Paola Andrea Ortiz Vargas

GENES DE CISTEÍNO PROTEASES (Catepsina L-like) DE

***Trypanosoma rangeli*:**

POLIMORFISMO, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

E ALVOS PARA DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração:
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Marta M. G. Teixeira

São Paulo
2008

RESUMO

ORTIZ, P.A. **Genes de cisteíno proteases (catepsina L-like) de *Trypanosoma rangeli*: polimorfismo, relações filogenéticas e alvos para diagnóstico e genotipagem.** 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Trypanosoma rangeli é um parasita do homem, de animais silvestres e domésticos nas Américas Central e do Sul, transmitido por triatomíneos. Esta espécie compartilha com *T. cruzi* hospedeiros vertebrados e invertebrados, e áreas geográficas sobrepostas. Ao contrário de *T. cruzi*, *T. rangeli* não é patogênico para o homem, mas é prejudicial para os seus vetores (*Rhodnius* spp.). Análises filogenéticas utilizando seqüências dos genes ribossômicos e de SL demonstraram que *T. rangeli* é um complexo de isolados distribuídos em 5 linhagens (A-E). Um importante fator na origem evolutiva das linhagens de *T. rangeli* é a sua associação com espécies simpátricas de *Rhodnius*. Filogenias baseadas em proteases do grupo das Catepsina L-like (CatL-like) de espécies de *Trypanosoma*, *Leishmania* e de bodonídeos corroboraram a filogenia dessas espécies inferidas com o gene SSU rDNA, sugerindo que esses genes podem ser úteis como marcadores filogenéticos e taxonômicos. Além disso, a existência de múltiplas e distintas cópias de genes de CatL-like entre os tripanosomas sugere que esses genes podem ser alvos sensíveis e específicos para métodos de diagnóstico, e pode ser bons marcadores para análises de estruturas de populações. Neste estudo, isolados e seqüenciados genes que codificam enzimas CatL-like de isolados de *T. rangeli* de seres humanos, de mamíferos silvestres e de diversas espécies de *Rhodnius* spp. das Américas do Sul e Central. Análises filogenéticas baseadas nas seqüências de genes de CatL-like que codificam as proteínas maduras de *T. rangeli* (Rangelipaína) alinhadas com genes homólogos de outras espécies de tripanossomas, *Leishmania* spp. e duas espécies de bodonídeos posicionaram as seqüências de *T. rangeli* mais próximas de seqüências de *T. cruzi*, corroborando a mesma ordem de divergência observada nas filogenias de cinetoplastídeos baseadas em SSU rDNA. Uma análise mais detalhada das seqüências correspondentes aos domínios catalítico de CatL-like obtidas de 18 isolados, representativos da diversidade genética e geográfica de *T. rangeli*, corroborou todas as linhagens filogenéticas previamente definidas para essa espécie. Em todas as linhagens, os genes CatL-like estão organizados em repetições de ~1.9 kb, dispostas em “em tandem” e localizados em cromossomos de tamanhos variáveis entre e intra-linhagens. Seqüências de genes CatL-like foram usadas como alvos na padronização de ensaios de PCR para o diagnóstico de *T. cruzi* e *T. rangeli*. Além disso, um novo método de genotipagem baseado em um multiplex-PCR cujos alvos são

seqüências de CatL-like permitiu a identificação das 5 principais linhagens de *T. rangeli*. Este é o primeiro estudo abrangente que utiliza seqüências de genes codificadores para comparar isolados de *T. rangeli* de linhagens distintas, e os genes estudados expressam enzimas muito importantes nos ciclos de vida dos tripanossomas. Em conjunto, marcadores baseados em kDNA, gene ribossômico e SL e, com esse estudo, também em seqüências de genes CatL-like corroboraram a evolução clonal das linhagens de *T. rangeli*. A associação desses marcadores sugere ciclos de transmissão independentes das diferentes linhagens, provavelmente associados às espécies simpátricas de *Rhodnius*. O repertório e as funções de enzimas codificadas por genes CatL-like de *T. rangeli* são desconhecidos. Novos estudos são necessários para compreender a história evolutiva desses genes e o papel dessas enzimas no ciclo de vida dos tripanossomas.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*; Cisteíno protease; Catepsina L-like; Polimorfismo genético, diagnóstico e genotipagem de tripanossomas; Análises filogenéticas.

ABSTRACT

ORTIZ, P.A. **Genes de cisteíno proteases (catepsina L-like) de *Trypanosoma rangeli*: polimorfismo, relações filogenéticas e alvos para diagnóstico e genotipagem.** 2008. 118 f. Master thesis (Parasithology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Trypanosoma rangeli is a parasite of man, and domestic and wild animals in Central and South Americas transmitted by triatomines. This species and *T. cruzi* shares hosts and overlapped distribution. In contrast to *T. cruzi*, *T. rangeli* is non-pathogenic in humans but is harmful to their vectors (*Rhodnius* spp.). Phylogenetic analysis using ribosomal and spliced leader gene sequences demonstrated that *T. rangeli* is a complex species comprising 5 lineages (A-E). A major factor in the evolutionary origin of *T. rangeli* lineages is their tightly association with sympatric *Rhodnius* species. Cathepsin L-like enzymes are cysteine proteases that play a vital role in the metabolism, infectivity and cell differentiation of trypanosomes, contributing for to its pathogenicity but also to host immune response modulation. Phylogenetic analyses of CatL-like genes from species of *Trypanosoma*, *Leishmania* and bodonids corroborated the phylogeny using SSU rDNA, thus suggesting that these genes can be useful as phylogenetic and taxonomic markers. In addition, the existence of distinct multiple CatL-like genes among trypanosomes suggested that they could be targets for sensitive and specific diagnostic methods, and could be good markers for population structure analysis. In this study, we have isolated and sequenced genes encoding cathepsin L-like (CatL-like) cysteine proteases of isolates of *T. rangeli* from humans, wild mammals and *Rhodnius* spp. from Central and South America. Phylogenetic analysis of sequences encoding the mature CatL-like enzymes from *T. rangeli* (Rangelipain), other trypanosome species, *Leishmania* spp. and two species of bodonids positioned sequences of *T. rangeli* closest to homologues sequences from *T. cruzi*, corroborating the same order of divergence showed in phylogenies of kinetoplastid species based on SSU rDNA. Further analysis of sequences corresponding to the catalytic domains of CatL-like genes from 18 isolates representative of the overall phylogenetic diversity and geographical range of *T. rangeli* supported all phylogenetic lineages previously defined. In all lineages, CatL-like are organized in tanden arrays of ~1.9kb located in chromosomes of variable length among and within the lineages. Sequences of CatL-like genes were used as targets to standardize PCR assays for the diagnosis of *T. rangeli* and *T. cruzi*. In addition, a new genotyping method of multiplex-PCR based on polymorphic CatL-like sequences allowed the identification of the 5 major phylogenetic lineages of *T. rangeli* defined by ribosomal and spliced leader gene sequences. This is the first comprehensive study using coding sequences of enzymes very important to life cycles of

trypanosomes to compare *T. rangeli* isolates of distinct lineages. Agreement with previous studies based on kDNA, ribosomal, and spliced leader genes corroborated the clonal evolution of the lineages within this species. The data support independent transmission cycles with lineage divergence probably associated to sympatric species of *Rhodnius*. The repertoire and functions of enzymes encoded by *T. rangeli* CatL-like genes are completely unknown. Further investigations are required to understand both evolutionary history and role of CatL-like enzymes in the life cycle and infectivity of trypanosomes.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*; Cysteine protease; Cathepsin L-like; Genetic polymorphism; Diagnosis and genotyping of trypanosomes; Phylogenetic analysis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Trypanosoma*

O filo Euglenozoa é um dos maiores grupos de eucariotos, compreendendo flagelados com grande diversidade morfológica, genética e ecológica. Os membros desse filo apresentam múltiplos estilos de vida, incluindo organismos de vida-livre e parasitas de diversas classes de vertebrados, de invertebrados e de plantas (CAVALIER-SMITH, 1981,1993; BREGLIA et al., 2007). O filo Euglenozoa está dividido em três ordens principais: Euglenoidea, Diplonemea e Kinetoplastida (PREISFELD et al., 2001; MOREIRA et al., 2001; BUSSE e PREISFELD, 2002, 2003; BREGLIA et al., 2007). Os membros da ordem Kinetoplastida incluem agentes causativos de várias doenças humanas e veterinárias assim como organismos cosmopolitas unicelulares de vida livre (SIMPSON e ROGER, 2004b). Caracteristicamente os kinetoplastídeos apresentam uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto, constituída por moléculas dupla-fita circulares, maxicírculos e minicírculos concatenados em uma única rede, os quais respectivamente, codificam proteínas ou RNAs mitocôndrias típicos e participam da edição dos genes transcritos.

Um sistema de classificação recente evidenciou a segregação dos kinetoplastídeos em duas subordens: Prokinetoplastina, que contém ectoparasitas de peixes e endossimbiontes de protozoários amebóides (*Ichthyobodo* e *Perkinsiella*) e Metakinetoplastina que consiste em 4 grupos principais, três clados de bodonídeos (Neobodonida, Parabodonida e Eubodonida) e o clado dos tripanossomatídeos (Trypanosomatida), cujos membros são todos parasitas da família Trypanosomatidae (DYKOVÁ et al., 2003; MOREIRA et al., 2004; SIMPSON et al., 2006)

A família Trypanosomatidae compreende diversos parasitas de animais invertebrados ou vertebrados e também de plantas, que atualmente estão divididos em 10 gêneros. A maioria destes gêneros reúne parasitas monoxênicos de insetos (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina* e *Sergeia*), enquanto o gênero *Phytomonas* contém parasitas heteroxênicos de insetos e plantas e apenas três gêneros albergam espécies heteroxênicas que circulam entre hospedeiros invertebrados (vetores) e vertebrados: *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma* (HOARE, 1972; PODLIPAEV et al., 2004; SVOBODOVÁ et al., 2007)

O gênero *Trypanosoma* foi originalmente proposto por Gruby (1843) para acomodar um parasita hemoflagelado, *Trypanosoma sanguinis*, observado em *Rana esculenta* na Europa. Desde então, inúmeras espécies de tripanossomas têm sido descritas em um grande número de hospedeiros vertebrados, abrangendo répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos (HOARE, 1972; STEVENS et al.,

2001; SIMPSON et al., 2006). As espécies do gênero *Trypanosoma* são todas parasitas heteroxênicos uma vez que em seus ciclos biológicos participam um hospedeiro vertebrado e um invertebrado hematófago que atua como vetor. A maioria das espécies de tripanossomas circula apenas no ciclo silvestre (zoonoses) e não é patogênica para seus hospedeiros vertebrados e vetores. Quase todas as espécies se desenvolvem em artrópodes hematófagos, que podem pertencer a diversas ordens (dípteros, hemípteros e ácaros), enquanto os parasitas de anfíbios e peixes são transmitidos por sanguessugas e insetos (HOARE, 1972; SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007). Algumas espécies de tripanossomas africanos são apenas mecanicamente transmitidas porque não apresentam mitocôndria funcional, indispensável ao metabolismo dos tripanossomas no vetor (GARDINER e MUSA, 1992).

Centenas de espécies de tripanossomas já foram descritas em mamíferos de praticamente todas as ordens e em todos os continentes. Porém, apenas *T. brucei* ssp., na África, e *T. cruzi* e *T. rangeli*, nas Américas, infectam o homem. São considerados patogênicos para o homem somente *T. cruzi* e *T. brucei*. Esses tripanossomas circulam no ambiente silvestre como enzootias, transmitidos por diversos insetos hematófagos associados com os hospedeiros vertebrados e seus respectivos ecótopos (HOARE, 1972; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006).

De acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, com a via de transmissão das formas infectantes pelo vetor, os tripanossomas de mamíferos foram divididos em duas Seções: Salivaria e Stercoraria. A Seção *Salivaria* compreende os tripanossomas de origem africana que no inseto vetor (mosca tsétsé) se desenvolvem no estômago, no tubo digestivo e em algumas espécies, como *T. brucei*, completam seu desenvolvimento nas glândulas salivares. As espécies desse grupo são transmitidas mecanicamente ou pela via inoculativa durante a picada do vetor (HOARE, 1972). Esta seção compreende os subgêneros *Trypanozoon* (*T. brucei*), *Duttonella* (*T. vivax*), *Nannomonas* (*T. congolense*) e *Pycnomonas* (*T. suis*).

A Seção *Stercoraria* compreende espécies que se desenvolvem exclusivamente no tubo digestivo do invertebrado, sendo as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas, eliminadas com as fezes e transmitidas por contaminação, penetrando nos hospedeiros vertebrados via orifícios da picada ou mucosas (HOARE, 1972). Esta seção compreende os subgêneros *Megatrypanum* (*T. theileri*), *Schizotrypanum* (*T. cruzi*) e *Herpetosoma* (*T. lewisi* e *T. rangeli*).

As diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* apresentam 3 estágios morfológicos durante seu ciclo biológico, amastigota, epimastigota e tripomastigota presentes em diferentes combinações no sangue e/ou tecidos dos hospedeiros vertebrados e invertebrados de acordo com a espécie de tripanossoma.

1.2 FILOGENIA E EVOLUÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Trypanosoma*

Na árvore filogenética universal, as espécies do filo Euglenozoa têm sido posicionadas em um grupo denominado Excavata (CAVALIER-SMITH, 2003a,b; 2004). Esse posicionamento sugere que estes organismos estejam entre os primeiros eucariotos a divergir, provavelmente, logo após a separação da linhagem procariótica. A monofilia do filo Euglenozoa está bem estabelecida, porém, sua posição em relação aos outros protozoários, e as relações filogenéticas entre seus principais grupos (euglenóides, diplomonídeos e kinetoplastídeos) não estão bem resolvidas. Estudos filogenéticos recentes baseados em análises de proteínas e código genético mitocondrial, suportam a hipótese que os organismos mais próximos dos kinetoplastídeos não são os euglenídeos, mas sim, um grupo menos explorado, os diplomonídeos que são protozoários de vida livre ou parasitas facultativos de vários invertebrados (MASLOV et al., 1999; SIMPSON e ROGER, 2004a; VON DER HEYDEN et al., 2004; SIMPSON et al., 2006). Análises similares mostraram que dentro dos kinetoplastídeos, os tripanossomatídeos, formaram um grupo monofilético que divergiu aparentemente dos bodonídeos de vida livre (MOREIRA et al., 2004; SIMPSON e ROGER, 2004a; SIMPSON et al., 2006).

As espécies do gênero *Trypanosoma* parasitas de mamíferos foram distribuídas em vários subgêneros de acordo com características morfológicas e biológicas (HOARE, 1972). No entanto, o advento de ferramentas moleculares e diversos estudos dos relacionamentos filogenéticos dos tripanossomas posicionaram diversas espécies em grupos distintos dos subgêneros previamente definidos por parâmetros taxonômicos tradicionais (STEVENS et al., 1998, 1999a,b, 2001, STEVENS e GIBSON, 1999; MAIA DA SILVA et al., 2004b; RODRIGUES et al., 2006; HAMILTON et al., 2004; 2007).

Estudos iniciais baseados nas seqüências da subunidade menor do gene ribossômico (SSUrDNA) apontaram para uma origem parafilética dos tripanossomas (MASLOV, 1996; MASLOV e SIMPSON, 1995). Entretanto, análises posteriores incluindo um número maior de taxa sugeriram a origem monofilética destes organismos. Assim sendo, a monofilia do gênero *Trypanosoma* tornou-se a hipótese mais apoiada em filogenias derivadas das seqüências dos genes SSUrDNA e gGAPDH (HAAG et al., 1998; STEVENS et al., 1999a,b, 2001; WRIGHT et al., 1999; HAMILTON et al., 2004; 2007; FERREIRA et al., 2007; VIOLA et al., 2008a,b). Desta maneira, os estudos indicam que todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, peixes, anfíbios e répteis se originaram de um único ancestral. Os demais tripanossomatídeos foram divididos em dois grupos, um contendo as espécies dos gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* que albergam endossimbiontes bacterianos, e outro grande grupo composto pelas demais espécies destes gêneros e pelas espécies dos gêneros

Phytomonas, *Leptomonas*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Estes estudos embora tenham evidenciado a origem parafilética de praticamente todos os gêneros, apoiaram a origem monofilética dos tripanossomas (PODLIPAEV e FROLOV, 2000; MERZLYAK et al., 2001; YURCHENKO et al., 2008).

Alguns trabalhos também utilizaram seqüências codificadoras de proteínas para inferir a história evolutiva do gênero *Trypanosoma*. Estes estudos incluíram análises dos genes *gGAPDH*, Fator de alongação 1 α , tripanotiona redutase, β tubulina, HSP90 e HSP70, que geraram filogenias congruentes em apresentar aos tripanossomas como um grupo monofilético (HASHIMOTO et al., 1995; ALVAREZ et al., 1996; HANNAERT et al., 1998; LUKES et al., 2002; HAMILTON et al., 2007).

A confirmação da monofilia dos tripanossomas evidenciou agrupamentos filogenéticos chave nesse gênero que foram apoiados por diversos estudos (STEVENS et al., 2001; HAMILTON et al., 2004, 2005a, 2007). Desta maneira, as inferências filogenéticas mais recentes dividiram os tripanossomas em dois grupos principais: Clados aquático e terrestre. O clado aquático é constituído por dois subclados, um deles formado principalmente por tripanossomas isolados de peixes e um isolado de ornitorrinco, sendo provavelmente transmitidos por sanguessugas aquáticas e um outro subclado formado pelos tripanossomas de anuros, aparentemente transmitidos por flebotomíneos (FERREIRA et al., 2007; VIOLA et al., 2008a,b) (Figura 1).

Entretanto o Clado terrestre foi subdividido nos seguintes subclados: **Clado *Squamata***: formado por alguns tripanossomas de lagartos e cobras transmitidos por insetos flebotomíneos (HAMILTON et al., 2007; VIOLA et al., 2008a,b; FERREIRA et al., 2007); **Clado *T. avium***: composto por tripanossomas de aves, aparentemente sem restrição pela espécie hospedeira e transmitidos por diversos artrópodes (SEHGAL et al., 2001; VOTÝPKA et al., 2002); **Clado *T. lewisi***: que compreende tripanossomas encontrados principalmente nas ordens Rodentia, Lagomorpha e Insetívora. Os organismos deste grupo são transmitidos por pulgas e apresentam especificidade pelo hospedeiro vertebrado (HAMILTON et al., 2005b); **Clado *T. theileri***: agrupa tripanossomas isolados de mamíferos da ordem Artiodactyla com significativa especificidade pelo hospedeiro vertebrado e transmitidos por tabanídeos (RODRIGUES et al., 2006); **Clado *T. grayi***: compreende tripanossomas isolados de lagartos e crocodilianos (VIOLA et al., 2008a,b); **Clado *T. brucei***: neste clado foram posicionados os tripanossomas de mamíferos de origem africana com história evolutiva confinada a África e associada com moscas tsetse. Estes dados junto com evidências paleogeográficas sugerem que a divergência do clado *T. brucei* dos outros tripanossomas data do período médio-Cretáceo, há cerca de 100 milhões de anos, quando a África foi isolada dos demais continentes (STEVENS et al., 1999, 2001). (Figura 1).

O Clado *T. cruzi*: corroborado em todos os estudos, compreende as espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi* e tripanossomas exclusivos de morcegos do novo e velho mundo: *T. c.*

marinkellei, *T. dionisii* e outros) além de um isolado de canguru da Austrália. Como também *T. rangeli* e as denominadas espécies *T. rangeli-like* as quais formaram um grupo muito homogêneo, embora separado mostrou-se mais relacionado com as espécies do subgênero *Schizotrypanum* do que com qualquer outro grupo (STEVENS, et al., 1999b, 2001; BRIONES et al., 1999; HAMILTON et al., 2004, 2007; MAIA DA SILVA et al., 2004b).

Figura 1- Árvore filogenética combinada inferida a partir das seqüências dos genes *GAPDH* e ribossômico (SSUrDNA), mostrando as relações evolutivas dos tripanossomatídeos.

FONTE: HAMILTON et al., 2007.

1.3 TAXONOMIA E FILOGENIA DE *T. rangeli*

T. rangeli foi classificado no subgênero *Herpetosoma*, cuja espécie tipo é *T. lewisi*, devido à morfologia similar das formas tripomastigotas sanguíneas dessas duas espécies. Essas formas são longas (26 a 36 µm), possuem cinetoplasto subterminal, pequeno, redondo e distante do núcleo localizado na metade do corpo, e uma membrana ondulante bem desenvolvida (Figura 2). Entretanto, diferente de *T. lewisi*, que é transmitido por pulgas, a principal característica de *T. rangeli* é o seu desenvolvimento em triatomíneos do gênero *Rhodnius*, os vetores naturais desta espécie. Nesses triatomíneos, o parasita se desenvolve no tubo digestivo, com posterior invasão da hemolinfa e das glândulas salivares, onde ocorre à formação dos tripomastigotas metacíclicos que são as formas infectantes transmitidas por via inoculativa aos diversos hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992, 1999; VALLEJO et al., 2003).

Figura 2- Morfologia por microscopia óptica de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma rangeli* isolados de diversos hospedeiros vertebrados corados com giemsa.

FONTE: Adaptado de MAIA DA SILVA et al., 2004a.

Durante muito tempo, foram considerados *T. rangeli* “*stricto sensu*” apenas aqueles tripanossomas que obedeciam a todas estas particularidades. Hemoflagelados morfologicamente similares a *T. rangeli* isolados de *Rhodnius spp.* ou do sangue de vertebrados, capazes de se desenvolver no intestino de triatomíneos experimentalmente infetados, mas que não invadem a hemolinfa e/ou as glândulas salivares, não podiam ser classificados como *T. rangeli* (GUHL e VALLEJO, 2003). Em decorrência dessa conduta, várias espécies relacionadas a *T. rangeli* foram criadas e conhecidas em conjunto como *T. rangeli-like* (HOARE, 1972; GUHL e VALLEJO, 2003). Com estas características foram descritas espécies como *T. diasi*, *T. saimiri*, *T. myrmecophagae*, *T. mycetae*, *T. mesnilbrimonti*, *T. leeuwenhoekii*, e *T. preguici* (HOARE, 1972). Essas espécies foram

encontradas em preguiças, tamanduás e primatas não humanos em vários países da América Latina. Outras espécies *T. rangeli-like* foram observadas no intestino, mas não na hemolinfa ou glândulas salivares, de 16 espécies pertencentes a 5 gêneros de Triatomíneos: *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* e *Triatoma*. No entanto, estudos posteriores baseados num conhecimento mais amplo da interação de *T. rangeli* com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados demonstraram que outras espécies de triatomíneos, além de *Rhodnius*, podem ser infectadas por *T. rangeli* embora a infecção seja restrita ao tubo digestivo. Isto é provável porque nem todos esses triatomíneos atuam como vetores naturais dessa espécie (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992, 1999; GUHL e VALLEJO et al., 2003).

Portanto, segundo critérios taxonômicos tradicionais, com base nos hospedeiros de origem e na morfologia, *T. rangeli* foi classificado no subgênero *Herpetosoma* (HOARE, 1972; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992). O subgênero *Herpetosoma*, como tradicionalmente definido, compreende tripanossomas que não são patogênicos para seus hospedeiros mamíferos, divididos em dois grupos: *T. lewisi* (parasitas principalmente de roedores) e *T. rangeli* junto com os *T. rangeli-like* (HOARE, 1972). Análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rDNA e gGAPDH indicaram que *T. rangeli* não forma um grupo monofilético com *T. lewisi*, que sim forma um clado homogêneo com outras espécies relacionadas (*T. microti*, *T. nabiasi*, *T. rabinowitschae*, *T. musculi*, *T. blanchardi*) sempre posicionado em um ramo separado e distante de *T. rangeli* nas filogenias (HAMILTON et al., 2005b, 2007).

Estudos filogenéticos moleculares demonstraram que os subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* não são monofiléticos (STEVENS e GIBSON, 1999; STEVENS et al., 1999a,b, 2001; MAIA DA SILVA et al., 2004b; RODRIGUES et al., 2006). Neste sentido Hoare (1972) já havia considerado a *T. rangeli* como uma espécie bizarra dentro do subgênero *Herpetosoma*, enquanto Añez (1982) já tinha proposto a remoção de *T. rangeli* desse táxon e a criação de um novo subgênero, *Tejeraia*, dentro da *Secção Stercoraria*.

Os estudos filogenéticos também, indicaram que *T. rangeli* e *T. rangeli-like* constituem um clado homogêneo muito bem suportado formando o clado *T. rangeli* que apresenta uma estreita relação com o subgênero *Schizotrypanum*, o único grupo que aparenta ser monofilético entre os tripanossomas da *Secção Stercoraria*. Por outro lado, estudos biológicos e moleculares de isolados de *T. rangeli* provenientes do homem como também de várias espécies de mamíferos silvestres e domésticos (cães) e de diferentes espécies de *Rhodnius*, originários de regiões geográficas distintas, revelaram que todos eles formaram um grupo monofilético (STEVENS et al., 1999a; MAIA DA SILVA et al., 2004b, 2007).

A posição taxonômica e as relações evolutivas de *T. rangeli* têm gerado muitas controvérsias devido ao seu ciclo de vida peculiar. *T. rangeli* apresenta características biológicas tanto da *Secção*

Salivaria quanto da *Secção Stercoraria*. Da *Secção Salivaria T.rangeli* apresenta o desenvolvimento das formas infectantes nas glândulas salivares do vetor e a infecção do hospedeiro através da via inoculativa. Enquanto da *Secção Stercoraria* observa-se a habilidade para infectar o tubo digestivo do vetor com multiplicação de epimastigotas, o desenvolvimento de tripomastigotas na ampola retal e a eventual transmissão pela via contaminativa para o vertebrado (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992,1999; CUBA-CUBA, 1998).

Entretanto, *T. rangeli* se posiciona nas filogenias muito distante de todos os tripanossomas africanos, apesar de ser transmitido de forma inoculativa como os membros do clado *T. brucei* (*Salivaria*), indicando que o mecanismo de transmissão pode não ser um caráter importante para estabelecer relacionamentos evolutivos (STEVENS et al., 1999a, 2001; MAIA DA SILVA et al., 2004b, 2007). Outro aspecto contraditório na taxonomia de *T. rangeli* que tem sido elucidado pelas análises filogenéticas é a validade das espécies denominadas *T. rangeli-like*. Diversos marcadores moleculares e análises filogenéticas confirmaram que alguns isolados de *T. rangeli-like* são indistinguíveis de *T. rangeli* e consideradas sinónimas (*T. leeuwenhoekii*, *T. minasense*, *T. saimiri*). Porém, a maioria nunca foi incluída em estudos filogenéticos que pudessem validar o status de espécie independente (STEVENS et al., 1999a; ZICCARDI e OLIVEIRA, 1999; ZICCARDI et al., 2005; MAIA DA SILVA et al., 2004a,b; VALLEJO et al., 2007).

Apesar de *T. rangeli* estar estreitamente relacionado com *T. cruzi* e compartilhar hospedeiros mamíferos e vetores, todos os estudos filogenéticos e diversos marcadores moleculares separam *T. rangeli* de *T. cruzi*. As distâncias genéticas entre essas espécies sugerem vias evolutivas diferentes e independentes (STEVENS et al., 1999a). Esta hipótese é congruente com as evidentes diferenças morfológicas e dos ciclos de vida destas espécies (VALLEJO et al., 2002, 2003; URREA et al., 2005; MAIA DA SILVA et al., 2004a,b, 2007).

1.4 HOSPEDEIROS MAMÍFEROS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *T. rangeli*

Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli e *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, são os únicos tripanossomas encontrados no homem nas Américas (HOARE, 1972; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2006). *T. cruzi* infecta aproximadamente 7.6 milhões de pessoas na América Latina, ocasionando sérios problemas cardíacos e digestivos (SCHMUNIS, 2007). *T. rangeli* não é considerado patogênico para seus hospedeiros vertebrados e não existem dados sobre a prevalência de infecções causadas por essa espécie (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992,

1999; VALLEJO et al., 2003). Estas duas espécies possuem uma ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, com sobreposição não só de áreas geográficas como também dos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Trypanosoma rangeli foi descoberto na Venezuela no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* (TEJERA, 1920). A partir dessa descrição, diversos estudos indicaram a presença desta espécie na Colômbia (REY e UCROS, 1939), Guatemala (DE LEON, 1949), EL Salvador (ZELEDON, 1956), Costa Rica (MONTERO, 1958), Panamá (SOUSA, 1966), Uruguai (ZELEDON, 1954), Paraguai (CANESE, 1964), Peru (AYALA, 1964), Brasil (LUCENA e MARQUES, 1954), Chile e Argentina (PESSÔA, 1963). Desde então *T.rangeli* tem sido observado praticamente todos os países de Centro e Sul de América (GRISARD et al., 1999b; GUHL e VALLEJO, 2003; MAIA DA SILVA et al., 2004a, 2007).

No Brasil, *T. rangeli* foi descrito em diferentes mamíferos e triatomíneos de diversas regiões, a maioria da Amazônia. Os únicos casos de infecção humana no Brasil foram descritos nos estados do Amazonas e Bahia (COURA et al., 1996; DE SOUSA et al., 2008). Infecções em animais silvestres e triatomíneos têm sido descritas na região Sul, em Santa Catarina (STEINDEL et al., 1991); na região norte nos estados de Amazonas, Pará, Rondônia e Acre (DEANE, 1958; MAIA DA SILVA et al., 2004 a,b); na região sudeste em Minas Gerais (RAMIREZ et al., 1998); no centro oeste, no Distrito Federal (GURGEL-GONÇALVES et al., 2004) e Mato Grosso do Sul (MAIA DA SILVA et al., 2008) e na região nordeste, no Ceará (DIAS et al., 2007).

Por outro lado, a infecção humana por *T. rangeli* é bastante prevalente em países da América Central como: Panamá, Costa Rica, Nicarágua, Guatemala e El Salvador e Noroeste da América do Sul especificamente na Colômbia e Venezuela (SOUSA e JOHNSON, 1973; GUHL e VALLEJO, 2003; CALZADA et al., 2006; PINEDA et al., 2008). Estudos recentes realizados numa região endêmica para doença de chagas em Panamá, indicaram que os vetores locais incrementaram seu comportamento antropófilo. Além disso, cerca de 90% dos triatomíneos encontrados no domicílio e peridomicílio, estavam infectados com tripanossomas, principalmente com *T.cruzi* (~80%), porém a porcentagem de infecção por *T.rangeli* foi significativa (~51%) e infecções mistas (~50%) também foram observadas (PINEDA et al., 2008). Estes resultados refletem nitidamente a situação das áreas endêmicas a onde o diagnóstico de ambas as tripanossomíases pode ser confuso e os casos de infecção humana por *T.rangeli* subestimados. Entretanto casos humanos por *T.rangeli* nunca foram descritos no Cone Sul da América do Sul.

Além de infectar o homem, *T. rangeli* compartilha com *T. cruzi* a capacidade de infectar mamíferos de todas as ordens, incluindo primatas não humanos, roedores, marsupiais, edentados, morcegos e carnívoros (HOARE, 1972; SOUSA e DAWSON, 1976; MILES et al., 1983; STEINDEL et

al., 1991; CUBA-CUBA, 1998; MAIA DA SILVA et al., 2004a, b, 2007, 2008). Estes parasitas compartilham o desenvolvimento em triatomíneos que atuam como vetores para os hospedeiros vertebrados. As infecções simultâneas com esses dois tripanossomas são comuns em mamíferos e triatomíneos, dificultando o isolamento e a identificação das duas espécies. Além disso, a grande similaridade entre alguns estágios morfológicos de *T. cruzi* e *T. rangeli* encontrados no intestino do inseto vetor (VALLEJO et al., 1988) e a presença de determinantes antigênicos em comum podem levar a identificação errada desses parasitas. A dificuldade de separar essas duas espécies e, conseqüentemente, a diagnósticos ambíguos da doença de Chagas constitui um sério problema para o entendimento epidemiológico das tripanossomíases americanas, que aponta *T. rangeli* como a segunda espécie de tripanossoma de maior importância humana na América Latina (GUHL e VALLEJO, 2003).

1.5 CICLO BIOLÓGICO DE *T. rangeli* NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO

T. rangeli é um parasita do homem e de outros mamíferos, não sendo considerado patogênico para esses hospedeiros. Os aspectos fundamentais do seu desenvolvimento no vertebrado que poderiam explicar essa aparente falta de patogenicidade e virulência não estão totalmente esclarecidos (D'ALESSANDRO, 1976; URDANETA-MORALES e TEJERO, 1985, 1986; SCORZA et al., 1986; CUBA-CUBA, 1998; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1999;). Embora formas tripomastigotas do parasita tenham sido observadas no sangue de humanos e de animais domésticos e silvestres, o ciclo de vida no hospedeiro vertebrado não foi totalmente determinado e os dados são escassos e controversos (AÑEZ et al., 1985; STEINDEL, 1993; OSORIO et al., 1995; EGER-MANGRICH et al., 2001). Diversos estudos têm fracassado em demonstrar a presença de formas intracelulares ou replicativas em animais naturalmente e experimentalmente infectados. Por outro, alguns autores tem reportado a presença de formas intracelulares semelhantes a amastigotas em camundongos experimentalmente infectados (SCORZA et al., 1986; URDANETA-MORALES e TEJERO, 1986). Como esses achados são extremamente raros e em diversos outros estudos essas formas não foram detectadas, não se pode descartar a hipótese de que essas observações sejam devidas a infecções mistas por *T. rangeli* e *T. cruzi*, ou infecções causadas apenas por *T. cruzi*.

Formas amastigota-like, diferentes das amastigotas apresentadas por *T. cruzi*, foram observadas em culturas de células das linhagens celulares U937 e VERO em experimentos de infecção *in vitro* com *T. rangeli*. Entretanto, a infecção se manteve por pouco tempo, e essas formas não se

multiplicaram nem diferenciaram para tripomastigotas (OSORIO et al., 1995; ZÚÑIGA et al., 1997).

Alguns autores defendem a hipótese de que *T. rangeli* não se multiplica no hospedeiro vertebrado, sobrevivendo apenas no sangue por períodos curtos de tempo. No entanto, estudos diferentes também têm demonstrado que as parasitemias patentes de *T. rangeli* são de curta duração (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992). Entretanto, relatos de infecções com duração de meses, e até mesmo de anos, questionam essa hipótese. Provavelmente, *T. rangeli* se multiplica como tripomastigota na corrente sangüínea, provavelmente por divisão binária, mas não como amastigota intracelular. A multiplicação de formas tripomastigotas no sangue é observada em infecções causadas por tripanossomas africanos e em espécies do subgênero *Megatrypanum*, como por exemplo, *T. theileri*. Observações de formas sanguíneas de *T. rangeli* com dois cinetoplastos e dois núcleos sugerem a existência desse processo. No entanto, essas formas foram observadas no sangue de animais experimentalmente infectados e podem corresponder a formas recentemente inoculadas pelo vetor. Portanto, a multiplicação de *T. rangeli* nos hospedeiros mamíferos ainda precisa ser comprovada (CUBA-CUBA, 1998; GUHL e VALLEJO, 2003; MENESES et al., 2004).

1.6 CICLO BIOLÓGICO DE *T. rangeli* NO VETOR

Ao contrário do ciclo de vida de *T. rangeli* no hospedeiro vertebrado, seu desenvolvimento no vetor, que são triatomíneos, do gênero *Rhodnius* é bem conhecido (Figura 3). Apesar de *T. rangeli* não ser considerado patogênico para seus hospedeiros vertebrados, causa diversos efeitos deletérios no vetor tais como: dificuldades na muda com deformações morfológicas, desenvolvimento tardio das ninfas, lise de células musculares durante a invasão da hemolinfa e até uma alta mortalidade ocasionada pela invasão das glândulas salivares que alteram o comportamento alimentar (AÑEZ, 1984; CUBA-CUBA, 1998; MENESES et al., 2004).

Os triatomíneos, que são obrigatoriamente hematófagos, são infectados por *T. rangeli* no momento em que se alimentam do sangue de reservatórios naturais do parasita. Desta maneira, as formas tripomastigotas sanguíneas provenientes do hospedeiro vertebrado migram ao intestino durante a ingestão do sangue e no intestino médio do vetor se transformam em epimastigotas, os quais se multiplicam e algumas formas migram até a região posterior do tubo digestivo para se diferenciar em formas tripomastigotas que podem ser eliminadas nas fezes. Nessa primeira fase as formas epimastigotas predominantes no intestino médio, os epimastigotas são submetidos aparentemente à ação de enzimas digestivas e fatores líticos estomacais os quais podem modular esse primeiro contato

entre o parasita e o vetor (AZAMBUJA et al., 1989, 2004; AZAMBUJA e GARCIA, 2005), deste modo o epitélio intestinal é a principal barreira que *T.rangeli* encontra durante seu ciclo no hospedeiro invertebrado. Entretanto a desorganização estrutural das células epiteliais do intestino médio, principalmente as micro-vilosidades, facilitam a penetração da parede intestinal pela via intracelular, ou seja, logo após do dano superficial o parasita se movimenta dentro do citoplasma das células epiteliais, alcança a região basal e a atravessa para invadir a hemolinfa (HECKER et al., 1990; OLIVEIRA e DE SOUZA, 2001; GOMES et al., 2002).

Figura 3- Descrição do ciclo biológico de *T.rangeli* no inseto vetor: (A) Ingestão de tripomastigotas sanguíneos provenientes do hospedeiro vertebrado; (B) tripomastigotas se diferenciando para epimastigotas no intestino médio; (C) epimastigotas que atravessaram a parede intestinal para invadir a hemolinfa e os hemócitos; (D) formas epimastigotas que migraram para a ampola retal com diferenciação de algumas formas tripomastigotas; (e) Invasão da hemolinfa por divisão intensiva dos parasitas livres no hemocele; (f) Invasão das glândulas salivares do inseto com posterior formação de tripomastigotas metacíclicas ou formas infectantes para novos reservatórios vertebrados.

FONTE: Adaptado de HOARE, 1972; GARCIA et al., 2007.

Uma vez no hemocele *T.rangeli* pode ser reconhecido pelo sistema imune do vetor e ser fagocitado pelos hemócitos a onde acontece a formação de vacúolos parasitóforos, nesta fase não se observam parasitas em divisão, porém durante o percurso da infecção alguns hemócitos aparecem estourados mostrando a liberação de parasitas (OLIVEIRA e SOUZA, 2003). Outra via de infecção dentro do hemocele é a multiplicação intensiva de parasitas livres na hemolinfa (MELLO et al., 1995; GARCIA et al., 2004), os quais desencadeiam diversos mecanismos do sistema imune que incluem: lisozimas e atividade tripanolítica (MELLO et al., 1995; GOMES et al., 1999; PULIDO et al., 2008); ativação do sistema profenoloxidase (MELLO et al., 1995; GOMES et al., 1999, 2003; GARCIA et al., 2004); fagocitose e micro-aglutinação de hemócitos (MELLO et al., 1995; GARCIA et al., 2004) e a geração de radicais citotóxicos superóxido e óxido nítrico (WHITTEN et al., 2001, 2007; AZAMBUJA et al., 2005, AZAMBUJA e GARCIA, 2005).

Na etapa final do seu desenvolvimento, o parasita invade as glândulas salivares, provavelmente pela intervenção de uma proteína formadora de poro “PFP” para alcançar o lúmen desses órgãos (MEIRELLES et al., 2005). Estudos recentes também sugeriram que ecto-fosfatases presentes na superfície das glândulas salivares de *R.prolixus*, participariam das interações parasita-hospedeiro (GOMES et al., 2008). No entanto estudos mais detalhados são necessários para compreender o passo final do ciclo onde são originados os tripomastigotas metacíclicos ou formas infectantes para os hospedeiros vertebrados (HOARE, 1972; D’ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992, 1999; AZAMBUJA et al., 2005; AZAMBUJA e GARCIA, 2005).

Como observado, o desenvolvimento de *T. rangeli* no seu vetor natural é diferente do apresentado por todos os tripanossomas conhecidos. Enquanto *T. rangeli* multiplica-se no tubo digestivo e hemolinfa completando seu desenvolvimento com o processo de metaciclogênese nas glândulas salivares, *T. cruzi* tem todo seu desenvolvimento restrito ao tubo digestivo de triatomíneos. Os tripanossomas africanos da *Secção Salivaria* são transmitidos por inoculação de formas infectantes juntamente com a saliva. Entretanto, as formas infectantes e o desenvolvimento de *T. brucei*, *T. vivax* e *T. congolense* nas moscas tsé-tsé são bastante diferentes do observado com *T. rangeli* nos triatomíneos. Dessas espécies, apenas *T. brucei* ssp. apresenta formas tripomastigotas metacíclicas nas glândulas salivares. Porém, a infecção das glândulas salivares de tsetse por *T. brucei* não ocorre via hemolinfa, mas sim a partir de parasitas na probóscide do vetor (AKSOY et al., 2003).

1.7 VETORES DE *T. rangeli*

T. cruzi e *T. rangeli* são transmitidos por triatomíneos, os únicos vetores naturais destas espécies. Contudo, nem todas as espécies de triatomíneos são consideradas vetoras dessas espécies, grande parte pode transmitir *T. cruzi*, porém, um menor número de espécies transmite *T. rangeli*. Para serem considerados vetores biológicos de *T. rangeli* os insetos devem não apenas ser susceptíveis à infecção, mas permitir o desenvolvimento de tripomastigotas metacíclicos nas glândulas salivares, em infecções naturais e/ou experimentais (GUHL e VALLEJO, 2003).

A transmissão de *T. rangeli* para o vertebrado parece estar diretamente relacionada com espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (HOARE, 1972; D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992, 1999), que é considerado o segundo gênero de maior diversidade logo após o gênero *Triatoma*. As espécies do gênero *Rhodnius* apresentam diversos padrões de associação com seus habitats os quais podem variar desde a infestação de uma única espécie de palmeira até a invasão de espécies de palmeiras de gêneros diferentes como *Leopoldinia*, *Attalea*, *Oenocarpus*, *Phytelephas*, *Copernicia*, *Orbignya*, *Acrocomia*, *Elaeis*, *Mauritia* e *Astrocaryum* (ABAD-FRANCH et al., 2005).

O gênero *Rhodnius* atualmente compreende 16 espécies (GALVÃO et al., 2003), 12 consideradas de importância epidemiológica devido a sua capacidade de transmissão vetorial de *T. rangeli*, que tem sido comprovada por infecções naturais e experimentais (Tabela 1). Demonstrando, assim, que o gênero *Rhodnius* é muito susceptível à infecção por *T. rangeli* (GUHL e VALLEJO, 2003).

Atualmente, *R. prolixus* é considerado o importante vetor de *T. rangeli* na América Latina, particularmente na Colômbia, Venezuela e América Central. Outros vetores sinantrópicos importantes são *R. pallescens* (Panamá) e *R. ecuadoriensis* (Equador e Peru). Essas espécies invadem e colonizam esporadicamente ambientes humanos, como acontece com outras espécies como *R. neglectus*, *R. nasutus* e *R. stali* (ABAD-FRANCH et al., 2008). Na Amazônia, populações arborícolas de *R. robustus*, *R. pictipes* e *R. brethesi* invadem esporadicamente, porém, não colonizam domicílios ou ambientes do peridomicílio (COURA et al., 2002; AGUILAR et al., 2007). As demais espécies do gênero *Rhodnius* parecem ter pouco ou nenhum contato com o homem (BARRET, 1991; ABAD-FRANCH et al., 2008).

Tabela 1- Distribuição geográfica do gênero *Rhodnius* e espécies que atuam como vetores naturais de *T. rangeli*.

País	Espécies do gênero <i>Rhodnius</i>												Espécies sem relatos de <i>T. rangeli</i> nas glândulas salivares			
	Espécies reportadas infectadas com <i>T. rangeli</i> nas glândulas salivares															
	<i>R. bre</i> (1)	<i>R. col</i> (2)	<i>R. dal</i> (3)	<i>R. dom</i> (4)	<i>R. ecu</i> (5)	<i>R. nas</i> (6)	<i>R. neg</i> (7)	<i>R. nei</i> (8)	<i>R. pal</i> (9)	<i>R. pic</i> (10)	<i>R. pro</i> (11)	<i>R. rob</i> (12)	<i>R. mil</i> (13)	<i>R. par</i> (14)	<i>R. sta</i> (15)	<i>R. ama</i> (16)
México											*					
Guatemala											*					
Honduras											*					
El Salvador											*					
Nicarágua											*					
Costa Rica											*					
Panamá									*		*					
Colômbia		*	*					*	*	*	*	*				
Equador					*					*	*	*				
Peru					*					*		*				
Bolívia				*						*	*	*			•	
Brasil	*					*	*			*	*	*	•	•	•	•
G. Francesa										*	*	*				•
Suriname										*	*					
Guiana										*	*			•		
Venezuela								*		*	*	*				
Trindade										*						

(1) *R.bre*: *Rhodnius brethesi* (VARGAS et al., 2000); (2) *R.col*: *Rhodnius colombiensis* (VALLEJO et al., 2002); (3) *R.dal*: *Rhodnius dalessandroi* (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA,1999); (4) *R.dom*: *Rhodnius domesticus* (MACHADO et al., 2001); (5) *R.ecu*: *Rhodnius ecuadoriensis* (CUBA-CUBA,1975); (6) *R.neg*: *Rhodnius neglectus* (MACHADO et al., 2001); (7) *R.nas*: *Rhodnius nasutus* (MACHADO et al., 2001); (8) *R.nei*: *Rhodnius neivai* (D'ALESSANDRO e HINCAPIÉ,1986; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA,1999); (9) *R.pal*: *Rhodnius pallescens* (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA,1999); (10) *R.pic*: *Rhodnius pictipes* (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA,1999); (11) *R.pro*: *Rhodnius prolixus* (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA,1999); (12) *R.rob*: *Rhodnius robustus* (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA,1999); (13) *R.mil*: *Rhodnius milesi* (GALVÃO et al., 2003); (14) *R.par*: *Rhodnius paraensis* (GALVÃO et al., 2003; ABAD-FRANCH et al., 2008); (15) *R.sta*: *Rhodnius stali* (GALVÃO et al., 2003; ABAD-FRANCH et al., 2008); (16) *R.ama*: *Rhodnius amazonicus* (GALVÃO et al., 2003).

FONTE: Adaptada de GUHL e VALLEJO, 2003.

Estudos evolutivos do gênero *Rhodnius* revelaram três linhagens principais: O “Complexo *Prolixus*” constituído por *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus* e *R. domesticus* e *R. neivai*; o “Complexo *Pallescens*” composto por *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis* e o “Complexo *Brethesi*” formado pelas espécies *R. brethesi*, *R. pictipes*, *R. amazonicus* e *R. stali* (SCHOFIELD e DUJARDIN, 1999; DUJARDIN et al., 1999; HYPSE et al., 2002; MONTEIRO et al., 2000, 2003; DE PAULA et al., 2007). Um estudo filogenético recente, baseado em análises do gene mitocondrial citocromo b (*cytb*) revelou que a estrutura populacional e história evolutiva das espécies do gênero *Rhodnius* é muito mais complexa. Foram descritas duas linhagens principais que parecem estar relacionadas, em grande parte, com eventos geológicos na América Latina e, como consequência, com a distribuição geográfica e ecológica destes organismos (ABAD-FRANCH et al., 2008). A linhagem *Trans-Andina*, que compreende espécies encontradas a oeste da cordilheira dos Andes, reúne espécies geneticamente mais homogêneas como *R. pallescens*, *R. colombiensis*, *R.*

ecuadoriensis e, provavelmente, uma nova espécie semelhante a *R. pictipes* encontrada ao norte da Colômbia na Serra Nevada de Santa Marta. A linhagem *Cis-Andina*, referente às espécies encontradas ao leste da cordilheira dos Andes, agrupou o restante das espécies de *Rhodnius* conhecidas, as quais apresentam uma distribuição geográfica mais ampla e uma variabilidade genética maior (Figura 4). Desta maneira, subclados bem definidos de espécies muito relacionadas foram observados, assim foi sugerido que um ancestral comum deu origem às espécies *R. amazonicus*, *R. paraensis*, *R. brethesi*, *R. pictipes* e *R. stali*, as quais se mostraram muito próximas. De maneira semelhante, um relacionamento estreito foi observado entre as espécies *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus* (que é um complexo de 5 subpopulações - *R. robustus* I, II, III, IV e V) (MONTEIRO et al., 2003; ABAD-FRANCH et al., 2008). A onde *R. prolixus*, *R. neglectus* e *R. robustus* I e V, são mais relacionados entre si e são encontrados fora da região amazônica, ao norte da América do Sul e no centro oeste do Brasil. Enquanto um subgrupo menor constituído apenas por *R. robustus* II é encontrado entre a Bolívia e o centro oeste do Brasil. Outro subgrupo é composto por *R. robustus* III e IV sendo localizado entre a Amazônia brasileira e o sudeste das Guianas. Espécies menos relacionadas, porém consideradas do grupo -*R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. robustus*- parecem ser endêmicas de algumas regiões: assim *R. domesticus* pode ser observado na floresta Atlântica do Brasil; *R. neivai* na bacia de Maracaibo na Venezuela; *R. sp* semelhante a *R. robustus* no contraforte andino e *R. nasutus* na Caatinga do Brasil (ABAD-FRANCH et al., 2008).

Figura 4- Algumas espécies de *Rhodnius* vetores naturais de *T.rangeli* e sua disposição atual em complexos evolutivos.

1.8 INTERAÇÃO E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE *T. rangeli* COM ESPÉCIES DO GÊNERO *Rhodnius*

Apesar da susceptibilidade geral das espécies do gênero *Rhodnius* à infecção por *T. rangeli*, é bem conhecida a existência de um comportamento diferencial entre isolados desse parasita e as diversas espécies de *Rhodnius* (SOUSA e DAWSON, 1976; D'ALESSANDRO, 1976; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992, 1999; CUBA-CUBA, 1998; MACHADO et al., 2001; VALLEJO et al., 2002, 2003, 2007; URREA et al., 2005). Isolados de *T. rangeli* da Colômbia e Costa Rica obtidos de glândulas salivares de *R. prolixus* não se desenvolvem em *R. pallescens*, *R. colombiensis* ou *R. ecuadoriensis*. Por outro lado, *R. prolixus* e *R. neglectus* não apresentam invasão das glândulas salivares quando infectados experimentalmente com isolados de *R. pallescens*. Da mesma forma, isolados de *R. pallescens* e *R. colombiensis* não se desenvolvem nas glândulas salivares de *R. prolixus* e *R. neglectus* (SOUSA e DAWSON, 1976; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992, 1999; GUHL e VALLEJO, 2003).

Essas observações de restrição de isolados de *T. rangeli* em vetores de espécies distintas deram origem a propostas de que populações de *T. rangeli* estavam associadas a seus respectivos vetores, sendo o desenvolvimento completo com a transmissão inoculativa restritos a espécies dos locais onde os isolados foram obtidos (VALLEJO et al., 2002, 2003, 2007; URREA et al., 2005).

Análises filogenéticas baseadas em padrões de RAPD e em seqüências do gene ribossômico (SSU e ITS) demonstraram que isolados de *T. rangeli* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas podem ser divididos em pelo menos 4 linhagens (A-D) (MAIA DA SILVA et al., 2004a,b). Estudos anteriores baseados em marcadores do gene de mini-exon e em padrões de minicírculos de kDNA haviam revelado os grupos A e C (GRISARD et al., 1999a; VALLEJO et al., 2003; URREA et al., 2005). A comparação de seqüências do gene SL de um grande número de isolados de *T. rangeli* confirmou os 4 anteriormente definidos (MAIA DA SILVA et al., 2007). Em um estudo recente, descrevemos uma nova linhagem de *T. rangeli* E, encontrada em morcegos da região Centro Oeste do Brasil (MAIA DA SILVA et al., 2009 *In Press*).

Análises filogeográficas comparadas de isolados de *T. rangeli* e de espécies de *Rhodnius* permitiram associar a linhagem A, que é constituída por isolados da Venezuela, Colômbia, Honduras, Guatemala e Brasil (Amazônia), com o complexo *R. prolixus*. A linhagem B contém exclusivamente isolados humanos, de triatomíneos e de macacos da Amazônia brasileira. A linhagem C é formado por isolados de *R. pallescens* da Colômbia e Panamá e isolados humanos da América Central. O isolado SC58 de um roedor da região Sul do Brasil é o único representante da linhagem D (MAIA DA SILVA et

al., 2007). Portanto, *T. rangeli* é composto por linhagens distintas, aparentemente, relacionadas com as espécies de *Rhodnius* (D'ALESSANDRO e SARAVIA, 1999; GUHL e VALLEJO, 2003; VALLEJO et al., 2003; MAIA DA SILVA et al., 2004b, 2007). Enquanto as linhagens de *T. rangeli* não parecem estar associadas com nenhum grupo de vertebrado, as linhagens de *T. cruzi* têm sido associadas com o hospedeiro vertebrado (GAUNT E MILES, 2000; YEO et al., 2005; MARCILI et al., 2009 *In Press*).

A congruência filogeográfica das linhagens de *T. rangeli* com os complexos das espécies de *Rhodnius* corroborou a hipótese de uma longa associação do parasita com seu vetor. A segregação dos isolados de *T. rangeli* de acordo com vetores de distintos complexos sugere que a evolução das linhagens de *T. rangeli* esta relacionada com ciclos de transmissão independentes, associada aos ecótopos específicos de seus vetores (MAIA DA SILVA et al., 2007).

Deste modo, o relacionamento *T. rangeli*-vetor, provavelmente, depende da participação de diversas moléculas que modulam as interações do parasita nos diversos locais onde ele se desenvolve: tubo digestivo, hemolinfa e glândulas salivares. Entretanto, são ainda necessários estudos que permitam identificar moléculas importantes na infecção do vetor. Por outro lado, somente *R. prolixus* e isolados de *T. rangeli* da Colômbia, que se desenvolvem nessa espécie, constituem o único modelo para o estudo das interações *T. rangeli*-hospedeiro (WHITTEN et al., 2001; AZAMBUJA et al., 2005; AZAMBUJA e GARCIA, 2005; PULIDO et al., 2008; GOMES et al., 2003, 2008).

Como indicado anteriormente diversos estudos têm revelado aspectos celulares e bioquímicos muito particulares do relacionamento de *T. rangeli* com seus vetores. No intestino e nas glândulas salivares do inseto existem lectinas que modulam a adesão do parasita, na hemolinfa, *T. rangeli* desencadeia a produção de enzimas e outros fatores tripanolíticos entre outros mecanismos de defesa imune humoral (AZAMBUJA et al., 2005; AZAMBUJA e GARCIA, 2005; PULIDO et al., 2008; GOMES et al., 2008). Entretanto na relação de *T. rangeli* com o vetor pouco é conhecido a cerca dos processos imunológicos que envolvem os radicais livres como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico ($\bullet NO$), os quais também poderiam participar ativamente na interação parasita hospedeiro. O óxido nítrico é um importante radical livre com diversos papéis biológicos. No desenvolvimento de protozoários em vetores, é capaz de limitar a infecção de anofelinos por espécies do gênero *Plasmodium* (DIMOPOULOS et al., 1998; LUCKHART e ROSENBERG, 1999). Outros estudos têm sugerido uma função citotóxica e citostática do $\bullet NO$ contra diferentes parasitas intracelulares como *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* e *Toxoplasma* ou também contra parasitas extracelulares como *Entamoeba* e *Schistosoma* (CLARK e ROCKETT, 1996).

Interessantemente, *R. prolixus* com glândulas salivares infectadas por *T. rangeli* apresentam níveis significativamente reduzidos de $\bullet NO$ e de outras espécies reativas do nitrogênio (AZAMBUJA et

al., 2005). Por outro lado, um estudo da resposta imune de *R. prolixus* seguida da infecção com duas cepas de *T. rangeli* (H14 e Choachí) demonstrou que o isolado H14 não se multiplica nem invade as glândulas salivares desse inseto, estimulando altos níveis de íons superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e $\bullet NO$. Por outro lado, níveis baixos de radicais livres foram observados durante a infecção com o isolado Choachí, que se multiplicou na hemolinfa e invadiu as glândulas salivares do *R. prolixus* com a formação das formas metacíclicas (WHITTEN et al., 2001, 2007). Evidências têm sugerido que cisteína proteases dos parasitas seriam inibidas pelo $\bullet NO$, e deste modo o efeito parasiticida desse radical poderia ser explicado. Especificamente, doadores de $\bullet NO$ podem inibir a atividade da cruzipaina (Catepsina L-like de *T. cruzi*), da falcipaina (Catepsina L-like de *P. falciparum*) e de cisteína proteases de *Leishmania infantum*, influenciando negativamente na sobrevivência do parasita (COLASANTI, et al., 2001).

1.9 MÉTODOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *T. rangeli*

T. rangeli parasita o homem e diversos animais domésticos e silvestres no Centro e Sul da América. O fato destas duas espécies de tripanossomas serem simpátricas e compartilhar os mesmos vetores e hospedeiros vertebrados tem como consequência o advento de infecções mistas numa frequência considerável. Além do mais, as baixas parasitemias, a ausência de sintomas clínicos nos hospedeiros infectados com *T. rangeli* e a reatividade cruzada com *T. cruzi* em métodos sorológicos de diagnóstico têm sido responsáveis pela subestimação de infecções humanas (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992,1999; VARGAS et al., 2000, VALLEJO et al., 2003).

Levantamentos de *T. rangeli* em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados revelam frequentes infecções mistas dessa espécie com *T. cruzi*, e no caso de animais silvestres, com diversas outras espécies de tripanossomas, muitas vezes como infecções mistas, exigindo o diagnóstico diferencial entre as espécies. Conhecer e comparar as espécies que compartilham hospedeiros, que podem ser filogeneticamente relacionadas, é fundamental para entender a história evolutiva do *T. rangeli* e do gênero *Trypanosoma* em geral.

Diversos parâmetros biológicos, bioquímicos, imunológicos e moleculares têm sido utilizados para identificar e caracterizar os isolados de *T. rangeli* provenientes de diversos vetores triatomíneos, hospedeiros vertebrados e regiões geográficas diferentes, revelando não só diversas diferenças de *T. cruzi*, como também um elevado polimorfismo genético entre os isolados de *T. rangeli* (D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992,1999; STEINDEL et al., 1994; HENRIKSSON et al., 1996; GRISARD et al., 1999a; VALLEJO et al., 2002, 2003, 2007; MAIA DA SILVA et al., 2004a,b, 2007).

1.9.1 Características biológicas

Apesar dos diversos aspectos em comum entre *T. rangeli* e *T. cruzi*, diferenças importantes são observadas nos seus ciclos de vida. Desta maneira foi estabelecido que o status específico de *T. rangeli* deveria ser outorgado apenas aos tripanossomas que apresentaram três particularidades: **1-** morfologia das formas sanguíneas similares as de *T. lewisi*, espécie tipo do subgênero *Herpetosoma*; **2-** ausência de restrição pelos hospedeiros vertebrados e **3-** a capacidade de se desenvolver na hemolinfa e glândulas salivares de vetores do gênero *Rhodnius* e serem transmitidos via inoculativa a um hospedeiro vertebrado (HOARE, 1972; D'ALESSANDRO e GORE-SARAVIA, 1992,1999; GUHL e VALLEJO, 2003).

Entretanto, esses critérios têm se revelado insuficientes. A morfologia das formas sanguíneas não distingue *T. rangeli* de espécies do grupo *T. lewisi*. No tubo digestivo de triatomíneos, distinguir *T. rangeli* de *T. cruzi* não é uma tarefa fácil e muitas vezes as infecções mistas não são detectadas. Além disso, identificações morfológicas exigem pesquisadores muito experientes. Embora, aparentemente, todos os isolados de *T. rangeli* infectem camundongos, as parasitemias são muito baixas e mesmo após hemoculturas os resultados podem ser negativos. A infecção de triatomíneos depende do isolado de *T. rangeli* e da espécie de *Rhodnius* utilizada, e a infecção das glândulas salivares ocorre em apenas parte dos insetos infectados. A necessidade de colônias de diferentes espécies de *Rhodnius* impede que esse critério seja utilizado com frequência. O hospedeiro mamífero de origem não pode ser utilizado como um parâmetro na identificação de *T. rangeli* porque essa espécie infecta mamíferos de diversas espécies, que também são hospedeiros de *T. cruzi* e de outros tripanossomas (MAIA DA SILVA et al., 2004a,b, 2009 *In Press*).

1.9.2 Características bioquímicas e imunológicas de *T. rangeli*

Vários métodos bioquímicos e imunológicos foram desenvolvidos a fim de identificar e caracterizar *T. rangeli*. Esses métodos foram os primeiros empregados no diagnóstico diferencial dessa espécie e *T. cruzi*. Dentre eles, podemos citar:

1.9.2.1 Sensibilidade à lise mediada por complemento

Diferentemente dos epimastigotas de *T. cruzi* obtidos em cultura, os epimastigotas de *T. rangeli* são resistentes à lise do complemento pela via alternativa. Esta diferença na suscetibilidade foi utilizada

para diferenciar essas espécies em cultura ou diretamente do intestino de insetos vetores infectados (SCHOTTELIUS e MULLER, 1984; SCHOTTELIUS et al., 1986; MARINKELLE et al., 1985).

1.9.2.2 Caracterização de glicoconjugados de superfície utilizando lectinas

Vários pesquisadores demonstraram que glicoconjugados de superfície de *T.rangeli* e *T.cruzi* são reconhecidos por diversas lectinas com a presença em comum de manose e glicose na superfície de epimastigotas dessas espécies (SCHOTTELIUS e MULLER, 1984; SCHOTTELIUS et al., 1986; MARINKELLE et al., 1986; SCHOTTELIUS, 1989; MIRANDA-SANTOS e PEREIRA, 1984). A reatividade diferencial com lectinas permitiu separar *T. rangeli* de *T. cruzi* e *T. conorhini* devido à aglutinação de epimastigotas de *T. rangeli* apenas com lectinas específicas para D-mannose (*Canavalia ensiformis* e *Pisum sativum*) (SCHOTTELIUS e MULLER, 1984). Além disso, estudos posteriores utilizaram lectinas marcadas com isotiocianato de fluoresceína (WGA, Con A, PNA, HPA, e TPA) para analisar resíduos de carboidratos na superfície das glândulas salivares de *R. prolixus* e a interação dessas moléculas com *T. rangeli* durante a infecção do triatomíneo. Os resultados revelaram que as glândulas salivares de *R. prolixus*, são ricas em carboidratos estando presentes na lamina basal, músculo e epitélio desses órgãos. No entanto o bloqueio de resíduos específicos (tanto das glândulas do triatomíneo quanto da superfície do parasita) possui um efeito inibitório da adesão e/ou invasão de *T.rangeli* às glândulas do vetor (BASSERI et al., 2002).

1.9.2.3 Atividade de neuraminidase e trans-sialidase

Epimastigotas de cultura de *T.rangeli* produzem a enzima neuraminidase em quantidades facilmente detectáveis quando comparados com *T. cruzi*. Essa enzima foi considerada um importante marcador na diferenciação dessas duas espécies (PEREIRA e MOSS, 1985). Um ensaio fluorescente foi padronizado para detecção de Neuraminidase e diferenciação de *T. cruzi* e *T. rangeli* (SCHOTTELIUS, 1987). Estudos baseados nessa técnica foram realizados a fim de detectar atividade neuraminidase de *T. rangeli* em *R. prolixus* experimentalmente infectados, durante os procedimentos não foi detectada a atividade neuraminidase nos insetos infectados, sugerindo que essa enzima não é produzida *in vivo* ou que foi produzida em quantidades não detectáveis pelos métodos utilizados (VALLEJO e MARINKELLE, 1992; GUHL e VALLEJO, 2003).

Tripomastigotas de *T. cruzi* e diferentes estágios morfológicos de diversas espécies de tripanossomas apresentam na superfície celular, glicoconjugados terminados em ácido siálico. No entanto alguns tripanossomas não sintetizam ácido siálico e sim enzimas sialidases. As sialidases são enzimas hidrolíticas que catalisam a remoção de ácido siálico presente nos glicoconjugados da superfície celular das células hospedeiras, enquanto enzimas trans-sialidases são responsáveis pelo transporte do ácido siálico à superfície celular dos tripanossomas (SMITH et al., 1996).

A expressão da atividade trans-sialidase e sialidase de tripanossomas foi explorada como um potencial marcador para discriminar entre flagelados morfológicamente indistinguíveis isolados de humanos, insetos e hospedeiros vertebrados. As diferenças observadas nas taxas de atividade destas enzimas revelaram vários tipos de expressão, assim *T. cruzi* expressa predominantemente atividade de trans-sialidase (TS) enquanto *T. rangeli*, expressa exclusivamente atividade de sialidase (AS), permitindo a diferenciação destes parasitas (PONTES DE CARVALHO et al., 1993; MEDINA-ACOSTA et al., 1994; ENGSTER et al., 1995).

Genes que codificam as enzimas sialidases de *T. rangeli* e trans-sialidases de *T. cruzi* têm uma identidade total nos domínios catalíticos de 68.9% (BUSCHIAZZO et al., 1997). Uma comparação das estruturas de ambas as enzimas revelou que o domínio catalítico é altamente conservado, onde diferenças estruturais sutis ocasionam enormes diferenças na atividade enzimática e nas propriedades de inibição (AMAYA et al., 2003). Entretanto, em um estudo recente, de um total de 33 isolados de *T. rangeli* encontrados em infecções naturais em humanos do Panamá e outras áreas endêmicas das Américas Central e do Sul mostraram resultados negativos para a atividade de SA em 6 isolados de regiões distintas: Panamá (4), Honduras (1) e Brasil (1). Análises de *Immunoblotting* confirmaram a presença de antígenos SA em isolados sem atividade enzimática. Estes achados devem ser considerados na interpretação da significância biológica de SA de *T. rangeli* e na identificação deste parasita (SOUSA et al., 2005).

1.9.2.4 Caracterização antigênica e reatividade cruzada com *T. cruzi*

Aparentemente, *T. rangeli* e *T. cruzi* compartilham pelo menos 60% dos seus antígenos o que acaba acarretando significativa reatividade cruzada entre essas espécies quando métodos sorológicos convencionais são empregados para o diagnóstico da Doença de Chagas (AFCHAIN et al., 1979; GUHL e MARINKELLE, 1982; GROGL e KUHN, 1984; BASSO et al., 1989; O'DALY et al., 1994).

Análises baseadas na técnica de *immunoblotting* utilizando anticorpos policlonais, revelaram

índices de similaridade antigênica equiparáveis quando anticorpos anti-*T.cruzi* e anti-*T.rangeli* foram confrontados com antígenos de *T.rangeli* e *T.cruzi* respectivamente. Além disso, ensaios com anticorpos específicos para *T.rangeli* confirmaram a presença de um antígeno de 43kDa que foi utilizado como marcador específico deste parasita (SALDAÑA e SOUSA, 1996).

Diversos testes por imunohemaglutinação (IHA), imunofluorescência indireta (IF) e ELISA foram realizados para analisar o soro de crianças panamenhas procedentes de áreas endêmicas para *T. cruzi* e *T. rangeli*. Os resultados indicaram que os soros da população estudada, tiveram uma maior imunoreatividade com preparações que continham antígenos de *T. rangeli*, sugerindo que este parasita é um problema no diagnóstico apropriado da doença de Chagas (VASQUEZ et al., 1997).

Entretanto, um teste de ELISA usando antígenos isolados de uma biblioteca genômica de expressão de *T. cruzi*, revelou que um soro hiperimune de coelho contra *T. rangeli* foi incapaz de reconhecer seqüências repetitivas de peptídeos SAPA (Shed Acute Phase Antigen), porém reconheceu outros antígenos sintéticos de *T. cruzi* (SALDAÑA et al., 1995).

Estudos recentes desenvolveram técnicas imunológicas (TESA-blot, *T. cruzi* excreted-secreted antigens) mais específicas, eliminando a reatividade cruzada com *T. rangeli* (UMEZAWA et al., 1996; SILVEIRA-LACERDA et al., 2004; CABALLERO et al., 2007). Entretanto, esses métodos são específicos para *T. cruzi*, e não detectam as infecções causadas por *T. rangeli*. Até o momento, não existem métodos sorológicos específicos e sensíveis para o diagnóstico de *T. rangeli*.

A expressão de antígenos comuns a essas duas espécies tem sido associada à proteção induzida em animais infectados com *T. rangeli* quando desafiados com *T. cruzi* (PALAU et al., 2003; BASSO et al., 2007, 2008). Além disso, existem evidências de uma aparente diminuição da severidade da Doença de Chagas quando ocorre na presença de *T. rangeli* (GUHL et al., 1985; HUDSON et al., 1988; BASSO et al., 2007, 2008).

1.9.2.5 Padrões de isoenzimas (Zimodemas)

Os estudos de isoenzimas de *T. rangeli* foram realizados com o objetivo principal de distinguir essa espécie de *T. cruzi* (ACOSTA et al., 1991; MONTILLA et al., 2002; VASQUES et al., 2004; DE SOUSA et al., 2008). Estudos comparativos revelaram diferentes padrões de zimodemas para isolados de *T. rangeli* de regiões geográficas distintas, enquanto isolados de uma mesma região, em geral, apresentam padrões indistinguíveis ou muito semelhantes. Estudos iniciais evidenciaram perfis específicos para *T. rangeli*, porém pouca variabilidade foi observada entre 14 isolados de *T. rangeli* da

Colômbia e Venezuela comparados por zimodemas (EBERT, 1986). Entretanto, os isolados do Panamá apresentaram padrões isoenzimáticos diferentes dos isolados encontrados na Colômbia, Venezuela e Brasil (KREUTZER e SOUSA, 1981). Entretanto, uma contribuição significativa na caracterização isoenzimática deste parasita evidenciou que os perfis de 5 enzimas (ALAT, ASAT, GP1, PGM e ME) eram suficientes para determinar variabilidade entre 16 isolados de *T.rangeli*, provenientes de humanos, insetos triatomíneos e animais silvestres de Honduras, Colômbia, Venezuela e Sul do Brasil. Os resultados demonstraram que todos os isolados do sul do Brasil (estado de Santa Catarina) foram idênticos nos perfis isoenzimáticos, enquanto as cepas provenientes de Honduras, Colômbia e Venezuela também formaram um grupo altamente homogêneo. Desta maneira os dois grupos mostraram padrões diferentes para todas as enzimas, exceto para a enzima málica (ME), e foi sugerida a existência de duas populações diferentes de *T.rangeli*, provavelmente decorrentes de especiação geográfica (STEINDEL et al., 1994).

1.9.3 Características moleculares

1.9.3.1 DNA do cinetoplasto (kDNA)

Os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria contendo o cinetoplasto, uma região rica em moléculas de DNA (kDNA) concatenadas em uma única rede composta por moléculas circulares de maxicírculos e minicírculos, que representa ~20-25% do DNA celular total e constitui o DNA mitocondrial dos tripanossomatídeos. Inter-especificamente, os minicírculos dos tripanossomatídeos são extremamente heterogêneos no tamanho e na sequência. Intra-especificamente, estas moléculas diferem na sequência, mas são, geralmente homogêneas em tamanho (STUART, 1983; MYLER, 1993; GUHL e VALLEJO, 2003).

Devido ao grande número de cópias ($\sim 10^4$) e ao polimorfismo entre espécies e isolados, minicírculos de kDNA são excelentes alvos para diagnóstico por PCR e têm sido alvo de métodos altamente sensíveis de diagnóstico de *T. cruzi* (WINCKER et al., 1994; Junqueira et al., 1996, 2005). Métodos de PCR baseados em kDNA têm sido utilizados para o diagnóstico de *T. rangeli* (VALLEJO et al., 1999, 2002; 2003; GUHL et al., 2002).

A maioria das espécies de tripanossomatídeos apresenta minicírculos com o mesmo número de regiões conservadas, que variam de tamanho de acordo com cada espécie. Os isolados de *T. cruzi* das diferentes linhagens apresentam o mesmo tamanho de minicírculos ($\sim 1,2\text{kb}$), apesar do grande

polimorfismo de seqüências entre os isolados, e 4 quatro regiões conservadas que compreendem a origem de replicação dessas moléculas (JUNQUEIRA et al., 2005).

T. rangeli apresenta uma particularidade na organização de seus minicírculos, já que podem ser observadas moléculas com 1, 2 ou 4 regiões conservadas (RECINOS et al., 1994; VALLEJO et al., 1994, 1999; GUHL e VALLEJO, 2003). Duas classes de minicírculos de kDNA, conhecidas como KP1 e KP2, foram seqüenciadas e os resultados evidenciaram diferenças no tamanho e organização molecular: KP2 contém dois blocos de seqüências conservadas (BSC) de aproximadamente 1587bp enquanto KP1 apresenta apenas um BSC de ~1764 bp. (VALLEJO et al., 1994). Estudos posteriores revelaram outra classe de minicírculo com 4 BSC denominado KP3, presente em todos os isolados de *T. rangeli* analisados (VALLEJO et al., 2002). Esses estudos também indicaram a existência de dimorfismo genético entre os isolados de *T. rangeli* de acordo com as classes de minicírculos presentes em cada um deles. Assim, isolados provenientes de *R. prolixus* apresentaram os minicírculos KP1, KP2 e KP3, enquanto isolados de *R. colombiensis* e *P. megistus* apresentaram apenas os minicírculos KP2 e KP3 (VALLEJO et al., 2002; GUHL et al., 2002). Os dois grupos, definidos como KP1 (+) e KP1(-), são separados por grande divergência genética, sugerindo que tenham evoluído com diferentes espécies de *Rhodnius*. Os dados obtidos em triatomíneos infectados confirmaram que cada espécie *Rhodnius* seleciona uma sub-população de *T. rangeli*, KP1(+) ou KP1(-), que é capaz de se desenvolver nas glândulas salivares e ser transmitida por inoculação (VALLEJO et al., 2002, 2003, 2007; URREA et al., 2005).

Também foi observado que isolados de Honduras, Venezuela e alguns isolados da Colômbia apresentam minicírculos KP1, KP2 e KP3, e que outros isolados da Colômbia e Panamá só apresentam KP2 e KP3. Com base nesse polimorfismo, foi recusada a hipótese de especiação geográfica e foi sugerido que as populações de *T. rangeli* KP1(+) e KP1(-) são decorrentes de especiação clonal de modo que, populações diferentes do parasita co-evoluem com espécies diferentes de *Rhodnius* (GUHL et al., 2002; VALLEJO et al., 2002, 2003, 2007; URREA et al., 2005). Nestes estudos foi explorada a heterogeneidade no número de origens de replicação que foram alvos de genotipagem de *T. rangeli* por PCR e desta forma a análise dos padrões de kDNA foi realizada através de um PCR multiplex que utiliza os primers S35, S36 e KP1L (VALLEJO et al., 2002, 2003, 2007; GUHL et al., 2002; URREA et al., 2005).

Estudos recentes caracterizaram isolados de *T. rangeli* do sudeste do Brasil (Minas Gerais) e foram comparados com as populações colombianas através da classificação por kDNA, RAPD-PCR e LSSP-PCR. Os resultados demonstraram que as populações do sudeste do Brasil são bastante homogêneas segundo os três métodos empregados, as quais foram classificadas como KP1(+) uma

vez que apresentaram as três classes de minicírculos. Em contraste os isolados colombianos se mostraram mais heterogêneos evidenciando a presença das duas populações KP1(+) e KP1(-). Os padrões obtidos por RAPD-PCR foram totalmente consistentes com as populações definidas por kDNA, entretanto os padrões obtidos por LSSP-PCR não foram completamente, mas significativamente associados com as duas populações de *T.rangeli* (MARQUEZ et al., 2007).

1.9.3.2 Padrões de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPDs)

A técnica de RAPD baseia-se na amplificação de fragmentos de seqüências polimórficas de DNA utilizando-se primers de 8-10 nucleotídeos escolhidos arbitrariamente. Esta metodologia revela polimorfismo genético entre organismos muito próximos filogeneticamente, sendo utilizada para inferir relacionamentos genéticos entre espécies de tripanossomas africanos (LUN et al., 2004), entre isolados de *T. cruzi* (BRISSE et al., 2000; MARCILI et al., 2009 *In Press*), de *T. theileri* (RODRIGUES et al., 2003) e linhagens de *T. rangeli* (STEINDEL et al., 1994; MAIA DA SILVA et al., 2004a).

Uma caracterização inicial de isolados de *T. rangeli* realizada com o método de RAPD revelou dois grupos de isolados de *T. rangeli*: isolados do Sul do Brasil (Santa Catarina) formaram um grupo separado do constituído por isolados de Honduras, Colômbia e Venezuela, confirmando a existência de populações de *T. rangeli* relacionados com a origem geográfica (STEINDEL et al., 1994).

Uma análise posterior do polimorfismo de padrões de RAPD de 14 isolados de *T. rangeli* de mamíferos silvestres e 2 isolados humanos da Amazônia brasileira, revelou que a maioria dos isolados da Amazônia (12 em total) foram diferentes dos isolados de outras regiões geográficas, constituindo um novo grupo de *T. rangeli*. Quatro isolados brasileiros agruparam com isolados da Colômbia e Venezuela. Os isolados do Panamá e El Salvador formaram outro grupo. Um fragmento de DNA amplificado por RAPD exclusivo de *T. rangeli* foi utilizado para desenvolver um PCR capaz de detectar todos os grupos dessa espécie (MAIA DA SILVA et al., 2004a).

Estudos mais recentes analisaram dezenove isolados de *T. rangeli* de *R. prolixus*, *R. pallescens* e *R. colombiensis* da Colômbia, *R. ecuadoriensis* do Peru e *R. pallescens* do Panamá os quais foram comparados por análises RAPD, que geraram dois grupos correspondentes a KP1(+) e KP1(-), de acordo com as espécies de *Rhodnius* de onde foram isolados (VALLEJO et al., 2007). Os padrões de RAPD de 12 desses isolados foram utilizados para construir um dendrograma que mostrou a segregação de *T. rangeli* em dois ramos. Um composto por isolados de *R. prolixus*, caracterizados como *T. rangeli* KP1(+), e outro por 9 isolados de glândulas salivares de triatomíneos do grupo

“pallescens”, *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuadoriensis*, caracterizadas como *T. rangeli* KP1(-), com 3 ramos que correspondem a cada uma das espécies de triatomíneos VALLEJO et al., 2007). Estes dados sugerem uma estreita associação entre isolados de *T. rangeli* e espécies de *Rhodnius*, como demonstrado em estudos baseados em RAPD e seqüências dos genes ribossômico e de SL (MAIA DA SILVA et al., 2004a,b; 2007).

A caracterização de isolados de *T. rangeli* de Minas Gerais, sudeste do Brasil, e sua comparação com populações colombianas revelaram uma população homogênea que circula entre gambás (*Didelphis albiventris*) no Brasil, enquanto populações heterogêneas circulam em diferentes regiões da Colômbia. Os padrões de RAPD foram consistentes com a distribuição de minicírculos KP1 (+) e KP1(-) (MARQUES et al., 2007).

1.9.3.3 Gene de Mini-exon ou “spliced leader”

Os genes de mini-exon ou “spliced leader” (SL) participam do mecanismo pós-traducional denominado “trans-splicing”. Através deste mecanismo o mRNA é processado, resultando na adição de seqüências de 39 nucleotídeos, denominadas “spliced-leader” ou mini-exon, na extremidade 5’ de todos os mRNAs maduros dos Kinetoplastida (AGABIAN, 1990). Esse gene tem sido utilizado para diagnóstico e em estudos taxonômicos de tripanossomatídeos devido ao número de cópias e a seqüências com diferentes graus de conservação. As unidades de repetição do gene SL são constituídas por um exon de 39 nucleotídeos, altamente conservado; um intron de 50-100 nucleotídeos, moderadamente conservado e uma região intergênica espaçadora que apresenta variações em tamanho e seqüência entre espécies e isolados de tripanossomatídeos (AGABIAN, 1990; GIBSON et al., 2000; VENTURA et al., 2001; MAIA DA SILVA et al., 2007).

Isolados de *T. rangeli* de diferentes regiões geográficas foram comparados com marcadores de gene de mini-exon utilizando o método de LSSP-PCR, que detectou um dimorfismo nas seqüências dos genes de mini-exon de diferentes isolados, separando o isolado SC-58 do sul do Brasil dos isolados da América Central e do norte da América do Sul (GRISARD et al., 1999a). O dimorfismo observado foi confirmado com análise de outros isolados e mostrou uma paridade exata com as análises de kDNA (VALLEJO et al., 2003). A caracterização de isolados de *T. rangeli* de *R. ecuadoriensis* (Peru), *R. colombiensis*, *R. pallescens* e *R. prolixus* (Colômbia) e *R. pallescens* (Panamá) confirmaram o dimorfismo no gene de mini-exon e sua paridade com o dimorfismo de seqüências de kDNA. Todos os isolados de *R. prolixus* (KP1, KP2 e KP3) apresentaram um fragmento

de DNA de mini-exon de 340 pb. Os demais isolados (KP2 e KP3) geraram banda de mini-exon de 380 bp. (URREA et al., 2005). O polimorfismo de seqüências do gene mini-exon de isolados de *T. rangeli* foi comparado com o de seqüências SSUrRNA. Análises filogenéticas revelaram quatro linhagens, que se sobrepõem à distribuição das espécies de *Rhodnius*, consistentes com a associação com vetores simpátricos (MAIA DA SILVA et al., 2007).

Um ensaio de PCR baseado no gene de mini-exon foi desenvolvido para detectar especificamente *T. rangeli* (GRISARD et al., 1999a). Um PCR multiplex baseado nesse gene permite distinguir as principais linhagens de *T. cruzi* e detectar *T. rangeli* (FERNANDES et al., 2001). Baseado em seqüências da região intergênica do gene SL foi desenvolvido um PCR para simultaneamente identificar e genotipar linhagens de *T. rangeli* em estudos epidemiológicos (MAIA DA SILVA et al., 2007).

1.9.3.4 Gene ribossômico – rDNA

Os genes nucleares de rDNA dos tripanossomatídeos possuem uma estrutura característica, com um padrão complexo de moléculas maduras de RNA: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior). As regiões transcritas não conservadas correspondem aos espaçadores transcritos internos (ITS) e externo (ETS). As unidades de transcrição dos genes ribossômicos são alternadas por um espaçador intergênico (IGS) e se repetem em tandem mais de 100 vezes no genoma desses organismos. Esses genes têm sido os mais empregados para diagnóstico, genotipagem e análises filogenéticas de tripanossomatídeos devido à presença de regiões com diferentes graus de variabilidade. Seqüências SSU rDNA têm sido extremamente úteis para inferir relações filogenéticas entre tripanossomatídeos de praticamente todos os gêneros, inclusive *T. rangeli* (STEVENS et al., 1999a,b; MAIA DA SILVA et al., 2004b).

Reações de PCR baseadas no polimorfismo de seqüências de LSU e SSU rDNA foram utilizadas na identificação e genotipagem de linhagens de *T. cruzi* (SOUTO et al., 1996; BRISSE et al., 2001). O polimorfismo de seqüências da região polimórfica V7-V8 do gene SSU rDNA revelou uma significativa diversidade intra-específica em *T. rangeli*, revelando um polimorfismo que separou os isolados em 4 grupos bem definidos denominados *Linhagens A, B, C e D* (MAIA DA SILVA et al., 2004b). Seqüências desses genes também se revelaram úteis na discriminação de linhagens de *T. cruzi* (MARCILI et al., 2009 *In Press*).

Análises de sítios de restrição do ITS rDNA amplificado por PCR revelaram variabilidade inter e

intra-específica em *T. cruzi* (MENDONÇA et al., 2002), *T. rangeli* (MAIA DA SILVA et al., 2004b; BELTRAME-BOTELHO et al., 2005) e outras espécies de tripanossomas (DESQUENES et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006; CORTEZ et al., 2006). A utilização de seqüências de ITS rDNA para inferências filogenéticas revelou que os isolados de *T. rangeli* podem ser distribuídos em 5 linhagens (MAIA DA SILVA et al., 2004b; 2009 *In Press*).

1.9.3.5 Seqüências nucleares repetitivas:

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande quantidade de seqüências repetitivas em seus genomas. As seqüências repetitivas apresentam diferentes tamanhos e geralmente não são codificadoras. Diferente de isolados de *T. cruzi*, que vem sendo amplamente analisados por polimorfismo de loci de microssátelites (MACEDO et al., 2001; DE FREITAS et al., 2006), essa abordagem ainda não foi utilizada para o estudo de populações de *T. rangeli* devido à escassez de seqüências disponíveis dessa espécie. Entretanto, polimorfismo de microssátelites foi detectado na região intergênica do gene SL de isolados de *T. rangeli* (GRISARD et al., 1999a; MAIA DA SILVA et al., 2007).

Análise de polimorfismo de minissátelites foi empregada no estudo de isolados de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Os perfís de bandas múltiplas obtidos permitiram diferenciar as duas espécies e revelaram um grande polimorfismo entre os isolados de *T. rangeli*, sugerindo a existência de dois grupos principais: um constituído por isolados da América Central e norte da América do Sul e outro por isolados do sul do Brasil (MACEDO et al., 1993).

Em contraste ao observado para *T. cruzi*, poucas seqüências de DNA nuclear repetitivo têm sido caracterizados em *T. rangeli*. A seqüência repetitiva P542, com 10³ cópias por genoma haplóide distribuídas em diversos cromossomos, foi empregada como alvo no desenvolvimento de um método diagnóstico para *T. rangeli*, permitindo a detecção de *T. rangeli* no intestino de vetores naturalmente infectados, inclusive em infecções mistas com *T. cruzi* (VARGAS et al., 2000).

1.9.3.6 Genes de Histona H2A

Diferentes espécies de tripanossomatídeos apresentam histonas distintas (PUERTA et al., 1994; GARCIA-SALCEDO et al., 1994). O gene de Histona 2 (*H2A*) de *T. rangeli* (isolado colombiano)

está organizado “in tandem” e localizado em cromossomos de ~1.9 Mb (PUERTA et al., 2000; CUERVO et al., 2006). Genes codificadores de *H2A* de isolados de *T. rangeli* KP1(+) e KP1(-) permitem diferenciar esses dois grupo, apesar de 99.5% e 95% de identidade entre regiões codificadoras e não-codificadoras respectivamente. Diferenças na região intergênica também foram alvos de LSSP-PCR para diferenciar isolados KP1(+) e KP1(-) (CUERVO et al., 2006) e estudos posteriores confirmaram o dimorfismo do gene *H2A* entre isolados de *T. rangeli*, concordando com a variabilidade observada por kDNA e gene de mini-exon (SUAREZ et al., 2007). Seqüências do gene *H2A* foram empregadas para distinguir *T. cruzi* e *T. rangeli* em triatomíneos (PAVIA et al., 2007).

1.9.3.7 Cariotipagem

A análise do cariótipo de tripanossomatídeos, por padrões de cromossomos separados por eletroforese de campo pulsado (PFGE), tem sido empregada na análise de diversidade e relacionamento genético entre espécies, subespécies e isolados. Análises por PFGE, de cariótipos de isolados de *T. rangeli* revelaram diferenças no tamanho das bandas cromossômicas de diversos isolados do Panamá, El Salvador, Honduras e Colômbia. Deste modo os cromossomos foram divididos em dois grupos, um de tamanho intermediário com várias bandas entre 350 e 1.500 kbp, e outro constituído por cromossomos maiores de ~3.2 Mbp ou acima de 5.7 Mbp. Apesar do padrão geral de cariótipo mais parecido com o de *T. brucei* do que de *T. cruzi*, mini-cromossomos em *T. rangeli* não foram observados (HENRIKSSON et al., 1996). Um acentuado polimorfismo cromossômico, com padrões geralmente isolado-específicos foi observado entre isolados de El Salvador, Honduras, Venezuela, Colômbia, Panamá e Brasil (TANAKA et al., 1994; MARTINEZ et al., 1995; HENRIKSSON et al., 1996). Nesses estudos foram incluídos isolados que segundo as análises de polimorfismo das seqüências de SSU e SL pertencem as *Linhagens* A e C (MAIA DA SILVA et al., 2004b; 2007).

A localização cromossômica dos genes de β -tubulina, cisteíno protease, proteínas de choque térmico (HSP70) e actina de *T. rangeli* de El Salvador, Honduras, Venezuela, Colômbia, Panamá e Sul do Brasil, revelou um extenso polimorfismo entre isolados do Brasil e das Américas Central e do Norte da América do Sul (TOALDO et al., 2001). Entretanto genes codificadores de histona *H2A* também foram localizados em diferentes cromossomos de isolados de *T. rangeli*, mas a localização cromossômica de genes *H2A* permitiu separar isolados KP1 (+) e KP1 (-) (CUERVO et al., 2006).

1.10 CISTEÍNO PROTEASES

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de macromoléculas protéicas degradando-as ou então produzindo peptídeos menores. Essas enzimas têm sido identificadas em diversos sistemas biológicos que compreendem desde vírus até vertebrados. Com o avanço dos projetos de sequenciamento de genomas foi demonstrado que as proteases constituem ~2% dos genes expressos, com pequenas variações entre organismos. As proteases podem variar desde monômeros de 10kDa até complexos multiméricos de várias centenas de kDa (SAJID e MCKERROW, 2002; MOTTRAM et al., 2003; VERMELHO et al., 2007; RUDENSKAYA e PUPOV, 2008)

As cisteíno proteases estão envolvidas em uma variedade de funções nos ciclos de vida dos protozoários. Além das funções metabólicas e regulatórias as proteases possuem também um papel importante na patogenicidade de doenças parasitárias. Estas moléculas estão envolvidas em papéis fundamentais em doenças humanas como malária, leishmaniose, tripanossomíases, amebíases, toxoplasmose, giardíase, criptosporidiose, teileriose e tricomoniase. Essas proteases facilitam a invasão dos tecidos pelos protozoários, participam da replicação e diferenciação destes organismos, do encistamento e desencistamento, da evasão frente à resposta imune do hospedeiro (KLEMBA e GOLDBERG, 2002; SAJID e MCKERROW, 2002; MCKERROW et al., 2006; RUDENSKAYA e PUPOV, 2008). Diferentes tipos de proteases são freqüentemente expressas em diferentes estágios do ciclo de vida dos parasitas, sendo a expressão estágio-regulada. As cisteíno proteases desses parasitas são excepcionalmente imunogênicas, sendo muito exploradas como alvos para vacinas e desenvolvimento de medicamentos (MCKERROW et al., 1999; SELZER et al., 1999; SAJID e MCKERROW, 2002; VERMELHO et al., 2007; DOYLE et al., 2007; LÜSCHER et al., 2007; JAISHANKAR et al., 2008).

As proteases são geralmente sintetizadas como proformas, que posteriormente são processadas para dar origem às formas maduras ou enzimaticamente ativas. De acordo com tipo de reação catalisada, as proteases podem ser subdivididas em: a) exopeptidases, que clivam as ligações peptídicas próximas das porções amino ou carboxi-terminal, sendo classificadas como aminopetidase ou carboxipeptidase respectivamente; ou b) endopeptidases, que clivam ligações peptídicas na região interna da cadeia polipeptídica e se dividem em 4 grupos principais de acordo com o sítio catalítico: serino-proteases; aspártico-proteases; metalo-proteases e cisteíno-proteases (KLEMBA e GOLDBERG, 2002; SAJID e MCKERROW, 2002; VERMELHO et al., 2007; PAGE e DI CERA, 2008).

A atividade das cisteíno-proteases (CP) envolve resíduos de cisteína e histidina e, dependendo da ordem dos resíduos envolvidas na atividade catalítica, são classificadas em diversos clans, sendo

os principais os clans CA (Cys-His) e CD (His-Cys). No entanto, clãs minoritários também têm sido reportados em parasitas (CE, CF, CH, CJ, CK, CX, PAC e PAB) como também em vírus (CC e CB) (MOTTRAM et al., 2003; RUDENSKAYA e PUPOV, 2008).

O Clã CD está representado por um número menor de proteases do que o clã CA e contém proteases que são muito diferentes, tanto nas seqüências dos aminoácidos quanto nas estruturas terciárias, substratos hidrolisados e funções. As proteases do Clã CD apresentam somente dois resíduos catalíticos: Histidina e Cisteína (H-C) (MOTTRAM et al., 2003). Neste clã foram acomodadas as GPI-transamidases, enzimas que catalisam a união de proteínas de superfície celular às ancoras de GPI (glicosilfosfatidilinositol) as quais são particularmente abundantes em protozoários parasitas. GPI-transamidases têm sido identificadas em *P. falciparum* (DELORENZI et al., 2002), em *L. mexicana* (HILLEY et al., 2000) e *T. brucei* (KANG et al., 2002; LILLICO et al., 2003). Mutantes de *T. brucei*, deficientes em GPI-transamidases, foram observados desprovidos da principal proteína de superfície, a prociclina. Esses mutantes mostraram incapacidade para estabelecer infecção no intestino dos vetores, confirmando a importância destas enzimas nas interações parasita-hospedeiro (MOTTRAM et al., 2003). Outras enzimas do Clã CD, as Separases realizam a clivagem catalítica do complexo protéico responsável pela união de cromátides irmãs até a segregação dos cromossomos em pólos opostos durante a mitose. Portanto, separases são essenciais para o funcionamento correto do ciclo celular. Seqüências que codificam estas enzimas têm sido encontradas nas bases de dados dos genomas de *T. brucei*, *L. major*, *Giardia* e *Plasmodium* (MOTTRAM et al., 2003). Caspases são cisteíno proteases do Clã CD que regulam e executam apoptose ou morte celular programada em metazoários. Recentemente, homólogos distantes das caspases, denominados Metacaspases, foram identificados exclusivamente em plantas, fungos e protozoários (UREN et al., 2000). Genes de metacaspases têm sido encontrados nos genomas de diversos tripanossomatídeos patogênicos, como *T. brucei* (MCA1-MCA5), *T. cruzi* (MCA3, MCA5), *Leishmania donovani* (MCA1, MCA2), e *L. major* (MCA5) (SZALLIES et al., 2002; HELMS et al., 2006; KOSEC et al., 2006 a,b; AMBIT et al., 2008; LEE et al., 2007).

Por outro lado o Clã CA reúne a maioria das CPs descritas, que apresentam como resíduos catalíticos Cisteína, Histidina e Asparagina e, em alguns casos, Ácido Aspártico (C-H-N/D) (MOTTRAM et al., 2003). Esse clã agrupa as catepsinas B, C, K, L e S dos mamíferos e seus equivalentes em outros organismos, inclusive protozoários (catepsinas-like). As proteases do Clã CA estão divididas em famílias de proteínas bioquimicamente similares, com unidades peptídicas conservadas e evolutivamente relacionadas. A Papaína é o protótipo deste grupo, sendo a primeira CP descrita e as diversas proteases com seqüências, estruturas e atividades similares à Papaína são denominadas "Papain-like" (SAJID e MCKERROW, 2002; MOTTRAM et al., 2003; RAWLINGS, 2007).

A maioria das cisteíno proteases dos protozoários pertence ao clã CA e às famílias das papaínas (C1) e calpaínas (C2). Importantes enzimas “papaína-like” dos parasitas, como as Catepsinas B e Catepsinas L-like (Toxopaina de *T. gondii*, Falcipaina de *P. falciparum*) fazem parte da Família C1. As Calpaínas constituem uma grande família de CP intracelulares dependentes de cálcio. As típicas calpaínas têm sido caracterizadas principalmente em mamíferos. Embora o papel biológico destas enzimas não seja muito conhecido, aparentemente estão envolvidas na remodelação do citoesqueleto, transdução de sinais biológicos e diferenciação celular (SATO e KAWASHIMA, 2001). Enzimas Calpaínas-like têm sido encontradas principalmente em invertebrados e eucariotes inferiores, em protozoários parasitas como *Plasmodium*, *T.cruzi*, *T.brucei* e *L.major* já foram identificadas (HERTZ-FOWLER et al., 2001; ERSFELD et al., 2005).

1.11 CATEPSINAS L-LIKE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Diversos estudos mostraram que os tripanossomatídeos expressam CPs em abundância e que essas enzimas são cruciais para um amplo espectro de processos biológicos como: evasão da resposta imune do hospedeiro, diferenciação celular nos vertebrado e nos vetores, invasão de células, morte celular programada, patogenia e virulência (SAJID e MCKERROW, 2002; MCKERROW et al., 2006). Nesses organismos, as CPs responsáveis pelas principais atividades proteolíticas são as Catepsinas L-like (CatL-like), que estão localizadas nos lisossomos e em compartimentos intracelulares sendo, em geral, secretadas pelos parasitas. Essas proteases são inibidas pelo E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucil-amido (4-guanidino) butano) e a especificidade pelo substrato é definida pelo subsítio S₂. Estruturalmente, essas enzimas apresentam 4 domínios principais: pré-domínio (peptídeo sinal), pro- domínio, domínio central ou catalítico e extensão C-terminal. Algumas características são comuns às Catepsinas L: no pro-domínio, a presença de dois motivos conservados (ERFININ-like e GNFD-like); e no domínio central, os resíduos catalíticos Cisteína, Histidina e Asparagina mais um motivo conservado, GCNGG-like (TURK et al., 2000; SAJID e MCKERROW, 2002; RUSZCZYK et al., 2008a,b).

As CatL-like constituem uma família multigênica, uma vez que apresentam múltiplas cópias dispostas em tandem nos genomas. As unidades de repetição contêm uma região intergênica, as regiões codificadoras dos pré- e pró- domínios, o domínio central e uma extensão C-terminal (EAKIN et al., 1992; CAMPETELLA et al., 1992). A porção C-terminal, que sofre auto-hidrólise, não é encontrada em outras CatL, mas é comum a todos os tripanossomatídeos (MOTTRAM et al., 1989; SOUZA et al.,

1992).

As CP mais estudadas dos tripanossomatídeos são as CatL-like A e B (*CPA* e *CPB*) e as CatB-like (*CPC*) de *Leishmania*, as cruzipaínas (CatL-like) de *T. cruzi*, as congopaínas (CatL-like) de *T. congolense* e as tripanopaínas (CatL-like) de *T. brucei*. Diversos estudos têm revelado numerosos eventos nos ciclos de vida complexos e variáveis desses organismos nos quais cisteína proteases estão envolvidas. Enzimas CatL-like apresentam papéis vitais no metabolismo, infectividade e diferenciação celular, contribuindo para a patogenicidade, e também para a modulação da resposta imune (MOTTRAM et al., 1998, 2003; ROSENTHAL, 1999; CAZZULO et al., 2001; SAJID e MCKERROW, 2002; LALMANACH et al., 2002; KLEMBE e GOLDBERG, 2002; KOSEC et al., 2006 a,b; MCKERROW et al., 2006).

1.11.1 Tripanopaínas

Em *T. brucei*, enzimas com atividade de CP foram denominadas Tripanopaínas. A Brucipaína e Rhodesaína são as catepsinas L predominantes de *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense*, respectivamente, com 98,4% de identidade de seqüências de aminoácidos. Genes que codificam CatL em *T. b. brucei* apresentam mais de 20 cópias dispostas em tandem (ROSENTHAL, 1999). Diferentes níveis de atividades de CatL foram observados de acordo com o estágio do parasita, e essas enzimas foram relacionadas com diversos aspectos dos ciclos de vida e patologias: a) diferenciação das formas sanguíneas infectantes para o vetor sugerindo que seja importante na sobrevivência do parasita na mosca tsé-tsé; b) liberação da capa de VSG durante a diferenciação das formas sanguíneas para as formas procíclicas; c) patogenicidade da doença, já que são expressos preferencialmente e secretados pelas formas sanguíneas; d) sobrevivência das formas sanguíneas, já que o uso de inibidores destas enzimas leva estes parasitas à morte; e) facilitação da passagem de *T. b. gambiense* pela barreira da membrana cerebral (PAMER et al., 1991; MCKERROW et al., 1993; OKENU et al., 1999; CAFFREY et al., 2001; NIKOLSKAIA et al., 2006).

1.11.2 Congopaínas

T. congolense apresenta duas isoformas principais de CatL, denominadas congopaínas CP1 e CP2. Estas moléculas são antígenos imunodominantes associados à resposta imune humoral envolvida na tripanotolerância, mas também tem papel na patologia. A atividade desta enzima é maior nas formas tripomastigotas sanguíneas e metacíclicas do que nas procíclicas. Apesar dos domínios

pré-pro de CP1 e CP2 serem idênticos, as porções C-terminal e central apresentam 90% e 86% de similaridade. A estrutura primária das congopainas apresenta identidades de 69% com tripanopaina e de 55% com cruzipaina (AUTHIÉ, 1994; BOULANGÉ et al., 2001; LALMANACH et al., 2002).

Genes, atividades enzimáticas e funções de CPs foram bem estudados em *T. brucei* e *T. congolense*. Entretanto, pouco se sabe sobre as CPs de *T. vivax*, que são diferentes e apresentam menor atividade comparada aos outros tripanossomas africanos (NORTH et al., 1983; LONDSDALE-ECLES e MPIMBAZA, 1986). Em nosso laboratório, seqüenciamos genes de CatL-like de *T. vivax*. As seqüências obtidas se mostraram muito diferentes das de outros tripanossomas, apresentando um grande polimorfismo genético, com clados constituídos por seqüências de diferentes isolados, que podem corresponder a diferentes isoformas. Todas as espécies do subgênero *Trypanozoon* analisadas (*T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. evansi* e *T. equiperdum*) apresentaram grande similaridade de genes de CatL-like, sugerindo a existência de uma isoforma majoritária e uma provável função comum dessas enzimas nestes organismos que são muito relacionados filogeneticamente, embora causem patologias bastante distintas (CORTEZ et al., 2009 *In Press*).

1.11.3 Cruzipainas

T. cruzi expressa cisteíno-protease denominadas cruzipaina (CatL-like) (CAZULLO et al., 2001). Níveis maiores de atividades foram detectados nas formas epimastigotas, já as formas tripomastigotas e amastigotas apresentam níveis 10 vezes menores (CAMPETELLA et al., 1992; TOMÁS e KELLY, 1996). A cruzipaina (isoforma 1) está envolvida na replicação de amastigotas, na diferenciação de tripomastigota para amastigota, na metaciclogênese, na patogenia e nos mecanismos de evasão (BOTEMPI e CAZZULO, 1990; GIORDANENGO et al., 2000; BURLEIGH et al., 2002; APARÍCIO et al., 2004; MCKERROW et al., 2006; COSTALES e ROWLAND, 2007).

Os genes que codificam a cruzipaina são regulados ao longo do desenvolvimento. Os níveis de mRNA são similares em todas as etapas, indicando que a regulação da expressão ocorre em níveis traduçãois ou pós-traduçãois (TOMÁS e KELLY, 1996). Estes genes estão organizados em repetições em tandem, com cerca de 60-100 cópias em mais de um cromossomo (CAMPETELLA et al., 1992; ROSENTHAL, 1999). A isoforma cruzipaina 2, mais expressa em tripomastigotas e amastigotas, difere da cruzipaina 1 na especificidade pelo substrato, nos parâmetros cinéticos, na porção C-terminal e, provavelmente, em modificações pós-traduçãois. O gene que codifica esta enzima apresenta ~6 cópias (LIMA et al., 1994, 2001).

1.11.4 Rangelipaína

A atividade e genes de CP similares a *T. cruzi* foram detectados em *T. rangeli* (TANAKA et al., 1994; MARTÍNEZ et al., 1995). Formas epimastigotas de *T. rangeli* apresentaram CP com peso molecular similar à da cruzipaína, porém, com o nível de mRNA é bastante inferior. Estudos realizados em formas epimastigotas revelaram a presença de uma enzima com peso molecular de 51 kDa, e seqüência homólogas à Cruzipaína, embora com atividade enzimática baixa comparada com a de *T. cruzi* (LABRIOLA e CAZZULO, 1995). Os genes de *CatL* de *T. rangeli* também estão organizados em tandem com unidades de repetição de ~1.9kb, presentes em dois principais arranjos com aparentemente ~75 cópias por genoma, sendo que, a localização cromossômica destes genes variam de acordo com o isolado de *T. rangeli* (MARTINEZ et al., 1995; LABRIOLA e CAZZULO, 1995; TOALDO et al., 2001). A identidade total entre as seqüências de aminoácidos deduzidas dos genes de *CatL-like* de *T. rangeli* (isolado LDG), mostraram similaridades em torno de 80% e 62% com *T. cruzi* e *T. brucei* respectivamente. Quando comparados por regiões, os genes de *CatL* de *T. cruzi* e *T. rangeli*, apresentaram similaridades de 78% nos domínios pré e pro, 74% no domínio catalítico e 55% na extensão C-terminal. Entretanto comparações entre os genes de *T. rangeli* e *T. brucei* evidenciaram similaridades de 71% nos domínios catalíticos e 44% na região C-terminal (MARTINEZ et al., 1995). No entanto os relacionamentos entre as seqüências dos domínios catalíticos podem variar de acordo com o isolado de *T. rangeli*, uma vez que similaridades inversas foram observadas entre *T. rangeli* (isolado V) e *T. cruzi* (69% de similaridade) ou entre *T. rangeli* e *T. brucei* (73%). Apesar de estes estudos terem identificado genes de *CatL-like* em *T. rangeli*, o papel da Rangelipaína é completamente desconhecido.

1.12 GENES DE CISTEÍNO PROTEASE COMO MARCADORES FILOGENÉTICOS

As enzimas *CatL-like* dos tripanossomatídeos e outros parasitas são excepcionalmente imunogênicas e por esta razão têm sido muito exploradas como marcadores sorológicos e como alvos para fabricação de vacinas. Ao contrário de diversas espécies de helmintos, essas enzimas têm apenas recentemente sido exploradas com essa finalidade em vários protozoários, incluindo *Plasmodium*, *Trichomonas* e Amebas. Dentre os tripanossomatídeos, enzimas *CatL-like* de *Leishmania*, *T. cruzi*, *T. congolense* e *T. brucei* têm sido sugeridas como alvos importantes para vacinas (SAJID e MCKERROW, 2002). Estes genes também têm sido explorados como marcadores moleculares para diagnóstico de tripanossomas, devido ao grande número de cópias, a facilidade de amplificação por

PCR, e ao polimorfismo entre seqüências de espécies relacionadas (TANAKA, 1997; CORTEZ et al., 2009 *In Press*)

As CPs lisossômicas possuem seqüências de aminoácidos e conformação similares, além disso, dados estruturais suportaram a existência de um ancestral comum para estas proteínas (TURK et al., 2002). Por outro lado o relacionamento filogenético segregou as CPs lisossômicas humanas em três grupos: (i) enzimas relacionadas com Catepsina B, (ii) dipeptidil proteases e (iii) catepsinas L, S, K e H (BERTI e STORER, 1995; KIRSCHKE et al., 1998). Análises filogenéticas revelaram que os genes codificadores de *CatB* constituem o ramo mais ancestral. Esses genes apresentam apenas uma, ou poucas cópias nos genomas enquanto as *CatL* apresentam múltiplas cópias resultantes de duplicações gênicas (BERTI e STORER, 1995; TURK et al., 2002). O estudo de CPs pode ser útil no entendimento de diversos processos biológicos num amplo espectro de taxa, já que as características estruturais e funcionais destas enzimas são bastante conservadas.

A maior parte das filogenias inferidas a fim de compreender a história evolutiva e as estruturas populacionais dos tripanossomatídeos têm sido baseadas em seqüências de DNA não codificadoras, principalmente as seqüências do gene ribossômico (SSUrDNA ou LSUrDNA), além de microsatélites, seqüências do gene de mini-exon etc (STEVENS et al., 1999a,b, 2001; HAMILTON et al., 2004, 2007; SIMPSON et al., 2006; DE FREITAS et al., 2006). No entanto, em diversos estudos tem sido demonstrada a importância de genes codificadores de proteínas como marcadores filogenéticos para resolver politomias e gerar filogenias com suportes estatísticos mais robustos. Para os tripanossomatídeos, o gene *gGAPDH* tem sido bastante empregado com essa finalidade (SIMPSON et al., 2006; HAMILTON et al., 2007). Estudos recentes têm empregado seqüências codificadoras presentes em múltiplas cópias para análises filogenéticas de tripanossomatídeos (JACKSON, 2007) e populações de *T. cruzi* (CERQUEIRA et al., 2008).

Nos últimos anos, diversos genes codificadores de *CatL* e *CatB* têm sido utilizados em análises filogenéticas. A maioria dos estudos está concentrada no estudo de helmintos, empregando especialmente *CatB* (REHMAN e JASMER, 1999; RANJIT et al., 2008). Genes de *CatB* foram pouco explorados em estudos filogenéticos de protozoários (DACKS et al., 2008), inclusive dos tripanossomatídeos, com os poucos estudos concentrados em *Leishmania* (SAKANARI et al., 1997) e um estudo recente em *T. congolense* (MENDOZA-PALOMARES et al., 2008).

Estudos filogenéticos realizados a fim de entender as histórias evolutivas dos genes codificadores de *CatL* são mais esporádicos, e a maioria foi desenvolvida nos últimos anos. Além de espécies de helmintos (ROBINSON et al., 2008; KONGKARD et al., 2008), alguns kinetoplastídeos foram estudados com esse enfoque: *Leishmania* spp., bodonídeos *Cryptobia salmositica* e

Trypanoplasma borreli e *T. vivax* (SAKANARI et al., 1997; KURU et al., 2007; JESUDHASAN et al., 2007; RUSZCZYK et al., 2008a,b; CORTEZ et al., 2009 *In Press*). Apesar de múltiplas cópias de genes de *CatL-like* de diversas espécies de tripanossomas disponíveis, as relações evolutivas entre eles ainda não foram analisadas. Embora restritos a um pequeno número de espécies, os estudos demonstraram uma congruência entre a filogenias das espécies e as inferidas com genes de *CatL*, tanto de helmintos quanto de protozoários, sugerindo que esses genes são bons marcadores para estudos evolutivos.

Embora seqüências codificadoras presentes em uma única cópia no genoma sejam as mais indicadas para estudos filogenéticos (genes homólogos e ortólogos), genes de cópia única e famílias gênicas compostas por um número pequeno de genes, como os genes que codificam proteínas estruturais como tubulina, actina e histonas, geralmente apresentam um alto grau de conservação. Isso impede que sejam analisados organismos muito relacionados, como por exemplo, isolados de uma mesma espécie e, até mesmo, espécies de um mesmo gênero. Em contraste, famílias multigênicas compostas por várias cópias do mesmo gene (homólogos e parálogos) apresentam um grande potencial em estudos de estrutura de populações e relações filogenéticas, mesmo entre organismos bastante relacionados (JAKSON, 2007; CERQUEIRA et al., 2008).

Enzimas *CatL-like* de tripanossomatídeos são codificadas por famílias multigênicas, com genes presentes em múltiplas cópias organizadas em tandem, geradas por sucessivas duplicações gênicas. Genes homólogos à Cruzipaina têm sido descritos nos tripanossomas de mamíferos: *T. brucei*, *T. rhodesiense*, *T. congolense* e *T. rangeli*, e no tripanossoma de peixe *T. carassii*. Análises filogenéticas de genes de *CatL-like* de várias espécies de kinetoplastídeos, como *Leishmania spp.*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. rangeli*, *T. carassi* (parasita de peixe), além dos bodonídeos parasitas de peixes *Cryptobia salmositica* e *Trypanoplasma borreli*, têm confirmado o potencial dos genes de *CatL-like* como marcadores para inferências filogenéticas destes organismos (SAKANARI et al., 1997; KURU et al., 2007; JESUDHASAN et al., 2007; RUSZCZYK et al., 2008a,b; CORTEZ et al., 2009 *In Press*). Em geral, as filogenias inferidas com genes de *CatL-like* têm gerado clados que refletem a filogenia das espécies de tripanossomas inferidas com base em seqüências de SSU rRNA e *gGAPDH* utilizadas para inferir filogenias de espécies (STEVENS et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008).

Seqüências de *CatL-like* tem sido utilizadas para inferir relacionamentos filogenéticos entre isoformas de espécies de *Fasciola*. Os resultados mostraram que as isoformas de *CatL-like* destes parasitas constituem um grupo monofilético composto por clados que refletem a diversidade funcional das enzimas, a virulência dos isolados e a adaptação de cada espécie a seus hospedeiros

(ROBINSON et al., 2008). Análises filogenéticas de seqüências de CatL-like do nematóide *Gnathostoma spinigerum* revelaram um relacionamento compatível com a divergência de espécies quando comparadas com genes homólogos de outros nematóides (KONGKRD et al., 2008). Em todos esses estudos, as relações filogenéticas de genes de CatL, aparentemente, refletem a adaptação e a especiação dos parasitas.

1.13 EVOLUÇÃO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS

Mais de um terço de um genoma tipicamente eucariótico consiste de genes duplicados e de famílias gênicas, que são grupos de seqüências similares que descendem de um gene ancestral pelo processo de duplicação gênica. A duplicação de genes, de segmentos cromossômicos ou mesmo do genoma inteiro são os principais mecanismos na geração de variabilidade e fundamentais na evolução das espécies. No genoma dos tripanossomatídeos existem várias famílias multigênicas, muitas delas codificam proteínas de superfície ou enzimas envolvidas nos processos de interação parasito-hospedeiro, como as Catepsinas L-like. A variabilidade genética desses genes pode ter sido gerada e selecionada com a adaptação dos parasitas aos seus diversos hospedeiros e ciclos de vida e, assim, refletir as histórias evolutivas desses organismos (EL-SAJED et al., 2005; JACKSON, 2007; CERQUEIRA et al., 2008).

Os membros de uma família multigênica são produtos de um ou mais eventos de duplicação de um gene original, dando origem a genes parálogos, que podem sofrer processos de homogeneização ou de diversificação. Estes genes parálogos podem não ser funcionais (pseudogenes), mas também podem apresentar funções semelhantes ao do gene ancestral ou, ainda, dar origem a isoformas com funções diferentes (ZAHA et al., 2003). Entretanto, quando os membros de uma família multigênica apresentam maior similaridade de seqüências entre cópias de uma mesma espécie (parálogos) do que entre genes homólogos de espécies diferentes, é uma indicação que os membros dessa família não evoluem independentemente uns dos outros, sugerindo evolução em concerto. O processo de homogeneização de seqüências de DNA em uma família repetitiva pode ser resultante de diversos mecanismos, principalmente conversão gênica.

A organização dos membros de uma família multigênica no genoma é variável, eles podem estar agrupados em um segmento cromossômico ou podem estar totalmente dispersos no genoma. Seqüências de genes agrupadas tendem a ser mantidas relativamente uniformes nos processos evolutivos e são, geralmente, flanqueadas por seqüências também conservadas, sendo em geral

sintênicas em organismos relacionados. Genes com esse tipo de organização geram filogenias bastante consistentes (ZAHA et al., 2003; JACKSON, 2007). É importante distinguir entre uma árvore filogenética de espécies e uma árvore gênica. A primeira reflete as vias evolutivas de um grupo de espécies, enquanto a segunda representa a história evolutiva de um conjunto de genes homólogos (parálogos) de uma ou mais espécies. Portanto, árvores gênicas e árvores de espécies nem sempre são congruentes (PAGE e CHARLESTON, 1997; NICHOLS, 2001).

Evolução em concerto já foi descrita em diversas famílias multigênicas, como RNA ribossômico e histonas (JACKSON, 2007). Um estudo filogenômico de genes repetidos em tripanosomatídeos demonstrou que esse deve ser o principal mecanismo de homogeneização de diversas famílias multigênicas. Análises filogenéticas baseadas em genes de múltiplas cópias, codificadores ou não, que evoluem em concerto, provavelmente, refletem a história evolutiva das espécies. A demonstração de que filogenias baseadas em genes de CatL, ou outras seqüências de múltiplas cópias, têm se revelado congruentes com as filogenias das espécies em estudos com cinetoplastídeos (SAKANARI et al., 1997; KURU et al., 2007; JESUDHASAN et al., 2007; JACKSON et al., 2007; CERQUEIRA et al., 2008; RUSZCZYK et al., 2008a,b; CORTEZ et al., 2008; 2009 *In Press*), sugerindo que esses genes também estejam evoluído em concerto nesses organismos. Os objetivos da abordagem filogenética no estudo de genes codificadores de famílias gênicas, como as das cisteíno proteases, é estabelecer o relacionamento entre os genes e testar hipóteses sobre a evolução dessas enzimas. Com as seqüências preditas de aminoácidos, pode-se dar um primeiro passo na descoberta de novas enzimas ou isoformas e estimar suas funções.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo isolamos e seqüenciamos os genes codificadores da cisteíno proteases Catepsina L-like (CatL-like) de isolados de *T. rangeli* de humanos, animais silvestres e *Rhodnius spp.* provenientes da América Central e do Sul. Análises filogenéticas baseadas em alinhamentos múltiplos de seqüências homólogas que codificam a enzima madura de *T. rangeli*, outras espécies de tripanossomas, *Leishmania spp.*, e bodonídeos posicionaram *T. rangeli* próximo a *T. cruzi* e corroboraram as divergências apresentadas em filogenias de kinetoplastídeos baseadas em SSU rDNA. Análises de seqüências que correspondem ao domínio catalítico de genes de CatL-like de 18 isolados de *T. rangeli* representativos da diversidade genética e de distribuição geográfica do parasita suportaram a segregação de todos os isolados nas mesmas linhagens filogenéticas previamente definidas utilizando os genes ribossômico e mini-éxon ("*spliced-leader*"). Seqüências do gene de CatL-like foram utilizadas também como marcadores na padronização de um ensaio de PCR para diagnóstico de *T. rangeli* e *T. cruzi*. Além disso, um método de genotipagem por multiplex-PCR foi desenvolvido baseado no polimorfismo do gene de CatL-like permitindo distribuir os isolados de *T. rangeli* nas principais linhagens estabelecidas por análises filogenéticas baseadas em genes de CatL-like, ribossômico e mini-éxon.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A.; JARAMILLO, O.N.; GURGEL-GONÇALVES, R.; DIAS, F.B.; DIOTAIUTI, L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Trop.**, Jun 21, 2008.

ABAD-FRANCH, F.; PALOMEQUE, F.S.; AGUILAR, H.M.; MILES, M.A. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. **Trop. Med. Int. Health**, v. 10, n. 12, p. 1258-1266, 2005.

ACOSTA, L.; ROMANHA, A.J.; COSENZA, H.; KRETTLI, A.U. Trypanosomatid isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 6, p. 676-683, 1991.

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J. Parasitol.**, v. 65, p. 507-514, 1979.

AGABIAN, N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1157–1160, 1990.

AGUILAR, H.M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J.C.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R. Chagas disease in the Amazon region. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, s. 1, p. 47–56, 2007.

AKSOY, S.; GIBSON, W.C.; LEHANE, M.J. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. **Adv. Parasitol.**, v. 53, p. 1-83, 2003.

ALVAREZ, F.; CORTINAS, M.N.; MUSTO, H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of *Trypanosoma*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 5, n. 2, p. 333-343, 1996.

AMAYA, M.F.; BUSCHIAZZO, A.; NGUYEN, T.; ALZARI, P.M. The high resolution structures of free and inhibitor-bound *Trypanosoma rangeli* sialidase and its comparison with *T. cruzi* trans-sialidase. **J. Mol. Biol.**, v. 325, n. 4, p. 773-784, 2003.

AMBIT, A.; FASEL, N.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differ.**, v.15, n.1, p.113-122, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, VII- Its effect on the survival of infected triatomine bugs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 405-415, 1984.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 4, p. 405-415, 1982.

AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRÍGUEZ, A.M. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Response to reinfections in 2 mammals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 2, p. 149-153, 1985.

APARICIO, I.M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A.P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 10, p. 5892-5902, 2004.

ARNOULT, D.; AKARID, K.; GRODET, A.; PETIT, P.X.; ESTAQUIER, J.; AMEISEN, J.C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death Differ.**, v. 9, n.1, 65-81, 2002.

AUTHIÉ, E. Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle: a role for congopain? **Parasitol. Today**, v. 10, n. 9, p. 360-364, 1994.

AYALA, F.M. Presencia de un hemoflagelado semejante al *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920, em el mono *Saimiri boliviensis* em La región amazônica, Peru. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 6, p. 47, 1964.

AZAMBUJA, P.; FEDER, D.; GARCIA, E.S. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. **Exp. Parasitol.**, v. 107, n. 1-2, p. 89-96, 2004.

AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*: a mini review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, n. 5, p. 567-572, 2005.

AZAMBUJA, P.; MELLO, C.B.; D'ESCOFFIER, L.N.; GARCIA, E.S. In vitro cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, n. 5, p. 597-599, 1989.

AZAMBUJA, P.; RATCLIFFE, N.A.; GARCIA, E.S. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, n. 3, p. 397-404, 2005.

BARRETT, T.V. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas disease. **Adv. Dis. Vector Res.**, v. 8, p. 143–176, 1991.

BASSERI, H.R.; TEW, I.F.; RATCLIFFE, N.A. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.**, v. 100, n. 4, p. 226-34, 2002.

BASSO, B.; CASTRO, I.; INTROINI, V.; GIL, P.; TRUYENS, C.; MORETTI, E.R. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, v. 25, n. 19, p. 3855-3858, 2007.

BASSO, B.; MORETTI, E.R.; DFontela, S.; VOTTERO-CIMA, E. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. II. Overlapping of antigenic spectrum. **Rev. Lat. Microbiol.**, v. 31: p. 141-146, 1989.

BASSO, B.; MORETTI, E.R.; FRETES, R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 370-374, 2008.

BASSO, B.; MORETTI, E.R.; VOTTERO-CIMA, E. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli*-immunized mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 4, p. 413-419, 1991.

BELTRAME-BOTELHO, I.T.; GASPAR-SILVA, D.; STEINDEL, M.; DAVILA, A.M.; GRISARD, E.C. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, n.1, p.17-28, 2005.

BERTI, P.J.; STORER, A.C. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. **J. Mol. Biol.**, v. 246, n. 2, p. 273-283, 1995.

BONTEMPI, E.; CAZZULO, J.J. Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 58, n. 3, p. 337-341, 1990.

BOULANGÉ, A.; SERVEAU, C.; BRILLARD, M.; MINET, C.; GAUTHIER, F.; DIALLO, A.; LALMANACH, G.; AUTHIÉ, E. Functional expression of the catalytic domains of two cysteine proteinases from *Trypanosoma congolense*. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 13, p. 1435-1440, 2001.

BREGLIA, S.A.; SLAMOVITS, C.H.; LEANDER, B.S. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 54, n.1, p. 86-92, 2007.

BRIONES, M.R.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 104, n. 2, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 1, p. 35-44, 2000.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 11, p. 1218-1226, 2001.

BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell. Microbiol.**, v. 4, n. 11, p. 701-11, 2002.

BUSCHIAZZO, A.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A.C. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1167-1173, 1997.

BUSSE, I.; PREISFELD, A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of Distigma and Astasia (Euglenozoa). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 617-624, 2003.

BUSSE, I.; PREISFELD, A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. **J. Mol. Evol.**, v. 55, n. 6, p. 757-767, 2002.

CABALLERO, Z.C.; SOUSA, O.E.; MARQUES, W.P.; SAEZ-ALQUEZAR, A.; UMEZAWA, E.S. Evaluation of serological test to identify *Trypanosoma cruzi* infections in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, n. 8, p. 1045-1049, 2007.

CAFFREY, C.R.; HANSELL, E.; LUCAS, K.D.; BRINEN, L.S.; ALVAREZ HERNANDEZ, A.; CHENG, J.; GWALTNEY, S.L. 2nd; ROUSH, W.R.; STIERHOF, Y.D.; BOGYO, M.; STEVERDING, D.; MCKERROW, J.H. Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 118, n. 1, p. 61-73, 2001.

CALZADA, J.E.; PINEDA, V.; MONTALVO, E.; ALVAREZ, D.; SANTAMARÍA, A.M.; SAMUDIO, F.; BAYARD, V.; CÁCERES, L.; SALDAÑA, A. Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 5, p. 762-765, 2006.

CAMARGO, E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.12, p. 93-100, 1964.

CAMPETELLA, O.; HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; FRASCH, A.C.C.; PETTERSON, U.; CAZZULO, J.J. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *T.cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 50, p. 225-234, 1992.

CANESE, A. Triatomíneos con *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, y *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, en el distrito de Villeta (Paraguay). Hallazgos de hemolinfas positivas. **Rev. Méd. Paraguay**, v. 6, p. 135, 1964.

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems**, v.14, n. 3-4, p. 461-481,1981.

CAVALIER-SMITH, T. Genome reduction and evolution of novel genetic membranes and protein targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 358, n. 1429, p. 109–133. 2003a.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiol. Rev.**, v. 57, n.4, p. 953-994,1993.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proc. Biol. Sci.**, v. 271, n. 1545, p. 1251-1262, 2004.

CAVALIER-SMITH, T. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 1741-1758. 2003b.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Curr. Pharm. Design**, v. 7, p. 1143–1156, 2001.

CERQUEIRA, G.C.; BARTHOLOMEU, D.C.; DAROCHA, W.D.; HOU, L.; FREITAS-SILVA, D.M.; MACHADO, C.R.; EL-SAYED, N.M.; TEIXEIRA, S.M. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 157, n. 1, p. 65-72, 2008.

CLARK, I.A.; ROCKETT, K.A. Nitric oxide and parasitic disease. **Adv. Parasitol.**, v. 37, p. 1-56, 1996.

COLASANTI, M.; SALVATI, L.; VENTURINI, G.; ASCENZI, P.; GRADONI, L. Cysteine protease as a target for nitric oxide in parasitic organisms. **Trends. Parasitol.**, v.17, n. 12, p. 575, 2001.

CORTEZ, A.P.; VENTURA, R.M.; RODRIGUES, A.C.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; AÑEZ, N.; MACHADO, R.Z.; GIBSON, W.C.; TEIXEIRA, M.M. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, v. 133, n. 2, p.159-169, 2006.

COSTALES, J.; ROWLAND, E.C. A role for protease activity and host-cell permeability during the process of *Trypanosoma cruzi* egress from infected cells. **J. Parasitol.**, v. 93, n. 6, p.1350-1359, 2007.

COURA, J.R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRETT, T.V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n. 3, p. 278-279, 1996.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.; BOIA, M.N.; FERNANDES, O.; BONFANTE, C.; CAMPOS, J.E.; SANTOS, L.; DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 159-65, 2002.

CUBA-CUBA, C. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. W. Observações sobre a evolução e morfogênese na hemocele e nas glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.17, p. 283-297, 1975.

CUBA-CUBA, C. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 31, n. 2, p. 207-220, 1998.

CUERVO, C.; LÓPEZ, M.C.; PUERTA, C. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. **Infect. Genet. Evol.**, v. 6, n. 5, p. 401-409, 2006.

D'ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D.A. (Ed.). **Biology of Kinetoplastida**. New York, NY: Academic Press, 1976. v. 1, p. 327-493.

D'ALESSANDRO, A.; GORE-SARAVIA, N. *Trypanosoma rangeli*. In: GILLES, H.M. (Ed.). **Protozoal Diseases**. London: Arnold Press, 1999. p. 398-412.

D'ALESSANDRO, A.; GORE-SARAVIA, N. *Trypanosoma rangeli*. In: KREIER, J.P. (Ed.). **Parasitic Protozoa**. San Diego, CA: Academic Press, 1992. v. 2, p.1-54.

D'ALESSANDRO, A.; HINCAPIÉ, O. *Rhodnius neivai*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, v. 35, p. 512-514, 1986.

DACKS, J.B.; KURU, T.; LIAPOUNOVA, N.A.; GEDAMU, L. Phylogenetic and primary sequence characterization of cathepsin B cysteine proteases from the oxymonad flagellate *Monocercomonoides*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 55, n. 1, p. 9-17, 2008.

DE FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog.**, v. 2, n. 3, p. e24, 2006.

DE LEÓN, J. R. El *Trypanosoma rangeli*, observado en seres humanos en Guatemala. **Instituto de Investigaciones Científicas**, Universidad de San Carlos, Guatemala, n. 3, p. 32, 1949.

DE PAULA, A.S.; DIOTAIUTI, L.; GALVÃO, C. Systematics and biogeography of Rhodniini (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. **J. Biogeogr.**, v. 34, p. 699–712, 2007.

DE SANTA-IZABEL, A.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H. Proteolytic activities in *Trypanosoma rangeli* and stercorarian trypanosomes: taxonomic implications. **Parasitol. Res.**, v. 94, n. 5, p. 342-348. 2004.

DE SOUSA, M.A.; DA SILVA FONSECA, T.; DOS SANTOS, B.N.; DOS SANTOS PEREIRA, S.M.; CARVALHAL, C.; HASSLOCHER MORENO, A.M. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). **Parasitol. Res.**, v. 103, n. 3, p. 697-703, 2008.

DEANE, L. Finding of *Trypanosoma* of the rangeli type in opossums of the species *Didelphis marsupialis marsupialis* in the state of Para. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v.10, p. 451-458, 1958.

DELORENZI, M.; SEXTON, A.; SHAMS-ELDIN, H.; SCHWARZ, R.T.; SPEED, T.; SCHOFIELD, L. Genes for Glycosyl phosphatidyl inositol toxin Biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4510-4522, 2002.

DESQUESNES, M.; MCLAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DÁVILA, A.M. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 610-614, 2001.

DIAS, F.B.; DIOTAIUTI, L.; ROMANHA, A.J.; BEZERRA, C.M.; MACHADO, E.M. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the estate of Ceará, Brazil in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Traitominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 643-645, 2007.

DIMOPOULOS, G.; SEELEY, D.; WOLF, A.; KAFATOS, F.C. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. **EMBO J.**, v.17, n. 21, p. 6115-6123, 1998.

DOSREIS, G.A.; BARCINSKI, M.A. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. **Adv. Parasitol.**, v. 49, p.133-161. 2001

DOYLE, P.S.; ZHOU, Y.M.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mousemodel of infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 11, p. 3932-3939, 2007.

DUJARDIN, J.P.; CHAVEZ, T.; MORENO, J.M.; MACHANE, M.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C.J. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **J. Med. Entomol.**, v. 36, n. 6, p. 653-659, 1999.

DYKOVÁ, I.; FIALA, I.; LOM, J.; LUKEŠ, J. *Perkinsiella amoebae*-like endosymbionts of *Neoparamoeba* spp., relatives of the kinetoplastid *Ichthyobodo*. **Eur. J. Protistol.**, v. 39, n. 1, p. 37-52, 2003.

EAKIN, A.E.; BOUVIER, J.; SAKANARI, J.A.; CRAIK, C.S.; MCKERROW, J.H. Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 39, n.1, p. 1-8, 1990.

EAKIN, A.E.; MILLS, A.A.; HARTH, G.; MCKERROW, J.M.; CRAIK C.S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (Cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 11, p. 7411-7420, 1992.

EBERT, F. Isoenzymes of *Trypanosoma rangeli* stocks and their relation to other trypanosomes transmitted by triatomine bugs. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 37, n. 3, p. 251-254, 1986.

EGER-MANGRICH, I.; DE OLIVEIRA, M.A.; GRISARD, E.C.; DE SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines invitro. **Parasitol. Res.**, v. 87, n. 6, p. 505-509, 2001.

EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E.A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D.C.; HAAS, B.J.; TRAN, A.N.; WORTMAN, J.R.; ALSMARK, U.C.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J.M.; CERQUEIRA, G.C.; CREASY, T.; DELCHER, A.L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T.M.; HAUSER, C.; IVENS, A.C.; KUMMERFELD, S.K.; PEREIRA-LEAL, J.B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S.L.; SHALLOM, J.; SILVA, J.C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; DONELSON, J.E.; ANDERSSON, B.; STUART, K.D.; HALL, N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-409, 2005.

ENGSTLER, M.; SCHAUER, R.; BRUN, R. Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. **Acta Trop.**, v. 59, n. 2, p. 117-129, 1995.

ERSFELD, K.; BARRACLOUGH, H.; GULL, K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. **J. Mol. Evol.**, v. 61, n. 6, p. 742-757, 2005.

FERNANDES, A.P.; NELSON, K.; BEVERLEY, S.M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 24, p.11608-11612,1993.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B.; DERRE, R.; JUNQUEIRA, A.C.; SANTOS, L.C.; STURM, N.R.; NAIFF, R.D.; BARRET, T.V.; CAMPBELL, D.A., COURA, J.R. 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.**, v. 95, n. 1, p. 97-99, 2001.

FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; VIOLA, L.B.; TAKATA, C.S.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. **Parasitology**, v. 134, n. 11, 1623-1638, 2007.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, p. 1-36, 2003.

GARCIA, E.S.; MACHADO, E.M.; AZAMBUJA, P. Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **Exp. Parasitol.**, v. 107, s. 1-2, p. 31-38, 2004.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. **J. Insect Physiol.**, v. 53, n. 1, p.11-21, 2007.

GARCÍA-SALCEDO, J.A.; OLIVER, J.L.; STOCK, R.P.; GONZÁLEZ, A. Molecular characterization and transcription of the histone H2B gene from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 6, p. 1033-1043, 1994.

GARDINER, P.; MUSA, M. Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside Sub Sahara, Africa. In: KREIER, J.P. (Ed.). **Parasitic Protozoa**. San Diego, CA: Academic Press, 1992. v. 2, p.227-314.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 557-565, 2000.

GIBSON, W.; BINGLE, L.; BLENDMAN, W.; BROWN, J.; WOOD, J.; STEVENS, J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 107, n. 2, p. 269-277, 2000.

GIORDANENGO, L.; FRETES, R.; DÍAZ, H.; CANO, R.; BACILE, A.; VOTTERO-CIMA, E.; GEA, S. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 9, p. 1407-1413, 2000.

GOLOBOFF, P.A.; FARRIS, J.; NIXON, K.C. **T.N.T.:** Tree Analysis Using New technology. Program and Documentation, available from de authors, 2003.

GOMES, S.A.; FEDER, D.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. **J. Insect Physiol.**, v.49, n. 9, p. 829-37, 2003.

GOMES, S.A.; FEDER, D.; THOMAS, N.E.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: In vivo and in vitro experiments. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 73, n. 3, p. 289-293, 1999.

GOMES, S.A.; FONSECA DE SOUZA, A.L.; KIFFER-MOREIRA, T.; DICK, C.F.; DOS SANTOS, A.L.; MEYER-FERNANDES, J.R. Ecto-phosphatase activity on the external surface of *Rhodnius prolixus* salivary glands: modulation by carbohydrates and *Trypanosoma rangeli*. **Acta Trop.**, v. 106, n. 2, p. 137-142, 2008.

GOMES, S.A.; GRACIANO, G.L.; NOGUEIRA, N.F.; DE SOUZA, W.; GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Effects of gamma irradiation on the development of *Trypanosoma rangeli* in the vector *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 79, n. 2, p. 86-92, 2002.

GRISARD, E.C.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. Miniexon-gen sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. **Parasitology**, v.118, p. 375-382, 1999a.

GRISARD, E.C.; STEINDEL, M.; GUAMIERI, A.A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D.A.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 203-209, 1999b.

GRÖGL, M.; KUHN, R.E. Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. **J. Parasitol.**, v. 70, n. 5, p. 822-824, 1984.

GUHL, F.; HUDSON, L.; MARINKELLE, C.J.; MORGAN, S.; JARAMILLO, C. Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. **Acta Trop.**, v. 42, n. 4, p. 311-318, 1985.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 362-370, 2002.

GUHL, F.; MARINKELLE, C.J. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, n. 3, p. 361, 1982.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-42, 2003.

GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, E.D.; DUARTE, M.A.; PALMA, A.R.; ABAD-FRANCH, F.; CARRANZA, J.C.; CUBA-CUBA, C.A. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. **Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 323-330, 2004.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 91, n. 1, p. 37-49, 1998.

HAMILTON PB, STEVENS JR, HOLZ P, BOAG B, COOKE B, GIBSON WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Mol. Ecol.**, v. 14, n. 10, p. 3167-3175, 2005b.

HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C.; STEVENS, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 44, n. 1, p. 15-25, 2007.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GAUNT, M.W.; GIDLEY, J.; GIBSON, W.C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 12, p. 1393-1404, 2004.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GIDLEY, J.; HOLZ, P.; GIBSON, W.C. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 4, p. 431-443, 2005a

HANNAERT, V.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. **J. Mol. Evol.**, v. 47, n. 6, p. 728-738, 1998.

HASHIMOTO, T.; NAKAMURA, Y.; KAMAISHI, T.; ADACHI, J.; NAKAMURA, F.; OKAMOTO, K.; HASEGAWA, M. Phylogenetic place of kinetoplastid protozoa inferred from a protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 70, p. 181-185, 1995.

HECKER, H.; SCHWARZENBACH, M.; RUDIN, W. Development and interactions of *Trypanosoma rangeli* in and with the reduviid bug *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Res.**, v. 76, n. 4, p. 311-318, 1990.

HELMS, M.J.; AMBIT, A.; APPLETON, P.; TETLEY, L.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. **J. Cell. Sci.**, v. 119, n. 6, p. 1105-1117, 2006.

HENRIKSSON, J.; PETTERSSON, U.; SOLARI, A. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. **Exp. Parasitol.**, v.77, p. 334-348, 1993.

HENRIKSSON, J.; SOLARI, A.; RYDÅKER, M.; SOUSA, O.E.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli*. **Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 385-391, 1996.

HERTZ-FOWLER, C.; ERSFELD, K.; GULL, K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 116, n. 1, p. 25-34, 2001. Erratum in: **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, n. 1, p.119, 2001.

HILLEY, J.D.; ZAWADZKI, J.L.; MCCONVILLE, M.J.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI): protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, n. 4, p. 1183-1195, 2000.

HOARE, C.A. **The trypanosomes of mammals**. A zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 1-723.

HUDSON, L.; GUHL, F.; DE SÁNCHEZ, N.; BRIDGE, D.; JARAMILLO, C.A.; YOUNG, A. Longitudinal studies of the immune response of Colombian patients infected with *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 449-460, 1988.

HUGHES, A.L. Evolution of cysteine proteinases in eukaryotes. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.3, n. 4, p. 310-321, 1994.

HYPSE, V.; TIETZ, D.F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R.O.M.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol. Phyl. Evol.**, v. 23, p. 447-457, 2002.

JACKSON, A.P. Tandem gene arrays in *Trypanosoma brucei*: comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. **BMC Evol. Biol.**, v. 7, n. 54, p. 1-19, 2007.

JAISHANKAR, P.; HANSELL, E.; ZHAO, D.M.; DOYLE, P.S.; MCKERROW, J.H.; RENSLO, A.R. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, n. 2, p. 624-628, 2008.

JESUDHASAN, P.R.; TAN, C.W.; HONTZEAS, N.; WOO, P.T. A cathepsin L-like cysteine proteinase gene from the protozoan parasite, *Cryptobia salmositica*. **Parasitol. Res.**, v. 100, n. 4, p. 881-886, 2007.

JUNQUEIRA, A.C.; DEGRAVE, W.; BRANDÃO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 6, p. 270-272, 2005.

KANG, X.; SZALLIES, A.; RAWER, M.; ECHNER, H.; DUSZENKO, M. GPI anchor transamidase of *Trypanosoma brucei*: in vitro assay of the recombinant protein and VSG anchor exchange. **J. Cell. Sci.**, v. 115, n. 12, p. 2529-2539, 2002.

KIRSCHKE, H.; BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. **Lysosomal Cysteine Proteases**. Oxford, UK: University Press, 1998. p.1-148.

KLEMBBA, M.; GOLDBERG, D.E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 71, p. 275-305, 2002.

KONGKARD, N.; UPARANUKRAW, P.; MORAKOTE, N.; SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Gnathostoma spinigerum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.160, n. 2, p.129-37, 2008.

KOSEC, G.; ALVAREZ, V.; CAZZULO, J.J. Cysteine proteinases of *Trypanosoma cruzi*: from digestive enzymes to programmed cell death mediators. **Biocell**, v. 30, n. 3, p. 479-490, 2006b.

KOSEC, G.; ALVAREZ, V.E.; AGÜERO, F.; SÁNCHEZ, D.; DOLINAR, M.; TURK, B.; TURK, V.; CAZZULO, J.J. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 1, p. 18-28, 2006a.

KREUTZER, R.D.; SOUZA, O.E. Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isoenzyme electrophoresis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, n. 2, p. 308-317, 1981.

KURU, T.; JIRATA, D.; GENETU, A.; BARR, S.; MENGISTU, Y.; ASEFFA, A.; GEDAMU, L. *Leishmania aethiopica*: identification and characterization of cathepsin L-like cysteine protease genes. **Exp. Parasitol.**, v. 115, n. 3, p.283-390. 2007.

LABRIOLA, C.; CAZZULO, J.J. Purification and partial characterization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma rangeli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 129, p. 143-148, 1995.

LALMANACH, G.; BOULANGÉ, A.; SERVEAU, C.; LECAILLE, F.; SCHARFSTEIN, J.; GAUTHIER, F.; AUTHIÉ, E. Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate. **Biol. Chem.**, v. 383, n. 5, p.739-49, 2002.

LEE, N.; GANNAVARAM, S.; SELVAPANDIYAN, A.; DEBRABANT, A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. **Eukaryot. Cell**, v. 6, n. 10, p.1745-1757, 2007.

LILLICO, S.; FIELD, M.C.; BLUNDELL, P.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8. **Mol. Biol. Cell**, v. 14, n. 3, p.1182-1194, 2003.

LIMA, A.P.; DOS REIS, F.C.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; MÉNARD, R.; VERNET, T.; THOMAS, D.Y.; STORER, A.C.; SCHARFSTEIN, J. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 114, n. 1, p. 41-52, 2001.

LIMA, A.P.; TESSIER, D.C.; THOMAS, D.Y.; SCHARFSTEIN, J.; STORER, A.C.; VERNET, T. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 2, p. 333-338, 1994.

LONSDALE-ECCLES, J.D.; MPIMBAZA, G.W. Thiol-dependent proteases of African trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gels co-polymerized with fibrinogen. **Eur. J. Biochem.**, v. 155, n. 3, p. 469-473, 1986.

LUCENA, D.T.; MARQUES, R. J. Primeiro caso de infecção humana por *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920, no Brasil. **Rev. Brasil. Med.**, v. 2, p. 535, 1954.

LUCKHART, S.; ROSENBERG, R. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. **Gene**, v. 232, n. 1, p. 25-34, 1999.

LUKES, J.; GUILBRIDE, D.L.; VOTÝPKA, J.; ZÍKOVÁ, A.; BENNE, R.; ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot. Cell**, v. 1, n. 4, p. 495-502, 2002.

LUN, Z.R.; LI, A.X.; CHEN, X.G.; LU, L.X.; ZHU, X.Q. Molecular profiles of *Trypanosoma brucei*, *T. evansi* and *T. equiperdum* stocks revealed by the random amplified polymorphic DNA method. **Parasitol Res.**, v. 92, n. 4, p. 335-340, 2004.

LÜSCHER, A.; DE KONING, H.P.; MÄSER, P. Chemotherapeutic strategies against *Trypanosoma brucei*: drug targets vs. drug targeting. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 6, p. 555-67, 2007.

MACEDO, A.M.; PIMENTA, J.R.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.I.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S.D.; OLIVEIRA, R.P. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 407-413, 2001.

MACEDO, A.M.; VALLEJO, G.A.; CHIARI, E.; PENA, S.D. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **EXS**, v. 67, p. 321-329, 1993.

MACHADO, P.E.; EGER-MANGRICH, I.; ROSA, G.; KOERICH, L.B.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 632-634, 2001.

MAIA DA SILVA, F.; JUNQUEIRA, A.C.; CAMPANER, M.; RODRIGUES, A.C.; CRISANTE, G.; RAMIREZ, L.E.; CABALLERO, Z.C.; MONTEIRO, F.A.; COURA, J.R.; AÑEZ, N.; TEIXEIRA, M.M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. **Mol. Ecol.**, v.16, n. 16, p. 3361-3373, 2007.

MAIA DA SILVA, F.; NAIFF, R.D.; MARCILI, A.; GORDO, M.; D'AFFONSECA NETO, J.A.; NAIFF, M.F.; FRANCO, A.M.; CAMPANER, M.; VALENTE, V.; VALENTE, S.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.; MILES, M.A. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta Trop.**, v. 107, n. 2, p. 168-173, 2008.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; ANEZ, N.; SHAW, J.J.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.M. 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**, v.129, n. 5, p. 549-561, 2004b.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; COURA, J.R.; TAKEDA, G.F.; SHAW, J.J.; TEIXEIRA, M.M. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. **Parasitology**, v.128, n. 3, p. 283-294, 2004a.

MARINKELLE, C.J.; VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; DE SÁNCHEZ, N. Diferenciación entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*, com base al comportamiento de estos flagelados frente a la actividad lítica del complemento. **Rev. Lat. Microbiol.**, v. 27, p. 21-25, 1985.

MARINKELLE, C.J.; VALLEJO, G.A.; SCHOTTELIUS, J.; GUHL, F.; DE SANCHEZ, N. The affinity of the lectins *Ricinus communis* and *Glycine maxima* to carbohydrates on the cell surface of various forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*, and the application of these lectins for the identification of *T. cruzi* in the feces of *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop.**, v. 43, n. 3, p. 215-223, 1986.

MARQUEZ, D.S.; RAMÍREZ, L.E.; MORENO, J.; PEDROSA, A.L.; LAGES-SILVA, E. *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. **Exp. Parasitol.**, v.117, n. 1, p. 35-42, 2007.

MARTÍNEZ, J.; HENRIKSSON, J.; RYDÅKER, M.; CAZZULO, J.J.; PETTERSSON, U. Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.129, n. 2-3, p.135-141, 1995.

MASLOV, D.A.; SIMPSON, L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. **Parasitol. Today**, v. 11, p. 30-32, 1995.

MASLOV, D.A.; LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 75, n. 2, p.197-205, 1996.

MASLOV, D.A.; PODLIPAEV, S.A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.

MASLOV, D.A.; YASUHIRA, S.; SIMPSON, L. Phylogenetic affinities of Diplonema within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. **Protist**, v. 150, n. 1, p. 33-42. 1999.

MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. Review. **Annu. Rev. Pathol.**, v.1, p. 497-536, 2006.

MCKERROW, J.H.; ENGEL, J.C.; CAFFREY, C.R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 7, n. 4, p. 639-644, 1999.

MCKERROW, J.H.; SUN, E.; ROSENTHAL, J.P.; BOUVIER, J. The Proteases and Pathogenicity of Parasitic Protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 47, p. 821-853, 1993.

MEDINA-ACOSTA, E.; FRANCO, A.M.; JANSEN, A.M.; SAMPOL, M.; NEVÉS, N.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; NUSSENZWEIG, V. Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids. **Eur. J. Biochem.**, v. 225, n. 1, p. 333-339. 1994.

MEIRELLES, R.M.; HENRIQUES-PONS, A.; SOARES, M.J.; STEINDEL, M. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitol. Res.**, v. 97, n. 4, p. 259-69, 2005.

MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 65, n. 3, p. 261-268, 1995.

MENDONÇA, M.B.; NEHME, N.S.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; VARGAS, N.; JUNQUEIRA, A.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; COURA, J.R.; ZINGALES, B.; FERNANDES, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, v. 124, PT. 2, p. 177-184, 2002.

MENDOZA-PALOMARES, C.; BITEAU, N.; GIROUD, C.; COUSTOU, V.; COETZER, T.; AUTHIÉ, E.; BOULANGÉ, A.; BALTZ, T. Molecular and biochemical characterization of a cathepsin B-like protease family unique to *Trypanosoma congolense*. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 4, p. 684-697, 2008.

MENESES, A.J.; PALAU, M.T.; ZÚÑIGA, C.A. *Trypanosoma rangeli*: Lo que se conoce y el impacto de su presencia. **Medunab**, v. 7, n. 21, p. 166-171, 2004.

MERZLYAK, E.; YURCHENKO, V.; KOLESNIKOV, A.A.; ALEXANDROV, K.; PODLIPAEV, S.A.; MASLOV, D.A. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 161-169, 2001.

MILES, M.A.; ARIAS, J.R.; VALENTE, S.A.; NAIFF, R.D.; DE SOUZA, A.A.; POVOA, M.M.; LIMA, J.A.; CEDILLOS, R.A. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 6, p.1251-1259, 1983.

MIRANDA SANTOS, I.K.F.; PEREIRA, M.E.A. Lectin discriminates between pathogenic and non-pathogenic South American trypanosomes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.33, p. 839-844, 1984.

MONTEIRO, F.A.; BARRETT, T.V.; FITZPATRICK, S.; CORDÓN-ROSALES, C.; FELICIANGELI, M.D.; BEARD, C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Mol. Ecol.**, v. 12, p. 997-1006, 2003.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 62, p. 460-465, 2000.

MONTERO, G.F. Trypanosomiasis rangeli em Costa Rica. In: CONGRESO LATINOAMERICANO, 1.; CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA, 2., 1958, México. **Anales...** Costa Rica.

MONTILLA, M.M.; GUHL, F.; JARAMILLO, C.; NICHOLLS, S.; BARNABE, C.; BOSSENO, M.F.; BRENIERE, S.F. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 4, p. 394-400, 2002.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. New insights into the phylogenetic position of diplonemids: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 2211-2219, 2001.

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.**, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.

MOTTRAM, J.C.; NORTH, M.J.; BARRY, J.D.; COOMBS, G.H. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. **FEBS Lett.**, v. 258, n. 2, p. 211-215, 1989.

MOTTRAM, J.C.; BROOKS, D.R.; COOMBS, G.H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 1, n. 4, p. 455-460, 1998.

MOTTRAM, J.C.; HELMS, M.J.; COOMBS, G.H.; SAJID, M. Clã CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 4, p.182-187, 2003.

MURPHY, N.B.; WELBURN, S.C. Programmed cell death in procyclic *Trypanosoma brucei rhodesiense* is associated with differential expression of mRNAs. **Cell Death Differ.**, v. 4, n. 5, p. 365-370, 1997.

MYLER, P.J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Trop.**, v. 53, s. 3-4, p. 205-225, 1993.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B.Jr. **GeneDoc**: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by de author 1997.

NICHOLS, R. Gene trees and species trees are not the same. **Trends Ecol. Evol.**, v. 16, n. 7, p. 358-364, 2001

NIKOLSKAIA, O.V.; LIMA, A.P.C.A.; KIM, V.Y.; LONSDALE-ECCLES, J.D.; TOSHIHIDE, F.; SCHARFSTEIN, J.; GRAB, D.J. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 2739-2747, 2006.

NORTH, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. **Microbiol. Rev.**, v. 46, n. 3, p. 308-340, 1982.

NORTH, M.J.; COOMBS, G.H.; BARRY, J.D. A comparative study of the proteolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. vivax*, *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 9, n. 2, p. 161-180, 1983.

NORTH, M.J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. **Parasitol. Today**, v. 6, n. 8, p. 270-275, 1990.

O'DALY, J.A.; CARRASCO, H.; FERNANDEZ, V.; RODRÍGUEZ, M.B. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Acta Trop.**, v. 56, p. 265-287, 1994.

OKENU, D.M.; OPARA, K.N.; NWUBA, R.I.; NWAGWU, M. Purification and characterisation of an extracellularly released protease of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Res.**, v. 85, n. 5, p. 424-428, 1999.

OLIVEIRA, M.A.; DE SOUZA, W. An electron microscopic study on penetration of *Trypanosoma rangeli* into the midgut cells of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 77, p. 22-26, 2001.

OLIVEIRA, M.A.; DE SOUZA, W. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. **Parasitol. Int.**, v. 52, p. 299-307, 2003.

OSORIO, Y.; TRAVI, B.L.; PALMA, G.I.; SARAIVA, N.G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J. Parasitol.**, v. 81, n. 5, p. 687-693, 1995.

PAGE M.J.; DI CERA, E. Evolution of Peptidase Diversity. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 44, p. 30010–30014, 2008.

PAGE, R.D.; CHARLESTON, M.A. From gene to organismal phylogeny: reconciled trees and the gene tree/species tree problem. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 7, n. 2, p. 231-240, 1997.

PALÁU, M.T.; MEJÍA, A.J.; VERGARA, U.; ZÚÑIGA, C.A. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 543-548, 2003.

PAMER, E.G.; DAVIS, C.E.; SO, M. Expression and deletion analysis of the *Trypanosoma brucei rhodesiense* cysteine protease in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 3, p. 1074-1078, 1991.

PAVIA, P.X.; VALLEJO, G.A.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, R.S.; PUERTA, C.J. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 23-30, 2007.

PEDROSO A. **Cariótipo molecular: uma ferramenta para o estudo analítico e evolutivo do genoma de *Trypanosoma cruzi***. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREIRA, E.E.A.; MOSS, D. Neuraminidase activity in *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 15, p. 95-103, 1985.

PESSÔA, S.B. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1963.

PINEDA, V.; MONTALVO, E.; ALVAREZ, D.; SANTAMARÍA, A.M.; CALZADA, J.E.; SALDAÑA, A. Feeding sources and trypanosome infection index of *Rhodnius pallescens* in a Chagas disease endemic area of Amador County, Panama. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 50, n. 2, p. 113-116, 2008.

PODLIPAEV, S.A.; FROLOV, A.O. The phylogeny of the Trypanosomatidae: the molecular and morphological approaches. **Parazitologija**, v. 34, n. 3, p. 169-82, 2000.

PODLIPAEV, S.A.; STURM, N.R.; FIALA, I.; FERNANDES, O.; WESTENBERGER, S.J.; DOLLET, M.; CAMPBELL, D.A.; LUKES, J. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 51, n. 3, p. 283-290, 2004.

PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; TOMLINSON, S.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma rangeli* sialidase lacks trans-sialidase activity. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 62, n. 1, p.19-25, 1993.

PREISFELD, A.; BUSSE, I.; KLINGBERG, M.; TALKE, S.; RUPPEL, H.G. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 3, p. 751-758, 2001.

PUERTA, C.; CUERVO, P.; THOMAS, M.C.; LOPEZ, M.C. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 11, p. 916-922, 2000.

PUERTA, C.; MARTIN, J.; ALONSO, C.; LÓPEZ, M.C. Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 64, n. 1, p. 1-10, 1994.

PULIDO, X.C.; PÉREZ, G.; VALLEJO, GA. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 172-179, 2008.

RAMIREZ, L.E.; MACHADO, M.I.; MAYWALD, P.G.; MATOS, A.; CHIARI, E.; SILVA, E.L. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brazil, an endemic region for Chagas' disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 1, p. 99-102, 1998.

RANJIT, N.; ZHAN, B.; STENZEL, D.J.; MULVENNA, J.; FUJIWARA, R.; HONTEZ, P.J.; LOUKAS, A. A family of cathepsin B cysteine proteases expressed in the gut of the human hook worm, *Necator americanus*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 160, n. 2, p. 90-99, 2008.

RAWLINGS, N.D. Unusual phyletic distribution of peptidases as a tool for identifying potential drug targets. **Biochem. J.**, v. 401, n. 2, p. e5-7, 2007.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J.; Evolutionary families of peptidases. **Biochem J.**, v. 290, n. 1, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v.1, p. 34, 2006.

RECINOS, R.F.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *T. rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 63, n. 1, p. 59-67, 1994.

REHMAN, A.; JASMER, D.P. Defined characteristics of cathepsin B-like proteins from nematodes: inferred functional diversity and phylogenetic relationships, **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 102, p. 297-310, 1999.

REY, M.H.; UCRÓS, G.H. Nota preliminar sobre el hallazgo de *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi* y del *Trypanosoma rangeli* en el *Rhodnius prolixus* en algunas regiones del oriente de Cundinamarca (1). **Rev. Facultad Medicina**, v. 8, p. 76-78, 1939.

ROBINSON, M.W.; TORT, J.F.; LOWTHER, J.; DONNELLY, S.M.; WONG, E.; XU, W.; STACK, C.M.; PADULA, M.; HERBERT, B.; DALTON, J.P. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 1111-1123, 2008.

RODRIGUES, A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; DELL' PORTO, A.; Milder, R.V.; TAKEDA, G.F.; TEIXEIRA, M.M. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. **Vet. Parasitol.**, v. 116, n. 3, p. 185-207, 2003.

RODRIGUES, A.C.; NEVES, L.; GARCIA, H.A.; VIOLA, L.B.; MARCILI, A.; DA SILVA, F.M.; SIGAUQUE, I.; BATISTA, J.S.; PAIVA, F.; TEIXEIRA, M.M. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. **Parasitology**, v. 135, n. 11, p. 1317-1328, 2008.

RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; TEIXEIRA, M.M. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 215-224, 2006.

ROISIN-BOUFFAY, C.; LUCIANI, M.F.; KLEIN, G.; LEVRAUD, J.P.; ADAM, M.; GOLSTEIN, P. Developmental cell death in dictyostelium does not require paracaspase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 12, p. 11489-11494, 2004.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, n.12, p. 1572-1574, 2003.

ROSENTHAL, P.J. Proteases of protozoan parasites. Review. **Adv. Parasitol.**, v.43, p.105-159, 1999.

RUDENSKAYA, G.N.; PUPOV, D.V. Cysteine Proteinases of Microorganisms and Viruses. **Biokhimiya**, v. 73, n. 1, p. 3-17, 2008.

RUSZCZYK, A.; FORLENZA, M.; JOERINK, M.; RIBEIRO, C.M.; JURECKA, P.; WIEGERTJES, G.F. *Trypanoplasma borreli* cysteine proteinase activities support a conservation of function with respect to digestion of host proteins in common carp. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 32, n.11, p. 1348-61,2008b.

RUSZCZYK, A.; FORLENZA, M.; SAVELKOUL, H.F.; WIEGERTJES, G.F. Molecular cloning and functional characterization of a cathepsin L-like proteinase from the fish kinetoplastid parasite *Trypanosoma carassii*. **Fish Shell Fish Immunol.**, v. 24, n. 2, p. 205-214, 2008a.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.120, n. 1, p. 1-21. 2002, Erratum in: **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.121, n. 1, p.159. 2002.

SAKANARI, J.A.; NADLER, S.A.; CHAN, V.J.; ENGEL, J.C.; LEPTAK, C.; BOUVIER, J. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. **Exp. Parasitol.**, v. 85, n. 1, p. 63-76, 1997.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O.E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 103, n. 3, p. 697-703, 2008.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O.E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, v. 82, n. 2, p. 363-366, 1996.

SALDAÑA, A.; SOUSA, O.E.; ORN, A. Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panama: humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. **Scand. J. Immunol.**, v. 42, n. 6, p.644-50, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1, p. 1-116.

SATO, I.; KAWASHIMA, S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. **Biol. Chem.**, v. 382, n. 5, p. 743–751, 2001.

SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, s. 1, p. 75-85, 2007. Erratum in: **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n. 8, 2 p. following 1009, 2007.

SCHOFIELD, C.; DUJARDIN, J.P. Theories on the evolution of *Rhodnius*. **Actualidades Biologicas**, v.21, n. 71, p. 197-183, 1999.

SCHOTTELIUS, J. Contribution to the characterization of South American Tripanosomatidae. I. The importance of lectins, neuraminic acid and neuraminidase for the differentiation of trypanosomes and leishmania from the New World. **Zool. Ariz.**, v. 223, n. 172, p. 67-81, 1989.

SCHOTTELIUS, J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the basis of their sialic acid content. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 35, n. 3, p. 160-162, 1984.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 38, n. 4, p. 323-327, 1987.

SCHOTTELIUS, J.; MARINKELLE, C.J.; GOMEZ-LEIVA, M.A. Comparative investigations of Latin American trypanosomes with lectins and complement lysis test. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 37, n. 1, p. 54-58, 1986.

SCHOTTELIUS, J.; MÜLLER, V. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins in combination with complement lysis. **Acta Trop.**, v. 41, n. 1, p. 29-38, 1984.

SCORZA, C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, p. 371-378, 1986.

SEHGAL, R.N.; JONES, H.I.; SMITH, T.B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Mol. Ecol.**, v. 10, n. 9, p. 2319-2327, 2001.

SELZER, P.M.; PINGEL, S.; HSIEH, I.; UGELE, B.; CHAN, V.J.; ENGEL, J.C.; BOGYO, M.; RUSSELL, D.G.; SAKANARI, J.A.; MCKERROW, J.H. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 20, p. 11015-11022, 1999.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; SILVA, A.G.; JUNIOR, S.F.; SOUZA, M.A.; KESPER, N.; BOTELHO-FILHO, A.; UMEZAWA, E.S. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox Sang.**, v. 87, n. 3, p. 204-207, 2004.

SIMPSON, A.G.; ROGER, A.J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 30, n. 1, p. 201-212, 2004a.

SIMPSON, A.G.; ROGER, A.J. The real 'kingdoms' of eukaryotes. **Curr. Biol.**, v. 14, n. 17, p. 693-696, 2004b.

SIMPSON, A.G.; STEVENS, J.R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

SMITH, L.E.; UEMURA, H.; EICHINGER, D. Isolation and expression of an open reading frame encoding sialidase from *Trypanosoma rangeli*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 79, n. 1, p. 21-33, 1996.

SNOEIJER, C.Q.; PICCHI, G.F.; DAMBROS, B.P.; STEINDEL, M.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P.; LORENZINI, D.M.; GRISARD, E.C. *Trypanosoma rangeli* Transcriptome Project: Generation and analysis of expressed sequence tags. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 1, 2004.

SOUSA, O. E. *Trypanosoma rangeli* in Panama. **Ann. Rept. Gorgas Mem. Lab.**, p. 16, 1966.

SOUSA, O.E.; DAWSON, G.A. Trypanosome infections in the marmoset (*Saguinus Geoffroyi*) from the Panama Canal Zone. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 25, n. 3, p. 407-409, 1976.

SOUSA, O.E.; JOHNSON, C.M. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in triatomines (Hemiptera: Reduviidae) collected in the Republic of Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 22, n. 1, p. 18-23, 1973.

SOUSA, O.E.; LOMBARDO, M.; SALDAÑA, A. *Trypanosoma rangeli* sialidase: lack of activity in stocks from Panama and other regions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p.241-243, 2005.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 83, n. 2, p. 141-152, 1996.

SOUZA, A.E.; WAUGH, S.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **FEBS Lett.**, v. 311, n. 2, p. 124-127, 1992.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688-2690, 2006.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; DE MENEZES, C.L.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, A.J. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, n. 1, p. 71-79, 1993.

STEINDEL, M.; DIAS-NETO, E.; PINTO, C.J.; GRISARD, E.C.; MENEZES, C.L.; MURTA, S.M.; SIMPSON, A.J.; ROMANHA, A.J. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 41, n. 3, p. 261-267, 1994.

STEINDEL, M.; PINTO, J.C.; TOMA, H.K.; MANGIA, R.H.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A.J. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasythrix*) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 73-79, 1991.

STEVENS, J.R.; GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitol. Today**, v.15, p. 432-437, 1999.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.; GIBSON, W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 669-676, 1998.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; DOVER, G.A.; GIBSON, W. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 118, p. 107-116, 1999b.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; SCHOFIELD, C.J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Tripanosomatidae. **Adv. Parasitol.**, v. 48, p. 1-56, 2001.

STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.M.G.; BINGLE, L.E.; GIBSON, W. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, p. 749-757, 1999a.

STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 9, n. 2, p. 93-104, 1983.

SUÁREZ, B.A.; CUERVO, C.L.; PUERTA, C.J. The intergenic region of the histone *H2A* gene supports two major lineages of *Trypanosoma rangeli*. **Biomedica**, v. 27, n. 3, p. 410-418, 2007.

SVOBODOVÁ, M.; ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; OBORNÍK, M.; LUKES, J.; VOTÝPKA, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, n. 2, p. 423-432, 2007.

SWOFFORD, D.L. **PAUP***: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods, Version 4b6. New York, NY: Sinauer Press, 1998.

SZALLIES, A.; KUBATA, B.K.; DUSZENKO, M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 517, n. 1-3, p. 144-150, 2002.

TANAKA, T. Differential diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infection by PCR of cysteine proteinase genes. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 71, n. 9, p. 903-909, 1997.

TANAKA, T.; KANEDA, Y.; IIDA, A.; TANAKA, M. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. **Int. J. Parasitol.**, v. 24, n. 2, p. 179-188, 1994.

TOALDO, C.B.; STEINDEL, M.; SOUSA, M.A.; TAVARES, C.C. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding beta-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 113-121, 2001. Erratum in: **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 593, 2001.

TOMÁS, A.M.; KELLY, J.M. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 76, n. 1-2, p. 91-103, 1996.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 98-111, 2000.

TURK, V.; TURK, B.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KOS, J. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 42, p. 285-303, 2002.

UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; KESPER, N.J.R.; COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.; CAMARGO, M.E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2143-2147, 1996.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. **J. Parasitol.**, v. 71, n. 4, p. 409-414, 1985.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 28, n. 3, p.166-169, 1986.

UREN, A.G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L.A.; PISABARRO, M.T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E.V.; DIXIT, V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Mol. Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-967, 2000.

URREA, D.A.; CARRANZA, J.C.; CUBA, C.A.; GURGEL-GONCALVES, R.; GUHL, F.; SCHOFIELD, C.J.; TRIANA, O.; VALLEJO, G.A. Molecular characterizations of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. **Infect. Genet. Evol.**, v. 5, n. 2, p. 123-129, 2005.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CARRANZA, J.C.; LOZANO, L.E.; SANCHEZ, J.L.; JARAMILLO, J.C.; GUALTERO, D.; CASTANEDA, N.; SILVA, J.C.; STEINDEL, M. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Trop.**, v. 81, n. 1, p. 77-82, 2002.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CARRANZA, J.C.; MORENO, J.; TRIANA, O.; GRISARD, E.C. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. **Infect. Genet. Evol.**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 2003.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CARRANZA, J.C.; TRIANA, O.; PÉREZ, G.; ORTIZ, P.A.; MARIN, D.H.; VILLA, L.M.; SUÁREZ, J.; SÁNCHEZ, I.P.; PULIDO, X.; RODRÍGUEZ, I.B.; LOZANO, L.E.; URREA, D.A.; RIVERA, F.A.; CUBA-CUBA, C.; CLAVIJO, J.A. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana. **Biomédica**, v. 27, n. 1, p. 110-118, 2007.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CHIARI, E.; MACEDO, A.M. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Trop.**, v. 72, n. 2, p. 203-212, 1999.

VALLEJO, G.A.; MACEDO, A.M.; CHIARI, E.; PENA, S.D. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, n. 2, p. 245-253, 1994.

VALLEJO, G.A.; MARINKELLE, C.J. Estudio sobre la presencia de neuraminidasa en *Rhodnius prolixus* infectado con *Trypanosoma rangeli*. **Rev. Lat. Microbiol.**, v. 34, p. 91-94, 1992.

VALLEJO, G.A.; MARINKELLE, C.J.; GUHL, F.; DE SÁNCHEZ, N. Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*. **Rev. Bras. Biol.**, v. 48, n. 3, p. 577-587, 1988.

VARGAS, N.; SOUTO, R.P.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A.; ZINGALES, B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. **Exp. Parasitol.**, v. 96, n. 3, p. 147-159, 2000.

VASQUEZ, A.M.; SAMUDIO, F.E.; SALDAÑA, A.; PAZ, H.M.; CALZADA, J.E. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panamá. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 46, n. 4, p. 217-222, 2004.

VÁSQUEZ, J.E.; KRUSNELL, J.; ORN, A.; SOUSA, O.E.; HARRIS, R.A. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas' disease. **Scand. J. Immunol.**, v. 45, n. 3, p. 322-330, 1997.

VENTURA, R.M.; PAIVA, F.; SILVA, R.A.; TAKEDA, G.F.; BUCK, G.A.; TEIXEIRA, M. M. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Exp. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 37-48, 2001.

VERMELHO, A.B.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.; NOGUEIRA DE MELO, A.C.; SILVA-JUNIOR, F.P.; BOM, E.P.; BRANQUINHA, M.H. Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. **Curr. Enzym. Inhib.**, v. 3, p. 19-48, 2007.

VIOLA, L.B.; ALMEIDA, R.S.; FERREIRA, R.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; RODRIGUES, A.C.; PAIVA, F.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, MM. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. **Parasitology**, p.1-11.Epub ahead of print, Nov 4, 2008b.

VIOLA, L.B.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; FERREIRA, R.C.; RODRIGUES, A.C.; FREITAS, R.A.; DUARTE, M.R.; GREGO, K.F.; BARRETT, T.V.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M. 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**, v. 135, n. 5, p. 595-605, 2008a.

VON DER HEYDEN, S.; CHAO, E.E.; VICKERMAN, K.; CAVALIER-SMITH, T. Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of euglenozoa. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 402-416, 2004.

VOTÝPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M.; LUKES, J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology**, v.125, n. 3, p. 253-263, 2002.

WHITTEN, M.; SUN, F.; TEW, I.; SCHAUB, G.; SOUKOU, C.; NAPPI, A.; RATCLIFFE, N. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 37, n. 5, p. 440-452, 2007.

WHITTEN, M.M.; MELLO, C.B.; GOMES, S.A.; NIGAM, Y.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. **Exp. Parasitol.**, v. 98, n. 1, p. 44-57, 2001.

WINCKER, P.; BOSSENO, M.F.; BRITTO, C.; YAKSIC, N.; CARDOSO, M.A.; MOREL, C.M.; BRENIÈRE, S.F. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 124, n. 3, p. 419-423, 1994.

WRIGHT, A.D.; LI, S.; FENG, S.; MARTIN, D.S.; LYNN, D.H. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 69-76, 1999.

YEO, M.; ACOSTA, N.; LLEWELLYN, M.; SÁNCHEZ, H.; ADAMSON, S.; MILES, G.A.; LÓPEZ, E.; GONZÁLEZ, N.; PATTERSON, J.S.; GAUNT, M.W.; DE ARIAS, A.R.; MILES, M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 2, p.225-233, 2005.

YURCHENKO, V.Y.; LUKES, J.; TESAROVÁ, M.; JIRKŮ, M.; MASLOV, D.A. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus crithidia. **Protist**, v. 159, n. 1, p. 99-114, 2008.

ZAJA, A.; FERREIRA, E.; PASSAGLIA, L. **Biologia Molecular Básica**. 3rd ed. Porto alegre, RS: Editorial Mercado Aberto, 2003. p. 102.

ZELEDÓN, R. Hallazgo de formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, en glándulas salivares de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, salvadoreños. **Rev. Biol. Trop.**, v. 4, p. 1- 8, 1956.

ZELEDÓN, R. Tripanosomiasis rangeli. **Rev. Biol. Trop.**, v. 2, p. 231, 1954.

ZICCARDI, M.; DE OLIVEIRA, R.L.; ALVES, M.C.; DA CRUZ, M.F. *Trypanosoma saimirii* Rodhain, a junior synonym of *Trypanosoma rangeli* Tejera. **J. Parasitol.**, v. 91, n. 3, p. 653-656, 2005.

ZICCARDI, M.; OLIVEIRA, R.L. Polimorphism in Tripomastigotes of *Trypanosoma (Megatrypanum) minascense* en the Blood of Experimentally Infected Squirrel Monkey and Marmosets. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 649-653, 1999.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94 s. 1, p. 159-164, 1999.

ZUÑIGA, C.; PALAU, T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DE DIEGO, J.A. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. **Trop. Med. Int. Health**, v. 2, n. 5, p. 482-487, 1997.