes. Por gerarem topologias congruentes, análises concatenadas baseadas nos genes de SSUrRNA e gGAPDH têm sido realizadas, resultando em topologias mais robustas (Viola et al., 2009a; Fermينو et al., 2013; Lima et al., 2015a). Porém, por serem relativamente conservados, os genes de GAPDH não são úteis para o estudo do polimorfismo intraespecífico e de relacionamento entre espécies geneticamente muito relacionadas.

REFERÊNCIAS¹

- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitol.* 2010 Jul;26(7):324-8.
- Austen J, Jefferies R, Friend T, Adams P, Ryan U, et al. Morphological and molecular characterization of *Trypanosoma copemani* n.sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gilbert's potoroo (*Potorous gilbertii*) and quokka (*Setonix brachyurus*). *Parasitology.* 2009 Jun;136(7):783-92.
- Austen JM, Paparini A, Reid SA, Friend JA, Ditcham WG, et al. Molecular characterization of native Australian trypanosomes in quokka (*Setonix brachyurus*) populations from Western Australia. *Parasitol Int.* 2016 Jun;65(3):205-8.
- Barbosa AD, Mackie JT, Stenner R, Gillett A, Irwin P, et al. *Trypanosoma teixeirae*: A new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomosis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). *Vet Parasitol.* 2016a Jun 15;223:214-21.
- Barbosa A, Austen J, Gillett A, Warren K, Paparini A, et al. First report of *Trypanosoma vegrandis* in koalas (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitol Int.* 2016b Aug;65(4):316-8.
- Beauparlant MA, Drouin G. Multiple independent insertions of 5S rRNA genes in the spliced-leader gene family of trypanosome species. *Curr Genet.* 2014 Feb;60(1):17-24.
- Bishop MA, Bennett GF. Host-Parasite Catalogue of the Avian Haematozoa (Suppl. 1) and Bibliography of the Avian Blood-Inhabiting Haematozoa (Suppl. 2). Memorial University of Newfoundland Occasional Papers in Biology; 1992.
- Bitar M, Boroni M, Macedo AM, Machado CR, Franco GR. The spliced leader trans-splicing mechanism in different organisms: molecular details and possible biological roles. *Front Genet.* 2013 Oct 11;4:199.
- Blumenthal T. Operons in eukaryotes. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2004 Nov;3(3):199-211.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, et al. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist.* 2013 Jan;164(1):129-52.
- Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of Phagotrophic Euglenids (Euglenozoa) as Inferred from Hsp90 Gene Sequences. *J Eukaryot Microbiol.* 2007 Jan-Feb;54(1):86-92.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and minicodon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001 Sep;31(11):1218-26.
- 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.
- Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999;42:29-112.
- Campbell DA, Fernandes O, Sturm NR. The mini-exon gene is a distinctive nuclear marker for distinguishing protists of the kinetoplastid/euglenoid lineage. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92(Supl 1): 12-13.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in Kinetoplastids protozoa: why be normal. *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(13):1231-40.
- Carnes J, Anupama A, Balmer O, Jackson A, Lewis M, et al. Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan 8;9(1):e3404.
- Cavalier-Smith T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *Eur J Protistol.* 2016 Oct;56:250-76.
- Cavazzana M Jr, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 2010 Mar 1;40(3):345-55.
- Cross M, Gunzl A, Palfi Z, Bindereif A. Analysis of Small Nuclear Ribonucleoproteins (RNPs) in *Trypanosoma brucei*: Structural Organization and Protein Components of the Spliced Leader RNP. *Molecular and Cellular Biology.* 1991 Nov;11(11):5516-26.
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, et al. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol.* 2010 Dec;40(14):1599-607.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- De Lange T, Liu AY, Van der Ploeg LH, Borst P, Tromp MC, et al. Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription? *Cell*. 1983 Oct;34(3):891-900.
- Dobigny G, Poirier P, Hima K, Cabaret O, Gauthier P, et al. Molecular survey of rodent-borne *Trypanosoma* in Niger with special emphasis on *T. lewisi* imported by invasive black rats. *Acta Trop*. 2011 Mar;117(3):183-8.
- Doherty ML, Windle H, Voorheis HP, Larkin H, Casey M, et al. Clinical disease associated with *Trypanosoma theileri* infection in a calf in Ireland. *Vet Rec*. 1993 Jun 26;132(26):653-6.
- Donovan, C. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connection with the dog and the bug (Conorhinus). *Lancet* 177:1495–1496. Transactions of the Bombay Medical Congress, 1909:159–66.
- Douris V, Telford MJ, Averof M. Evidence for multiple independent origins of trans-splicing in Metazoa. *Mol Biol Evol*. 2010 Mar;27(3):684-93.
- Drouin G, Tsang C. 5S rRNA gene arrangements in protists: a case of nonadaptive evolution. *J Mol Evol*. 2012 Jun;74(5-6):342-51.
- Dutton JE, Todd JL, Tobey EN. Concerning certain parasitic Protozoa observed in Africa. *Ann Trop Med Parasitol*. 1907; 1:287-371.
- Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MM, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*. 2016 Dec 15:1-13.
- Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasit Vectors*. 2013 Oct 29;6(1):313.
- Fermino BR, Paiva F, Soares P, Tavares LER, Viola LB, et al. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2015 Dec; 4(3): 368–78.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*. 1994 Aug;66(2):261-71.
- Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Eukaryot Microbiol*. 1997 Nov-Dec;44(6):535-9.
- Fernandes O, Sturm NR, Derré R, Campbell DA. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Sep 1;95(1):129-33.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;95(1):97-9.
- Fernández-Moya SM, Estévez AM. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010 Jul-Aug;1(1):34-46.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, et al. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*. 2007 Oct;134(Pt 11):1623-38.
- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, et al. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Eukaryot Microbiol*. 2008 Sep-Oct;55(5):427-35.
- Flegontov P, Votýpka J, Skalický T, Logacheva MD, Penin AA, et al. *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol*. 2013 Sep 23;23(18):1787-93.
- Garcia HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AH, Campaner M, et al. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *Int J Parasitol*. 2011 Nov;41(13-14):1385-96.
- Garcia HA, Ramírez OJ, Rodrigues CM, Sánchez RG, Bethencourt AM, et al. *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. *Vet Parasitol*. 2016 Oct 30;230:49-55.
- Garside LH, Gibson WC. Molecular characterization of trypanosome species and subgroups within subgenus *Nannomonas*. *Parasitology*. 1995; 111: 301-12.
- Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, et al. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Apr 15;107(2):269-77.

- Godoi MMI, Serrano MG, Teixeira MMG, Camargo EP. A PCR-Based survey on *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in Phytophagous Hemipterans of the Amazon Region. *J Eukaryot Microbiol.* 2002 Jul-Aug;49(4):275-9.
- Goldshmidt H, Matas D, Kabi A, Carmi S, Hope R, et al. Persistent ER stress induces the spliced leader RNA silencing pathway (SLS), leading to programmed cell death in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 2010 Jan 22;6(1):e1000731.
- Goncharov I, Xu YX, Zimmer Y, Sherman K, Michaeli S. Structure-function analysis of the trypanosomatid spliced leader RNA. *Nucleic Acids Res.* 1998 May 1;26(9):2200-7.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* 1999 Apr;118 (Pt 4):375-82.
- Gruby, D. Recherches et observations sur une nouvelle espece d'hématozoaire, *Trypanosoma sanguinis*. *C.R. Acad. Sci.* 1843; 17:1134-6.
- Hadziavdic K, Lekang K, Lanzen A, Jonassen I, Thompson EM, et al. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. *PLoS One.* 2014; 9(2): e87624.
- Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 2007 Dec;10(6):569-77.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and sm. *Int J Parasitol.* 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.* 2005 Apr 1;35(4):431-43.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol.* 2007 Jul;44(1):15-25.
- Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, et al. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect Genet Evol.* 2009 Jan;9(1):81-6.
- Hamilton PB, Teixeira MM, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol.* 2012 Apr;28(4):136-41.
- Hamilton PT, Votýpka J, Dostálová A, Yurchenko V, Bird NH, et al. Infection Dynamics and Immune Response in a Newly Described Drosophila-Trypanosomatid Association. *MBio.* 2015 Sep 15;6(5):e01356-15.
- Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Oct;55(1-2):115-26.
- Harris KA Jr, Crothers DM, Ullu E. In vivo structural analysis of spliced leader RNAs in *Trypanosoma brucei* and *Leptomonas collosoma*: a flexible structure that is independent of cap4 methylations. *RNA.* 1995 Jun;1(4):351-62.
- 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 Jul; 36(7):1989-95.
- Hassan Q, Das S, Adhya S. Mini-exon derived RNA gene of *Leishmania donovani*: structure, organization and expression. *J Biosci.* 1992 Mar; 17(1): 55-60.
- Hastings KE. SL trans-splicing: easy come or easy go? *Trends Genet.* 2005 Apr;21(4):240-7.
- Hayes PM, Lawton SP, Smit NJ, Gibson WC, Davies AJ. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasit Vectors.* 2014; 7: 50.
- Hernández R, Cevallos AM. Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitol Res.* 2014 Jul;113(7):2415-24.
- Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, et al. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res.* 2009;2009. pii: 897364.
- Herrera CP, Barnabé C, Brenière SF. Complex evolutionary pathways of the intergenic region of the mini-exon gene in *Trypanosoma cruzi* TcI: A possible ancient origin in the Gran Chaco and lack of strict genetic structuration. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:27-37.
- Hitchcock RA, Thomas S, Campbell DA, Sturm NR. The promoter and transcribed regions of the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene array are devoid of nucleosomes. *BMC Microbiology.* 2007 May;7:44.
- Hoare CA. Studies on *Trypanosoma grayi* III, Life cycle in the tsetse fly and in the crocodile. *Parasitology* 1931, 23:449-84.
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.*

1966; 212:1385–6.

Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph. Oxford; Blackwell Scientific Publications; 1972. 750pp.

Howie S, Guy M, Fleming L, Bailey W, Noyes H, et al. A Gambian infant with fever and an unexpected blood film. PLoS Med. 2006 Sep;3(9):e355.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics. 2001 Aug;17(8):754–5.

Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol Biol Evol. 2006 Feb;23(2):254–67.

Hussain K, Brodie B, Ott RS, Montealegre F. Prevalence of *Trypanosoma theileri* in cows and fetuses at slaughter. Am J Vet Res. 1985 Jun;46(6):1256–8.

Hutchinson R, Gibson W. Rediscovery of *Trypanosoma (Pycnomonas) suis*, a tsetse-transmitted trypanosome closely related to *T. brucei*. Infect Genet Evol. 2015 Dec;36:381–8.

Jaskowska E, Butler C, Preston G, Kelly S. *Phytomonas*: Trypanosomatids Adapted to Plant Environments. PLoS Pathog. 2015 Jan; 11(1): e1004484.

Jirku M, Yurchenko VY, Lukeš J, Maslov DA. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. J Eukaryot Microbiol. 2012 Nov-Dec;59(6):537–47.

Keller M, Tessier LH, Chan RL, Weil JH, Imbault P. In *Euglena*, spliced-leader RNA (SL-RNA) and 5S rRNA genes are tandemly repeated. Nucleic Acids Res. 1992 Apr;20(7):1711–5.

Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. EMBO J. 1990 Sep;9(9):2751–8.

Kent WS. A Manual of the Infusoria: including a description of all known flagellate, ciliate and tentaculiferous protozoa, British and foreign, and an account of the organization and affinities of sponges. London: Bogue D.; 1880.

Kingston N, Morton JK. *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. J Parasitol. 1975 Feb;61(1):17–23.

Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. Protist. 2014 Sep;165(5):594–604.

Kostygov AY, Dobáková E, Grybchuk-Ieremenko A, Váhala D, Maslov DA, et al. Novel Trypanosomatid-Bacterium Association: Evolution of Endosymbiosis in Action. MBio. 2016 Mar 15;7(2):e01985.

Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. Mol Biochem Parasitol. 2012 Feb;181(2):61–72.

Lai DH, Hashimi H, Lun ZR, Ayala FJ, Lukes J. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 12;105(6):1999–2004.

Laird, M. *Blastocrithidia* n. g. (Mastigophora; Protomonadina) for *Crithidia* (in part), with a subarctic record for *B. gerridis* (Patton). Can. J. Zool. 1959; 37:749–52

Lasda EL, Blumenthal T. Trans-splicing. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2011 May-Jun;2(3):417–34.

Lee MG, Van der Ploeg LH. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. Annu Rev Microbiol. 1997;51:463–89.

Léger, Louis. Sur un flagellé parasite de *Anopheles maculipennis*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1902; 54: 354–6.

Lemos M, Fermino BR, Simas-Rodrigues C, Hoffmann L, Silva R, et al. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. Parasit Vectors. 2015 Nov;8:573.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. *trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. Eukaryot Cell. 2003 Oct;2(5):830–40.

Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, et al. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) emeyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. Protist. 2012 Nov;163(6):856–72.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, et al. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. Parasit Vectors. 2013 Aug 3;6(1):221.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana Jr M, Pavan AC, et al. New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit Vectors*. 2015a; 8: 657.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop*. 2015b Nov;151:166-77.

Lücke S, Xu GL, Palfi Z, Cross M, Bellofatto V, et al. Spliced leader RNA of trypanosomes: in vivo mutational analysis reveals extensive and distinct requirements for trans splicing and cap4 formation. *EMBO J*. 1996 Aug 15; 15(16):4380–91.

Lukeš J, Skalický T, Týč J, Votýpka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol*. 2014 Jul;195(2):115-22.

Lustig Y, Sheiner L, Vagima Y, Goldshmidt H, Das A, et al. Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep*. 2007 Apr;8(4):408-13.

Maia Da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, 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*. 2004 Nov;129(Pt 5):549-61.

Maia da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol*. 2007 Aug;16(16):3361-73.

Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr, Ortiz PA, et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Trop*. 2009 Mar;109(3):199-207

Maia da Silva F, Marcili A, Ortiz PA, Epiphanyo S, Campaner M, et al. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. *Infect Genet Evol*. 2010 May;10(4):522-9.

Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, 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, et al. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3147-53.

Marinkelle CJ. The Biology of the Trypanosomes of Bats. Lumdsen WHR, Evans DA, editors. New York: Academic Press; 1976.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:525241.

Maslov DA, Elgort MG, Wong MG, Peckova H, Lom J, et al. Organization of mini-exon and 5S rRNA genes in the kinetoplastid *Trypanoplasma borrelli*. *Mol Biochem Parasitol*. 1993 Sep;61(1):127-35.

Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Apr;96(3):397-402.

Maslov DA, Westenberger SJ, Xu X, Campbell DA, Sturm NR. Discovery and barcoding by analysis of spliced leader RNA gene sequences of new isolates of Trypanosomatidae from Heteroptera in Costa Rica and Ecuador. *J Eukaryot Microbiol*. 2007 Jan-Feb;54(1):57-65.

Maslov DA, Yurchenko VY, Jirků M, Lukes J. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol*. 2010 Mar-Apr;57(2):177-88.

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

Matzura O, Wennborg A. RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Comput Appl Biosci*. 1996 Jun;12(3):247-9.

Mayer MG, Floeter-Winter LM. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Aug;100(5):501-13.

Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001 Mar-Apr;48(2):161-9.

McInnes LM, Hanger J, Simmons G, Reid SA, Ryan UM. Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitology*. 2011 Jan;138(1):59-70.

- Mesnil F, Brimont E. Sur un hématozoaire nouveau (*Endotrypanum* n.gen.) d'un dent, de Guyane. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. 1908; 65:581-3.
- Michaeli S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol.* 2011 Apr;6(4):459-74.
- Michaeli S. Spliced leader RNA silencing (SLS) - a programmed cell death pathway in *Trypanosoma brucei* that is induced upon ER stress. *Parasit Vectors.* 2012 May; 5:107.
- Milhausen M, Nelson RG, Sather S, Selkirk M, Agabian N. Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell.* 1984 Oct; 38(3):721-9.
- Minter-Goodblood E, Leake CJ, Minter DM, McNamara J, Kimber C, et al. *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: Development in vitro and in insect hosts. *Parasitology Research.* 1993, 79(4): 329–33.
- Molyneux DH. Trypanosomes of Bats. Kreier JP, Baker JR, editors. New York: Academic Press; 1991.
- 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 Sep;54(Pt 5):1861-75.
- Murphy WJ, Brentano ST, Rice-Ficht AC, Dorfman DM, Donelson JE. DNA rearrangements of the variable surface antigen genes of the trypanosomes. *J Protozool.* 1984 Feb;31(1):65-73.
- Nelson RG, Parsons M, Barr PJ, Stuart K, Selkirk M, Agabian N. Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*. *Cell.* 1983 Oct;34(3):901-9.
- Nicholas KB, Nicholas HB. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author <http://www.nrbcs.org/old/gfx/genedoc/>. 1997.
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol.* 1999 Feb;29(2):331-9.
- Nunes LR, De Carvalho MR, Buck GA. (1997). *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol Biochem Parasitol.* 1997 Jun;86(2):211-24.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infect Genet Evol.* 2007 Sep;7(5):587-93.
- Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PFP, Galati EAB, et al. Detection and identification of *Leishmania* species on field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.* 2006 Oct;99(2-3):252-9.
- Paparin A, Irwin PJ, Warren K, McInnes LM, de Tores P, et al. Identification of novel trypanosome genotypes in native Australian marsupials. *Vet Parasitol.* 2011 Dec 29;183(1-2):21-30.
- Parsons M, Nelson RG, Watkins KP, Agabian N. Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell.* 1984 Aug;38(1):309-16.
- Perry KL, Watkins KP, Agabian N. Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(23):8190–4.
- Pouchkina-Stantcheva NN, Tunnacliffe A. Spliced leader RNA-mediated trans-splicing in phylum Rotifera. *Mol Biol Evol.* 2005 Jun;22(6):1482-9.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, et al. 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.
- Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Góes-Cavalcante G, et al. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology.* 2010 Jan;137(1):111-22.
- Rodrigues AC, Ortiz PA, Costa-Martins AG, Neves L, Garcia HA, et al. Congopain genes diverged to become specific to Savannah, Forest and Kilifi subgroups of *Trypanosoma congolense*, and are valuable for diagnosis, genotyping and phylogenetic inferences. *Infect Genet Evol.* 2014 Apr;23:20-31.
- Rodrigues CMF, Batista JS, Lima JM, Freitas FJC, Barros IO, et al. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semi-arid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. *Parasit Vectors.* 2015; 8:564.
- Ross R. Further notes on Leishman's bodies. *The British Medical Journal* 2; 1903

Roy SW, Irimia M. Splicing in the eukaryotic ancestor: form, function and dysfunction. *Trends Ecol Evol*. 2009 Aug;24(8):447-55.

Salzer JS, Pinto CM, Grippi DC, Williams-Newkirk AJ, Peterhans JK, et al. Impact of Anthropogenic Disturbance on Native and Invasive Trypanosomes of Rodents in Forested Uganda. *Ecohealth*. 2016 Dec;13(4):698-707.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3a edição ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Santana DM, Lukes J, Sturm NR, Campbell DA. Two sequence classes of kinetoplastid 5S ribosomal RNA gene revealed among bodonid spliced leader RNA gene arrays. *FEMS Microbiol Lett*. 2001 Nov; 204 (2):233-7.

Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah, et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. *J Med Microbiol*. 2007 Aug; 56(Pt 8):1118-21.

Sato H, Takano A, Kawabata H, Une Y, Watanabe H, et al. *Trypanosoma cf. varani* in an imported ball python (*Python reginus*) from Ghana. *J Parasitol*. 2009 Aug;95(4):1029-33.

Sehgal RN, Jones HI, Smith TB. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Mol Ecol*. 2001 Sep;10(9):2319-27.

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, et al. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol*. 1999 Mar;91(3):268-79.

Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006 Apr;22(4):168-74.

Šlapeta J, Morin-Adeline V, Thompson P, McDonell D, Shiels M, et al. Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology*. 2016 Jul;143(8):1012-25.

Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Mar; 83(5): 1383-7.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Dec 20;83(2):141-52.

Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2005 Feb 15;21(4):456-63.

Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today*. 1999 Nov;15(11):432-7.

Stevens JR, Teixeira MMG, Bingle LEH, Gibson WC. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol*. 1999 May;29(5):749-57.

Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*. 2001;48:1-56.

Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;5:226-32.

Steverding D. The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors*. 2008 Feb;1:3.

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 Trop*. 1998 Sep 15;71(2):199-206.

Sturm NR, Yu MC, Campbell DA. Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1595-604.

Sturm NR, Maslov DA, Grisard EC, Campbell DA. *Diplonema* spp. possess spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida. *J Eukaryot Microbiol*. 2001 May-Jun;48(3):325-31.

Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, et al. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007 Feb;57(Pt 2):423-32.

Swofford DL. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013 Dec;30(12):2725-9.

Teixeira MMG. Trypanosomatidae: diversidade, filogenia e taxonomia. Tese (Livro Docencia). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia; 2010.

- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, et al. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist*. 2011 Jul;162(3):503-24.
- Thekisoe OM, Honda T, Fujita H, Battsetseg B, Hatta T, et al. A trypanosome species isolated from naturally infected *Haemaphysalis hystricis* ticks in Kagoshima Prefecture, Japan. *Parasitology*. 2007 Jul;134(Pt 7):967-74.
- Thomas S, Westenberger SJ, Campbell DA, Sturm NR. Intragenomic spliced leader RNA array analysis of kinetoplasts reveals unexpected transcribed region diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 2005 Jun 6;352:100-8.
- Thompson CK, Botero A, Wayne AF, Godfrey SS, Lymbery AJ, et al. Morphological polymorphism of *Trypanosoma copemani* and description of the genetically diverse *T. vegrandis* sp. nov. from the critically endangered Australian potoroid, the brush-tailed bettong (*Bettongia penicillata* (Gray, 1837)). *Parasit Vectors*. 2013 Apr 26;6:121.
- Torres-Machorro AL, Hernández R, Cevallos AM, López-Villaseñor I. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiol Rev*. 2010 Jan;34(1):59-86.
- Týč J, Votýpka J, Klepetková H, Suláková H, Jirků M, et al. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitanism and moderate host specificity. *Mol Phylogenet Evol*. 2013 Oct;69(1):255-64.
- Ullu E, Tschudi C. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10074-8.
- Umaer K, Ciganda M, Williams N. Ribosome Biogenesis in African Trypanosomes Requires Conserved and Trypanosome-Specific Factors *Eukaryot Cell*. 2014 Jun; 13(6): 727–37.
- Valkiūnas G, Iezhova TA, Carlson JS, Sehgal RN. Two new *Trypanosoma* species from African birds, with notes on the taxonomy of avian trypanosomes. *J Parasitol*. 2011 Oct;97(5):924-30.
- Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schönlank G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol*. 2014 Apr;52(4):1098-104.
- Ventura RM, Takata CSA, Nunes VLB, Silva RAMS, Takeda G, et al. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: total absence of kDNA of trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild animals. *J Parasitol*. 2000 Dec;86(6):1289-98.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. Lumsden WHR, Evans DA, editors. New York: Academic Press; 1976.
- Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 2008 Apr;135(5):595-605.
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, et al. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology*. 2009a Jan;136(1):55-65.
- Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, et al. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *J Eukaryot Microbiol*. 2009b Nov-Dec;56(6):594-602.
- Votýpka J, Svobodová M. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitol Res*. 2004 Jan; 92(2):47–151.
- Votýpka J, Maslov DA, Yurchenko V, Jirků M, Kment P, et al. Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect hosts in South-West China reveals both endemism and global dispersal. *Mol Phylogenet Evol*. 2010 Jan;54(1):243-53.
- Votýpka J, Szabová J, Rádrová J, Zídková L, Svobodová M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012 Mar;62(Pt 3):745-54.
- Votýpka J, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, et al. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*. 2013 Nov;164(6):763-81.
- Votýpka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesařová M, et al. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist*. 2014 Dec;165(6):825-38.

Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukeš J, et al. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. Trends Parasitol. 2015 Oct;31(10):460-9.

Weinman D. *Trypanosoma cyclops* n. sp.: a pigmented trypanosome from the Malaysian primates *Macaca nemestrina* and *M. ira*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1972;66(4):628-36.

Yurchenko VY, Lukes J, Jirku M, Maslov DA. Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 Apr;59(Pt 4):893-909.

Yurchenko V, Votýpka J, Tesarová M, Klepetková H, Kraeva N, et al. Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*. Folia Parasitol (Praha). 2014 Apr;61(2):97-112.

Yurchenko V, Kostygov A, Havlová J, Grybchuk-Ieremenko A, Ševčíková T, et al. Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. J Eukaryot Microbiol. 2016 Mar-Apr;63(2):198-209.

Zhang H, Campbell DA, Sturm NR, Lin S. Dinoflagellate spliced leader RNA genes display a variety of sequences and genomic arrangements. Mol Biol Evol. 2009 Aug;26(8):1757-71.

Zídková L, Cepicka I, Szabová J, Svobodová M. Biodiversity of avian trypanosomes. Infect Genet Evol. 2012 Jan;12(1):102-12.