Carla Monadeli Filgueira Rodrigues

**Tripanossomas de ungulados no Brasil e na África:
novas abordagens em estudos epidemiológicos de
genótipos, vetores e reservatórios, e
patologia de isolados Brasileiros**

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

Área de concentração: Parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria
Geraldes Teixeira

Versão original

**São Paulo
2016**

RESUMO

Rodrigues, CMF. Tripanossomas de ungulados no Brasil e na África: Novas abordagens em estudos epidemiológicos de genótipos, vetores e reservatórios, e patologia de isolados brasileiros. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

Os tripanossomas africanos são responsáveis por doenças graves em humanos (*T. brucei* ssp.) e animais (*T. vivax*, *T. congolense*, *T. simiae*, *T. suis*, *T. b. brucei* e *T. evansi*). Estas espécies são transmitidas ciclicamente pela mosca tsé-tsé, exceto *T. evansi*, enquanto *T. vivax* pode ser transmitido ciclicamente e mecanicamente por outras moscas hematófagas. A Tripanossomíase Animal Africana (AAT) é causada por *T. congolense* e *T. vivax* e constitui a doença mais importante para bovinos na África subsariana. Não esperado para um grupo que alberga tripanossomas patogênicos para humanos e animais de produção extensivamente estudado, um número crescente de novos tripanossomas foi revelado com o uso de novos métodos de diagnósticos moleculares sensíveis e com alto poder discriminatório associados à análise filogenética.

A transmissão mecânica permitiu a disseminação de *T. evansi* e *T. vivax* da África para América do Sul, onde a tripanossomíase causada por *T. vivax* é endêmica. Nos últimos anos, surtos de infecção aguda com distúrbios hematológicos e neurológicos tornou-se comum em bovinos, caprinos e ovinos de áreas não endêmicas. Neste estudo, foram relatados, pela primeira vez, os aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da tripanossomíase causadas por *T. vivax* em bezerros no Semiárido brasileiro. Os resultados revelaram de doença aguda ao estabelecimento de doenças crônicas em bezerros, e sugeriu a transmissão transplacentária. Em cabras infectadas experimentalmente, *T. vivax* atingiu o tecido nervoso, que é a causa da doença progressiva clínica e alterações do líquido céfalo-raquidiano e lesões anatômicas e histopatológicas do sistema nervoso central. Neste estudo, também foi confirmado que *T. vivax* provoca distúrbios reprodutivos em animais infectados natural e experimentalmente. Pela primeira vez, o DNA de *T. vivax* foi detectado na placenta, fluidos amnióticos e tecidos fetais confirmando a transmissão transplacentária. Além disso, lesões histológicas em fetos e placentas corroboraram o envolvimento de *T. vivax* na patogênese de falhas reprodutivas. Embora o anestro seja frequentemente relatado em animais infectados com *T. vivax*, os órgãos reprodutivos de fêmeas não foi investigado antes de nossa infecção experimental que mostrou que cabras infectadas com *T. vivax* permanecem em anestro e exibiram importantes alterações nos ovários.

Na África, ungulados selvagens e equídeos (principalmente jumentos) são considerados reservatórios de *T. vivax*. No Brasil, reservatórios silvestres são desconhecidos enquanto bubalinos e bovinos de corte devem ser portadores assintomáticos. O Semiárido brasileiro possui o maior rebanho de jumentos na América do Sul. Nós investigamos o papel de jumentos errantes nos surtos de tripanossomíase em bovinos leiteiros e ovinos na região. Pela primeira vez no Brasil, *T. vivax* foi detectado em jumentos (16,6% -TviCATL-PCR), todos com parasitemia patente e alterações hematológicas. Foi então realizada uma infecção experimental em jumentos com um isolado altamente virulento e a parasitemia foi exclusivamente detectável por PCR, corroborando a tolerância de jumentos para *T. vivax* como mostrado na África, e sugerindo que eles podem agir como portadores saudáveis, servindo como fonte de *T. vivax* para os animais susceptíveis. Nós também avaliamos a prevalência de *T. vivax* em búfalos nas planícies da Amazônia brasileira e Llanos venezuelanos, que possuem os maiores rebanhos na América do Sul. Este foi o primeiro estudo longitudinal e molecular de *T. vivax* em bubalinos. Os resultados revelaram alta prevalência e confirmaram que búfalos são portadores saudáveis de *T. vivax* nessas áreas de estabilidade enzoótica. No entanto, um surto de doença aguda grave ocorreu nos Llanos da Venezuela, mostrando que a infecção assintomática pode evoluir para doença grave em bubalinos submetidos a condições de estresse e co-infectados com outros hemoparasitas.

Antes deste trabalho, estudos genéticos de *T. vivax* eram restritos a uma pequena amostragem e marcadores incapazes de resolver a história recente de *T. vivax* na América do Sul. Neste trabalho foi realizada uma comparação dos parasitas da América do Sul e África por genotipagem multilocus de microsatélites que suportaram a hipótese de que as populações da América do Sul são derivadas de ancestrais comuns recentemente introduzidos do Oeste da África. Pela primeira vez, as pequenas diferenças genéticas distinguiram *T. vivax* do Oeste da África e da América do Sul, onde foram identificados independentemente de endemicidade e condições clínicas do gado infectado com genótipos altamente semelhantes.

Existem dados relevantes, indicando que há mais tripanossomas transmitidos pela mosca tsé-tsé a serem descobertos na África, e esta possibilidade estimulou nossa busca por tripanossomas patogênicos em moscas tsé-tsé e animais selvagens em Moçambique. Foi realizado o primeiro estudo molecular de tripanossomas em moscas tsé-tsé de Moçambique. Moscas tsé-tsé foram coletadas no Parque Nacional da Gorongosa (PNG) e na Reserva Nacional do Niassa (RNN) e submetidos ao método FFLB para a detecção de tripanossomas conhecidos. Uma grande quantidade de perfis FFLB desconhecidos indicou a existência de vários tripanossomas novos que exigem uma melhor caracterização. A análise

também revelou todos os tripanossomas africanos patogênicos conhecidos para ungulados, incluindo *T. suis* recentemente redescoberto, em *G. morsitans* e *G. pallidipes* no PNG e RNN. As espécies mais prevalentes no intestino médio da mosca tsé-tsé foram *T. congolense* Savannah, seguido por *T. simiae*, *T. simiae* Tsavo, *T. godfreyi* e *T. congolense* Kilifi. Tsé-tsé de ambas as áreas também abrigavam *Trypanozoon* spp., *T. suis* (baixa prevalência) e *T. vivax*, que foi detectado, predominante, nas probóscides das moscas tsé-tsé. A diversidade de *T. vivax* descoberta por estudos anteriores no Leste da África têm sugerido um complexo de genótipos contrastantes com a alta homogeneidade de genótipos do Oeste da África e América do Sul. Neste estudo, utilizando o MDS (escalonamento multidimensional), análises filogenéticas de gGAPDH e genotipagem com sequências de ITS rDNA, nós caracterizamos *T. vivax* previamente identificado pelo FFLB em moscas tsé-tsé e em animais domésticos e selvagens de Moçambique, e comparamos com amostras de outros países do Oeste e Leste da África e América do Sul. Nossos resultados revelaram genótipos divergentes mais relacionados com *T. vivax*-like, corroborando o grande repertório genético no Leste da África e a reduzida diversidade de isolados no gado do Oeste da África e América do Sul. Mais estudos são necessários em áreas preservadas do Leste da África para verificar o papel de *T. vivax*-like na epidemiologia da AAT. As moscas tsé-tsé do PNG e RNN apresentaram infecção por *T. suis* (6%), como detectado por FFLB, e foram submetidos à análise de gGAPDH. Os resultados identificaram *T. suis* e *T. suis*-like formando um agrupamento monofilético, promovendo assim, pela primeira vez, esclarecimentos filogenéticos de que o subgênero *Pycnomonas* é um complexo de espécies e genótipos. *T. suis*-like identificados neste estudo são novas espécies encontradas em *G. morsitans* e *G. pallidipes*, e em ungulados selvagens (Cape búfalos e antílopes) e domésticos (bovinos e caprinos).

Ao todo, os dados deste estudo amplamente contribuíram para a compreensão da epidemiologia, patologia, reservatórios, diversidade genética e história evolutiva de *T. vivax* na América do Sul e África. Além disso, a descoberta de novos genótipos e espécies relacionadas com *T. vivax* (subgênero *Duttonella*) e *T. suis* (*Pycnomonas*) e uma grande amostragem de espécies do subgênero *Nannomonas* identificados em Moçambique, provê novas linhas de investigação sobre a diversidade, patogenicidade, evolução e taxonomia de tripanossomas africanos.

Palavras-chaves: Tripanossomas Africanos. Transmissão Transplacentária. Reservatórios. Moscas tsé-tsé. Diversidade genética. Filogenia.

ABSTRACT

Rodrigues, CMF. Trypanosomes of ungulates in Brazil and Africa: new approaches in epidemiological studies of genotypes, vectors and reservoirs, and pathology of Brazilian isolates. [Thesis Ph.D (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

African trypanosomes cause severe diseases in humans (*T. brucei* ssp.) and livestock (*T. vivax*, *T. congolense*, *T. simiae*, *T. suis*, *T. b. brucei* and *T. evansi*). These species are mostly cyclically transmitted by tsetse fly, except *T. evansi*, whereas *T. vivax* can be cyclically and mechanically transmitted by other bloodsucking flies. Animal African Trypanosomiasis (AAT) caused by *T. congolense* and *T. vivax* are the most important livestock diseases in sub-Saharan Africa. Unexpectedly for a group that harbours extensively studied human and livestock pathogenic trypanosomes, an increasing number of novel trypanosomes has been unveiled with the use of high sensitive and discriminatory new generic molecular diagnostic methods associated to phylogenetic analysis.

Mechanical transmission allowed the spread of *T. evansi* and *T. vivax* from Africa to South America, where trypanosomiasis caused by *T. vivax* is endemic. In recent years, outbreaks of acute infection with haematological and neurological disorders became common in cattle, goats and sheep of non-endemic areas. In this study, clinical, epidemiological, and pathological aspects of trypanosomiasis caused by *T. vivax* in calves were reported for the first time in the Brazilian Semiarid. Results revealed prevalent acute and the establishing of chronic disease in calves, and suggested transplacental transmission of *T. vivax*. In experimentally infected goats, *T. vivax* reached the nervous tissue, which is the cause of progressive clinical and changes in cerebrospinal fluid and anatomical and histopathological central nervous system lesions. We confirmed that *T. vivax* induces reproductive disorders in field and experimentally infected animals. For the first time, DNA of *T. vivax* was detected in the placenta, amniotic fluid and fetal tissues confirming the transplacental transmission. In addition, histological lesions in fetuses and placenta corroborate the involvement of *T. vivax* in the pathogenesis of reproductive failures. Although anestrus is frequently reported in animals infected with *T. vivax*, reproductive organs of females were not investigated before our experimental infection study showing that *T. vivax* infected goats remained in anestrus and exhibited important disturbances in the ovaries.

In Africa, wild ungulates and equines (mainly donkeys) are thought to be reservoirs of *T. vivax*. In Brazil, wild reservoirs are unknown while water buffaloes and beef cattle are supposed to be health carriers. The Brazilian Semiarid is the home of the largest herd of donkeys in South America. We investigated the role of wandering donkeys in the trypanosomiasis outbreaks in dairy cattle and sheep in this region. For the first time in Brazil, *T. vivax* was detected in donkeys (16.6%-TviCATL-PCR), all lacking patent parasitemia and hematological changes. Infection of donkeys with a highly virulent isolate was exclusively detectable by PCR, corroborating the tolerance of donkeys to *T. vivax* as shown in Africa, and suggesting that they could act as healthy carrier serving as source of *T. vivax* for susceptible animals. We also evaluate the prevalence of *T. vivax* in water buffaloes in the lowlands of Brazilian Amazonia and Venezuelan Llanos, large floodplains home of the largest herds in South America. This was the first comprehensive and longitudinal molecular survey of *T. vivax* in water buffaloes. Results revealed high prevalence and confirmed that water buffaloes are health carriers of *T. vivax* in these areas of enzootic stability. However, an outbreak of severe acute disease occurred in Venezuelan Llanos, showing that symptomless infection could evolve to severe disease in water buffaloes submitted to stressful conditions and concurrently infected with other hemoparasites.

Before this study, genetic studies of *T. vivax* were restricted to a small sampling and markers unable to resolve the recent history of *T. vivax* in the New World. Here, the comparison of parasites from South America and Africa by microsatellite multilocus genotyping supported the hypothesis that the SA populations derived from common ancestors recently introduced from West Africa. For the first time, small genetic differences distinguished between *T. vivax* from West Africa and South America, where highly similar genotypes were identified regardless of endemicity and clinical conditions of the infected livestock.

There are relevant data indicating that there are more tsetse-transmitted trypanosomes to be discovered in Africa, and this possibility stimulated our search for pathogenic trypanosomes in tsetse flies and wild animals in Mozambique. Thus, we performed the first molecular study of trypanosomes in tsetse from Mozambique. Tsetse were collected in the Gorongosa National Park (GNP) and the Niassa National Reserve (NNR) and submitted to the FFLB method for sensitive detection and simultaneous barcoding of known trypanosomes. A large amount of unknown FFLB profiles indicated the existence of several novel trypanosomes that require further

characterization. The analysis also revealed all known African trypanosomes pathogenic for ungulates, including the recently rediscovered *T. suis*, in *G. morsitans* and *G. pallidipes* from both the GNP and NNR. The most prevalent species in tsetse midguts was *T. congolense* Savannah, followed by *T. simiae*, *T. simiae* Tsavo, *T. godfreyi* and *T. congolense* Kilifi. Tsetse from both areas also harboured *Trypanozoon* spp., *T. suis* (low prevalence) and *T. vivax*, which was prevalent in tsetse proboscides. The diversity of *T. vivax* uncovered by previous studies in East Africa has suggested a complex of genotypes contrasting with the high homogeneity of WA and SA genotypes. In this study, using MDS (multidimensional scaling plot), phylogenetic analyses of gGAPDH and genotyping by ITS rDNA sequences we characterized *T. vivax* trypanosomes previously identified by FFLB in tsetse flies and from wild ruminants and livestock from Mozambique, and compared with samples from other countries of EA, WA and SA. Our findings revealed divergent genotypes along with divergent *T. vivax*-like trypanosomes, corroborating large genetic repertoire in EA and reduced diversity in WA and SA livestock. Further studies are required in preserved areas of WA, and to address the importance of *T. vivax*-like trypanosomes in the epidemiology of AAT. Tsetse flies from the GNP and NNR infected with *T. suis* (6%) as detected by FFLB were submitted to gGAPDH analysis. Results identified *T. suis* and *T. suis*-like trypanosomes forming a monophyletic assemblage, then providing for the first time phylogenetic insights indicating that the subgenus *Pycnomonas* is a complex of species and genotypes. *T. suis*-like trypanosomes identified in this study are novel species harbored by *G. morsitans* and *G. pallidipes*, and by wild (Cape buffalo and antelopes) and domestic (cattle and goats) ungulates.

Altogether, data from this study largely contributed to the understanding of epidemiology, pathology, reservoirs, genetic diversity, and evolutionary history of *T. vivax* in South America and Africa. In addition, the discovery of new genotypes and species related to *T. vivax* (subgenus *Duttonella*) and *T. suis* (*Pycnomonas*) and the large sampling of species of the subgenus *Nannomonas* identified in Mozambique, open new lines of investigation into the diversity, pathogenicity, evolution and taxonomy of African trypanosomes.

Keywords: African tripanosomes. Transplacental transmission. Reservoirs. Tsetse fly. Genetic diversity. Phylogeny.

1 Introdução

1.1 O Gênero *Trypanosoma*.

Os tripanossomatídeos formam um grupo monofilético que corresponde à família Trypanosomatidae, que pertence ao reino Excavata, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1998, 2004; Honigberg, 1963). A família Trypanosomatidae alberga protozoários flagelados classificados tradicionalmente na ordem Kinetoplastida, que possuem como principal característica a presença do cinetoplasto, uma região especializada da sua única mitocôndria, que é constituída por moléculas concatenadas de DNA e localizada na base do flagelo (Vickerman, 1976). A nova classificação da classe Kinetoplastea a subdivide em duas subclasses, Prokinetoplastina e Metakinetoplastina, esta última dividida em Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida (Moreira et al., 2004). A família Trypanosomatidae alberga parasitas monoxênicos ou heteroxênicos de plantas e animais invertebrados e vertebrados; já a subordem Bodonina, atualmente um grupo parafilético, compreende parasitas de peixes e organismos de vida livre adaptados a diversos ambientes aquáticos e terrestres (Deschamps et al., 2011; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008).

Na família Trypanosomatidae são atualmente reconhecidos 18 gêneros, definidos de acordo com parâmetros clássicos (morfologia, hospedeiro de origem e ciclo de vida) e filogenéticos (monofilia e suporte): (1) *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma*, cujos representantes possuem ciclo de vida heteroxênico e do qual participam hospedeiros invertebrados e vertebrados ou vegetais (Leonard et al., 2011; Lukes et al., 2014; Maslov et al., 2013; Porcel et al., 2014); (2) *Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Wallacemonas* são parasitas monoxênicos, possuindo apenas um tipo de hospedeiro (invertebrado) em seus ciclos biológicos (Borghesan et al., 2013; Flegontov et al., 2013; Kostygov et al., 2014; Lukes et al., 2014; Maslov et al., 2013; Merzlya et al., 2001 ; Svobodova et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Vickerman, 1976; Votypka et al., 2014, 2013; Yurchenko et al., 2016).

Os tripanossomatídeos apresentam diversas peculiaridades que podem ser únicas para este grupo: a organização estrutural e replicação complexa do DNA mitocondrial; a composição do citoesqueleto; a compartimentalização da glicólise em “glicossomas”, organelas encontradas em todos os membros da ordem Kinetoplastida até agora examinados e associadas a nove enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e glicerol; ancoragem de proteínas na membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI); endocitose/exocitose de macromoléculas via bolso flagelar; a hipermodificada “base J”, invariavelmente presente nas repetições teloméricas, que ocorre em todos os flagelados da ordem

Kinetoplastida analisados e alguns flagelados unicelulares estreitamente relacionados com tripanossomatídeos; e a transcrição policistrônica onde um ou vários genes são transcritos simultaneamente e processamento de mRNAs por mecanismo de trans-splicing (Borst, 2016; Borst, Sabatini, 2008; de Souza et al., 2009; Gull, 2001; Haanstra et al., 2016; Hury et al., 2009; Jensen, Englund, 2012; Liu, Englund, 2007; Ralston, Hill, 2008; Ralston et al., 2009; Stuart et al., 2005).

O estudo das relações filogenéticas, quando auxiliado pelo estudo das características biológicas, como ciclos de vida, mecanismos de transmissão, infecciosidade, patogenicidade e cultivo e diferenciação “in vitro”, constituem bons parâmetros para identificar e classificar tripanossomas em geral. Análises filogenéticas são fundamentais para entender eventos importantes como a origem do parasitismo e dos ciclos de vida heteroxênicos. Conhecendo a filogenia dos tripanosomas podemos sugerir as possíveis trocas e restrição aos hospedeiros, estruturas ecogeográficas, os possíveis insetos vetores, bem como a transmissão por hospedeiros que compartilham o mesmo ambiente, o que desempenha um importante papel na evolução dos tripanosomas.

Os tripanosomas são parasitas hemoflagelados de grande importância para humanos e animais domésticos e estão entre os agentes mais bem estudados das doenças parasitárias conhecidas. O gênero *Trypanosoma* alberga numerosas espécies que parasitam ampla diversidade de hospedeiros, descritas em todas as classes de vertebrados, peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. Essas espécies são transmitidas por uma diversidade de vetores, incluindo organismos das ordens Diptera (moscas e mosquitos), Hemiptera (triatomíneos), Siphonaptera (pulgas), Parasitiforme (carrapatos) e anelídeos (sanguessugas) (Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Simpson et al., 2006). A variedade de vetores, associada à ampla distribuição geográfica, nichos ecológicos, diferentes ecótopos e mecanismos de transmissão, reflete a imensa diversidade biológica do gênero. No entanto, a maioria dos estudos nessa área restringe-se aos parasitas de importância médica e veterinária. É muito limitado o conhecimento da diversidade de tripanossomas que circulam em animais silvestres, mesmo entre mamíferos que é o grupo mais estudado (Auty et al., 2012; Lima et al., 2012; 2013, 2015; Maia da Silva et al., 2004a, b, 2009; Rodrigues et al., 2003, 2008).

As espécies da família Trypanosomatidae apresentam grande diversidade de formas (amastigota, epimastigota, promastigota, tripomastigota e opistomastigota), definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (Wallace, 1966), que podem diferenciar de acordo com as fases dos ciclos de vida nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (Wallace, 1966). Tradicionalmente, a taxonomia da família Trypanosomatidae foi baseada em dados morfológicos e morfométricos (medidas do comprimento e largura do corpo, do núcleo e cinetoplasto), além do hospedeiro de origem. Para os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (espécies heteroxênicas, foram também acrescentadas informações sobre

ciclos biológicos e patogenia, além de hospedeiros, vetores, aspectos ecológicos e filogeográficos (Hoare, Wallace, 1966).

Nas espécies do gênero *Trypanosoma*, as formas tripomastigotas são encontradas nos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) e invertebrados (tripomastigotas metacíclicos), enquanto que as demais, espécie-dependentes, ocorrem nos vertebrados (amastigotas intracelulares) e invertebrados (promastigotas e epimastigotas) (Hoare, 1972).

Estudos empregando sequências gênicas são de grande importância para a compreensão da diversidade e das relações filogenéticas dos tripanossomas. Assim, a primeira questão discutida foi a monofilia do gênero *Trypanosoma* (Lukes et al., 1997; Hughes et al., 2003a, Piontkviska, 2003). Estudos baseados principalmente na SSU rRNA dos genes ribossômicos e genes de gGAPDH, que incluíam espécies representativas da ampla diversidade observada nestes parasitas, confirmaram a origem a partir de um ancestral comum de todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, peixes, anfíbios e répteis (Hamilton et al., 2004; Leonard et al., 2011; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001). Outros estudos baseados em sequências codificadoras de outras proteínas (genes que codificam o fator de alongação 1 α , tripanotiona redutase, β -tubulina e as HSP90 e HSP70) geraram inferências filogenéticas congruentes com aquelas obtidas com os genes de gGAPDH, reforçando assim a monofilia do gênero *Trypanosoma* (Alvarez et al., 1996; Hamilton et al., 2007; Hannaert et al., 1998; Hashimoto et al., 1995; Lukes et al., 2002).

O estudo das relações filogenéticas dos tripanossomas revelou a divisão deste gênero em duas grandes linhagens filogenéticas: Clado aquático e Clado terrestre. No clado aquático estão agrupados tripanossomas de sanguessugas aquáticas e hospedeiros aquáticos (peixes) ou de hospedeiros com hábitos semi-aquáticos (quelônios, anuros, jacarés e ornitorrinco) e, estranhamente, um tripanossoma de camaleão (Dvorakova et al., 2015; Fermino et al., 2015; Ferreira et al., 2007, 2008; Gibson et al., 2005; Hamilton et al., 2005, 2007; Jakes et al., 2001; Lemos et al., 2015; Noyes et al., 1999; Stevens et al., 2001). No Clado terrestre foram posicionados tripanossomas de mamíferos, cobras, lagartos, crocodilos e aves, que foram divididos nos seguintes clados (Figura 1):

Clado Lagartos/Serpentes: transmitidos principalmente por insetos flebotomíneos; os tripanossomas desse grupo foram encontrados parasitando serpentes brasileiras e lagartos da América do Norte e da África (Viola et al., 2008a, 2009).

Clado Crocodiliano: que compreende os tripanossomas isolados de aligatordeos e crocodilídeos (Fermino et al., 2013; Viola et al., 2008b, 2009).

Clado Aves: os tripanossomas de aves distribuem-se em distintas linhagens, cuja variabilidade de espécies vem aumentando nos últimos estudos; pelo menos três grupos de espécies (*T. corvi*, *T. avium* e *T. benetti*) foram identificados. Esta informação ainda é controversa, uma vez que,

dependendo do conjunto de dados e do gene utilizado, pode não se formar um grupo monofilético. Esses parasitas são transmitidos por diversos artrópodes e não apresentam restrição pela espécie de ave hospedeira (Hamilton et al., 2007; Sehgal et al., 2001, 2015; Slapeta et al., 2016; Valkiunas et al., 2011; Votypka et al., 2002).

Clado *T. brucei*: formado por tripanossomas de origem Africana, capazes de infectar diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem. As espécies deste clado são muito divergentes das demais linhagens de tripanossomas de mamíferos e apresentam uma história evolutiva distinta, confinada à África e associada a moscas tsé-tsé (Stevens et al., 1999, 2001).

Clado *T. cruzi*: constituído por duas grandes linhagens de tripanossomas - espécies pertencentes ao subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi* e tripanossomas restritos a morcegos) e espécies relacionadas a *T. rangeli*/*T. conorhini*). A linhagem basal dessas duas linhagens é formada por tripanossomas de marsupiais Australianos (Maia Da Silva et al., 2004a,b, 2007; Lima et al., 2012, 2013, 2015a, b; Hamilton et al., 2012).

Clado *T. theileri*: apresenta *T. theileri* como espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum* (Hoare, 1972) e filogeneticamente validado como um clado exclusivo de tripanossomas de ruminantes; reúne espécies que geralmente apresentam especificidade pelo hospedeiro vertebrado. Esse clado possui uma ampla distribuição mundial e suas espécies apresentam tabanídeos e hipoboscídeos como principais vetores biológicos (Rodrigues et al., 2006).

Clado *T. lewisi*: compreende tripanossomas que possuem especificidade por hospedeiros vertebrados das ordens Rodentia, Lagomorpha e Insectivora; pulgas são os vetores biológicos (Botero et al., 2013; Hamilton et al., 2005; Tang et al., 2012).

Clado *T. cyclops*: considerado um clado complexo por agrupar tripanossomas isolados de hospedeiros vertebrados muito distintos e geograficamente distantes. É formado por um isolado de macaco da Malásia (*T. cyclops*), um isolado de marsupial da Austrália e alguns isolados de sanguessugas terrestres da família Haemadipsidae. A presença de isolados de sanguessugas nesse grupo sugere que estes anelídeos participem do ciclo de vida destes tripanossomas como hospedeiros invertebrados (Hamilton et al., 2005).

Figura 1- Árvore filogenética dos tripanossomatídeos inferida pelo método ML a partir do gene gGAPDH.

1.2 Tripanossomas de mamíferos.

Os tripanossomas de mamíferos constituem um dos grupos mais bem estudados entre os tripanossomatídeos, uma vez que infectam e causam patologias severas em humanos e em animais domésticos. O homem é afetado pela tripanossomíase humana na África tropical (Doença do sono) e pela Doença de Chagas nas Américas. Em uma revisão realizada por Hoare, 1972, levou em conta o desenvolvimento e diferenciação dos tripanossomas no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, a via de transmissão (via de eliminação das formas metacíclicas), propôs a separação dos tripanossomas de mamíferos nas secções Salivaria e Stercoraria. Os tripanossomas da secção Salivaria, encontrados nas glândulas salivares do vetor, são transmitidos pela **via inoculativa**, enquanto que os da secção Stercoraria desenvolvem-se na parte posterior do intestino do hospedeiro invertebrado, o que determina a **transmissão contaminativa**, isto é, eliminação das formas metacíclicas (sobre a pele ou mucosas), juntamente com as fezes durante o repasto sanguíneo do vetor. Nos hospedeiros vertebrados, a multiplicação dos flagelados varia conforme a espécie, podendo ocorrer sob a forma

amastigota, epimastigota, promastigota ou tripomastigota (Hoare, 1972). Na seção Stercoraria foram posicionadas praticamente todas as espécies que circulam no continente americano, entre eles as dos subgêneros *Megatrypanum* (espécie-tipo *Trypanosoma theileri*), *Schizotrypanum* (*Trypanosoma cruzi*) e *Herpetosoma* (*Trypanosoma lewisi*). Entre os tripanosomas da seção Stercoraria, o *Trypanosoma cruzi* é a única espécie patogênica para o homem na América Latina. Nenhum tripanossoma de origem Americana é considerado patogênico para ungulados. Nessa seção estão classificadas espécies de tripanossomas com distribuição geográfica variável; cosmopolita para *T. theileri* e espécies relacionadas, que infectam ruminantes em todo o mundo (Garcia et al., 2011; Hoare, 1972; Lee et al., 2010; Rodrigues et al., 2003, 2006), enquanto algumas espécies como *T. cruzi* e *T. rangeli* são encontradas apenas nas Américas Central e do Sul (Guhl, Vallejo, 2003; Hoare, 1972; Lima et al., 2015a,b; Maia da Silva et al., 2004a,b, 2007, 2009; Vallejo et al., 2009).

Na seção Salivaria estão reunidos os tripanossomas de origem Africana que acometem o homem (*T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*) e mamíferos de grande importância econômica (*T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. congolense*, *T. simiae* e *T. brucei brucei*). Entre os animais domésticos, uma grande variedade de ungulados (bovinos, bubalinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos) é afetada por essas espécies de tripanossomas, que também circulam entre ungulados selvagens que agem como reservatórios e raramente apresentam sinais clínicos (Auty et al., 2012; Lima et al., 2012, 2013, 2015a, b; Magona et al., 2008; Maia Da Silva et al., 2004a,b, 2007; Masake, 1980; Moloo et al., 1999; Rodrigues et al., 2008;). Estes parasitas são transmitidos ciclicamente pela mosca tsétsé, por inoculação de formas metacíclicas presentes nas glândulas salivares, onde o ciclo do parasita se completa, ou, mecanicamente, por moscas hematófagas (tabanídeos e *Stomoxys*). No hospedeiro vertebrado, os parasitas multiplicam-se sob a forma tripomastigota. *Trypanosoma equiperdum* e *T. evansi* são exceções, pois não se desenvolvem em insetos e são, mesmo na África, apenas transmitidos mecanicamente, respectivamente, por hematófagos e via sexual.

Na seção Salivaria, os tripanosomas africanos de mamíferos foram agrupados nos subgêneros *Duttonella* (*T. vivax*), *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi* e *T. equiperdum*), *Nanomonas* (*T. congolense*, *T. simiae*, *T. simiae*, *T. savo* e *T. godfreyi*) e *Pycnomonas* (*T. suis*). Estudos filogenéticos moleculares posicionaram todas essas espécies em um grupo monofilético denominado clado *T. brucei*, que apresenta exclusivamente espécies de tripanossomas africanos transmitidos por moscas tsétsé (Hamilton et al., 2004, 2007; Stevens et al., 2001).

1.3 Tripanossomas africanos.

O clado *T. brucei* agrupa as espécies que causam a tripanossomíase Africana humana (TAH) e animal (TAA), responsáveis, em alguns casos, por danos devastadores ao homem e animais de interesse

agropecuário. Entre as principais características dos tripanossomas africanos, a variação antigênica se destaca por contribuir para a flutuação nos níveis parasitêmicos, bem como é responsável por induzir a fase crônica da infecção. Ao invadir e interagir com o hospedeiro vertebrado, *T. vivax* estimula a resposta imune do hospedeiro, que responde à infecção com a produção de anticorpos específicos. O enorme repertório de glicoproteínas variantes de superfícies (VSGs) promove o escape do sistema imune, que é de extrema importância na relação parasita/hospedeiro (Jackson et al., 2012).

A associação entre diferentes hospedeiros mamíferos, moscas tsé-tsé e continente Africano são a base que estruturam os estudos filogenéticos e evolutivos dos tripanossomas do clado *T. brucei*. Imagina-se que ancestrais de *T. brucei* apareceram na África, possivelmente parasitando os primeiros mamíferos e ficaram isolados neste continente quando houve a separação da África e das Américas (Stevens, Gibson, 1998). O alto grau de divergência em relação às demais espécies de tripanossomas tem apoiado uma história evolutiva confinada a África e associada à presença de vetores naturais do gênero *Glossina* (moscas tsé-tsé), as quais se distribuem em uma ampla região da África Subsaariana, com grupos de espécies associadas aos diversos ecótopos da região. Existem várias espécies de moscas tsé-tsé que disseminam tripanossomas distintos entre mamíferos silvestres, répteis e aves. Algumas espécies de tripanossomas africanos são específicas de porcos, como *T. simiae*, *T. godfreyi* e *T. suis*, possivelmente devido a uma longa história evolutiva compartilhada com suídeos, uma vez que existe uma preferência no repasto sanguíneo por estes animais, segundo estudos da análise de fonte alimentar (Adams et al., 2006; Clausen et al., 1998; Stephen, 1986).

Os estágios essenciais do ciclo de vida dos tripanossomas africanos ocorrem tanto no vetor como no hospedeiro mamífero. De forma geral, o ciclo de vida inicia-se com a ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas, durante o repasto sanguíneo da mosca tsé-tsé, as quais se diferenciam em formas pró-cíclicas do parasita no intestino. Estes parasitas atravessam a membrana peritrófica e invadem a hemolinfa, quando diferenciam-se em epimastigotas que, em seguida, invadem as glândulas salivares. É nas glândulas salivares que os parasitas se desenvolvem em formas tripomastigotas metacíclicas, formas inoculadas no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo da mosca tsé-tsé. As formas sanguíneas desenvolvem-se e multiplicam-se rapidamente no hospedeiro vertebrado; sua ingestão juntamente com sangue reinicia o ciclo no hospedeiro invertebrado (Coley et al., 2011; Hoare, 1972).

Tradicionalmente, as espécies de tripanossomas africanos foram descritas com base no local de desenvolvimento na mosca tsé-tsé (Figura 2), morfologia dos parasitas na corrente sanguínea, gama de hospedeiros e patogenicidade (Hoare, 1972). Os tripanossomas do clado *T. brucei* são transmitidos por formas infectantes presentes nas glândulas salivares das moscas tsé-tsé e foram divididos em quatro subgêneros, de acordo com os locais de desenvolvimento no vetor (Hoare, 1972). *Trypanosoma*

vivax (espécie-tipo) e *T. uniforme* foram agrupadas no subgênero *Duttonella*; *T. brucei* (espécie-tipo), *T. evansi* e *T. equiperdum* no subgênero *Trypanozoon*; *T. congolense* (espécie-tipo) e *T. simiae* foram agrupados no subgênero *Nannomonas*; e *T. suis* representa a espécie-tipo do subgênero *Pycnomonas*.

Figura 2 - Representação esquemática do local de desenvolvimento de tripanossomas africanos na mosca tsé-tsé.

T. vivax e *T. evansi* podem se propagar por transmissão mecânica em áreas livres da mosca tsé-tsé, uma vez que utilizam outros dípteros hematófagos como vetores, sendo, assim, capazes de infectar um grande número de hospedeiros vertebrados e distribuir-se amplamente. Na África, os tripanossomas são abundantes tanto nas áreas de influência de *Glossina* spp. quanto nas áreas livres desse vetor, nas quais a transmissão é atribuída a insetos hematófagos, principalmente da família Tabanidae. Fora do continente africano, além de tabanídeos, outros dípteros da família Muscidae, como *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*, também estão envolvidos na transmissão mecânica de *T. vivax* e *T. evansi*. Somente *T. evansi* e *T. equiperdum* não se desenvolvem em insetos e são, mesmo na África, apenas transmitidos mecanicamente, respectivamente, por insetos hematófagos e via sexual. Dessas espécies, apenas *T. vivax*, *T. evansi* e *T. equiperdum* são encontrados fora da África. *Trypanosoma evansi* apresenta uma distribuição que abrange América do Sul, Ásia e Europa; *T. vivax* está amplamente difundido na América do Sul e Central; e *T. equiperdum* nas Américas e na Ásia (Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Stevens, 2001, 2008, Wen et al., 2016).

A mosca tsé-tsé associada aos tripanosomas é responsável pelos altos índices de pobreza rural na África Subsaariana, onde a manutenção do gado e outros animais é severamente restringida. A presença da mosca tsé-tsé ocorre em uma área de aproximadamente 8,7 milhões de km² na África Subsaariana, no chamado “cinturão da mosca tsé-tsé”. Sua ampla distribuição é refletida na disseminação da tripanossomíase humana Africana e nagana, que afetam o homem e animais, respectivamente. São milhões de pessoas afetadas pela doença do sono infectadas por *T. b. gambiense*, responsável pela forma crônica da doença no Oeste e centro-África, e por *T. brucei rhodesiense*, responsável pela forma aguda da doença no Leste da África. Para os animais, a situação também é preocupante já que cerca de 50 milhões de bovinos estão em risco de ficarem doentes e 10-30% podem ser infectados e apresentarem sinais clínicos (Holmes, 2013; Malele et al., 2013).

Durante milhões de anos, as espécies do gênero *Glossina* (31 espécies e subespécies, divididas em *Palpalis*, *Morsitans* e *Fusca*) desenvolveram uma estreita associação com as suas fontes naturais de alimentação (hospedeiros selvagens), já que possuem um comportamento estritamente hematófago e requerem alimentação frequente (Krafsur, 2009; Solano et al., 2010). No entanto, a distribuição, prevalência e impacto da mosca tsé-tsé são frequentemente afetados por alterações ambientais causadas pelo homem, que modificam as interações entre o hospedeiro, o parasita e o vetor. No caso das tripanossomíases, estas alterações são um resultado da invasão humana e seu rebanho bovino em áreas selvagens infestadas pela mosca tsé-tsé. Isto criou uma sequência de novos contextos epidemiológicos que está alterando a importância relativa dos ciclos domésticos e silvestres de transmissão de tripanosomas e causando alterações concomitantes no impacto da doença sobre o gado. Estas mudanças na dinâmica da epidemiologia têm gerado um impacto importante sobre as estratégias específicas que precisam ser consideradas para uma área em desenvolvimento e a tripanossomíase, uma vez que, a mosca tsé-tsé tem se adaptado ao recém-criado ciclo doméstico, um ciclo que, em grande parte, depende de animais domésticos como hospedeiros e reservatórios de tripanosomas (Van den Bossche et al., 2001, 2010).

1.3.1 Subgênero *Duttonella* - *Trypanosoma vivax*.

1.3.1.1 Epidemiologia de *Trypanosoma vivax* na África e América do Sul.

A tripanossomíase causada por *T. vivax* é uma doença debilitante que pode ser fatal para alguns animais domésticos, especialmente bovinos e pequenos ruminantes. Na maioria dos países africanos, a mosca tsé-tsé, a tripanossomíase constitui uma barreira para a produção de gado por causar graves perdas econômicas devidas ao retardo do crescimento, aborto, perda de produtividade e morte dos animais afetados, destacando-se ainda os altos custos do tratamento (Angwech et al., 2015;

Auty et al., 2012, 2015; Leta et al., 2016; Losos, Ikede, 1972; Morrison et al., 2016; Muhanguzi et al., 2014; Njiokou et al., 2004).

Existem vários hospedeiros ungulados, domésticos e silvestres, que podem ser infectados por *T. vivax*. Os ungulados silvestres, em geral, são assintomáticos, como é o caso dos búfalos e antílopes (Moloo et al., 1999; Njiokou et al., 2004). Na África, a maioria dos estudos para detectar a presença de *T. vivax* em equídeos foi realizada em Gambia e Etiópia e, nestas regiões, a infecção foi caracterizada por baixa parasitemia, diferindo portanto dos bovinos que, em geral, desenvolvem doença com sintomas severos (Dhollander et al., 2006; Duffy et al., 2009; Hoare, 1972; Pinchbeck et al., 2008).

Na África, *T. vivax* pode ser transmitido mecânica e ciclicamente (exclusivamente por moscas tsé-tsé). O ciclo de desenvolvimento de *T. vivax* acontece, exclusivamente, na probóscide e bomba cibarial adjacente da mosca tsé-tsé onde ocorre a diferenciação das formas tripomastigotas em formas epimastigotas, e, em seguida, o desenvolvimento de formas tripomastigotas metacíclicas, que são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado no momento em que a mosca tsé-tsé se alimenta. A presença de *T. vivax* nas proboscides da mosca tsé-tsé foi detectada em vários estudos por microscopia de luz e métodos moleculares (Adams et al., 2010a; Hamilton et al., 2008; Njiru et al., 2005). *Trypanosoma vivax* encontra-se difundido em toda a América do Sul (Desquesnes, 2004; Garcia et al., 2006; Osorio et al., 2008; Ventura et al., 2001) e África Subsaariana. Os países africanos endêmicos para *T. vivax* incluem regiões áridas e semiáridas livres de moscas tsé-tsé (Dagnachew et al., 2014; Magona et al., 2008).

A capacidade de transmissão mecânica de *T. vivax* permitiu ao parasita estabelecer-se fora da África, adaptar-se a novos hospedeiros na ausência do vetor natural, como *Stomoxys* spp. e *Tabanus* spp., e disseminar-se nas Américas Central e do Sul. Provavelmente, colonizadores europeus introduziram *T. vivax* nas Américas, juntamente com o gado trazido do Oeste da África (Cortez et al., 2009; Ventura et al., 2001). Assim, a presença de *T. vivax* foi relatada em bovinos da Guiana Francesa (Leger, Vienne, 1919), Venezuela (1920), Ilha de Guadalupe e Martinica (1926 e 1929), Suriname (1938) e Guiana (1952) (Jones, Davila, 2001), Colômbia (Dirie et al., 1993), Panamá (Johnson, 1941), Pantanal da Bolívia (Gonzales et al., 2007), Argentina (Monzón et al., 2008, 2011, 2013), Costa Rica (Oliveira et al., 2009) e Equador (Ortega-Montalvo et al., 2014). Em El Salvador, Peru e Paraguai existem estudos com evidência sorológica da presença de *T. vivax* (Jones, Davila, 2001; Osorio et al., 2008). No Brasil, *T. vivax* foi inicialmente diagnosticado na região amazônica em 1972 no Estado do Pará, onde o parasita foi detectado em esfregaços de sangue de um búfalo-aquático, com histórico de febre e perda de peso (Shaw, Lainson, 1972). Algum tempo depois, foi relatada a ocorrência de um surto da tripanossomíase no gado no Pantanal de Mato Grosso (Silva et al., 1995, 1996). Em 2002, foi descrito o primeiro surto da tripanossomíase no Semiárido brasileiro,

caracterizado por altas taxas de morbidade, mortalidade e perdas econômicas (Batista et al., 2007). Desde então, vários relatos têm mostrado que a tripanossomíase causada por *T. vivax* está em expansão no Brasil, tendo sido diagnosticada em vários estados como Tocantins (Linhares et al., 2006), Paraíba (Batista et al., 2007, 2009; Galiza et al., 2011), Maranhão (Guerra et al., 2008), Minas Gerais (Carvalho et al., 2008) e Rio Grande do Sul (Da Silva et al., 2009). Neste último estado ocorreu a primeira descrição de *T. vivax* em equinos no Brasil (Da Silva et al., 2011).

Em regiões endêmicas da América do Sul, a infecção por *T. vivax* em bovinos, búfalos, cabras e ovelhas é em sua maioria assintomática, sugerindo que as exposições prévias e constantes a este parasita geram proteção contra a infecção aguda. Assim, a infecção é caracterizada pela ausência de sinais clínicos e não representa risco para a saúde animal, podendo, porém, acarretar alguma perda na produtividade do rebanho. Estas são chamadas de regiões de estabilidade enzoótica. Este equilíbrio enzoótico entre hospedeiros (domésticos e silvestres) e parasitas parece acontecer em regiões da Venezuela (Garcia et al., 2005, 2006), Colômbia (Otte et al., 1994) e Brasil (Pantanal e Amazônia), sendo, provavelmente, alcançado após o aparecimento de surtos com sintomatologia grave (Desquesnes, 2004; Paiva et al., 1997; Silva et al., 1995, 1996).

No Brasil, durante décadas *T. vivax* ficou restrito a regiões na Amazônia e no Pantanal, mas, nos últimos anos, após o primeiro relato de *T. vivax* na região do Semiárido brasileiro (Batista et al., 2007), foram notificados surtos de infecções agudas graves por *T. vivax* de norte a sul do Brasil. É importante salientar que apesar do problema comum da falta de diagnóstico ou diagnóstico errôneo de bovinos infectados com *T. vivax* em regiões não endêmicas, surtos têm sido sucessivamente relatados, onde animais nunca expostos ao parasita apresentam uma doença com sintomatologia grave, caracterizada pela alta parasitemia associada a manifestações clínicas como perda de peso, queda na produção de leite, aborto e mortalidade perinatal, diminuindo a produtividade. Estes relatos sucessivos em regiões geograficamente distantes indicam que *T. vivax* é, atualmente, considerada uma das espécies com maior incidência e relevância em ruminantes domésticos em áreas muito importantes de produção de gado, até recentemente consideradas livres de *T. vivax*.

Os estudos realizados sugerem que o Semiárido brasileiro não é endêmico para essa tripanossomíase, provavelmente, porque as condições ambientais (longos períodos de secas e altas temperaturas) não são favoráveis para o desenvolvimento de vetores durante a maior parte do ano. Assim, os bovinos não desenvolvem imunidade ativa, e, portanto, quando a população dos vetores mecânicos aumenta na época das chuvas, os surtos se manifestam de forma grave, causando alta mortalidade e perdas econômicas (Batista et al., 2007, 2008). Além disso, supõe-se que a introdução de animais portadores de *T. vivax* em áreas não endêmicas com animais susceptíveis e a abundância sazonal de vetores mecânicos podem levar ao aparecimento de surtos (Madruga, 2004). Da mesma

forma, animais domésticos de regiões não endêmicas podem ser gravemente afetados quando introduzidos em áreas endêmicas da doença (Batista et al., 2007, 2008; Osorio et al., 2008).

Na África, os ruminantes selvagens africanos, como búfalos e antílopes, são reservatórios de *T. vivax* na região Subsaariana (Auty et al., 2012; Rodrigues et al., 2008), um papel que pode ser desempenhado por equídeos assintomáticos nas regiões endêmicas (Dhollander et al., 2006; Pinchbeck et al., 2008). A alta prevalência de infecção subclínica de *T. Vivax* sugere que equídeos e caprinos assintomáticos sirvam como fontes domésticas abundantes deste parasita e que favorecem a difusão de *T. vivax* na África (Dhollander et al., 2006; Pinchbeck et al., 2008). A existência de reservatórios silvestres de *T. vivax* é uma questão ainda não esclarecida na América do Sul, mas em regiões endêmicas brasileiras e venezuelanas, o gado de corte e bubalinos são portadores assintomáticos; porém, alguns deles podem apresentar ligeira redução do hematócrito quando concomitantemente infectados com outros hemopatógenos (Desquesnes, 2004; Garcia et al., 2005). O surto de alta mortalidade em rebanho de ovinos no semiárido foi atribuído à introdução de búfalos infectados, com parasitemia patente e sem sinais clínicos de infecção por *T. vivax* detectado, posteriormente, por PCR (Galiza et al., 2011). O transporte de gado de corte assintomático da região endêmica do Pantanal atuou como a fonte do surto de *T. vivax* em bovinos de leite, que até então não haviam sido expostos ao parasita, no Sudeste do Brasil (Cadioli et al., 2012). No entanto, a falta de prova da introdução de gado de áreas endêmicas para a maioria dos locais de surtos sugere que animais domésticos podem ter assumido o papel de reservatórios de *T. vivax*.

1.3.1.2 Patogenia e Sinais Clínicos.

Nas áreas endêmicas, a tripanossomíase por *T. vivax* é, em geral, uma doença que apresenta curso clínico crônico, com animais assintomáticos ou com sinais clínicos inespecíficos. Porém, fatores associados ao parasita, espécie e raça do animal infectado podem determinar infecções graves com alterações hematológicas e nervosas (Chamond et al., 2010; Dagnachew et al., 2014; Masake, 1980). No local da pele onde as formas metacíclicas são inoculadas forma-se o “cancro de inoculação”, lesão primária, de natureza inflamatória e transitória que se caracteriza, em cortes histológicos, por grande número de tripanossomas (Gardiner, 1989). Do local de inoculação, os tripanossomas passam rapidamente para os nódulos linfáticos que drenam o local da picada e alcançam o sangue (Gardiner, 1989). A rápida multiplicação por divisão binária das formas tripomastigotas promove um aumento gradual de tripanossomas no sangue (Jones et al., 2000).

O período entre a infecção e o aparecimento da parasitemia (período pré-patente) varia em função da resistência inata do hospedeiro, nível de anticorpos, estado nutricional, infecções intercorrentes e exposição a drogas terapêuticas, bem como de fatores relacionados ao parasita, como

transmissão cíclica ou mecânica e quantidade de parasitas inoculada. O período pré-patente para o *T. vivax* varia de acordo com a via de inoculação e a origem do inóculo utilizado, variando de quatro a sete dias em bovinos, ovinos e caprinos quando a via é intramuscular (Stephen, 1986). Em geral, um período pré-patente de 2 a 3 dias é observado nas infecções experimentais realizadas com cepas de regiões não endêmicas, enquanto que estudos realizados com a cepa Miranda (MS) indicam um período em torno de 7 dias (Batista et al., 2007; Cadioli et al., 2012; Paiva et al., 2000; Rodrigues et al., 2013).

Com o aumento da parasitemia, os animais manifestam os sinais clínicos da fase aguda da doença. A anemia está entre os sintomas mais comumente associados à tripanossomíase por *T. vivax* e ocorre devido a uma fagocitose generalizada de células do sangue, tais como eritrócitos e plaquetas, por macrófagos (Gardiner, 1989; Igbokwe et al., 1996; Osorio et al., 2008). A persistência da anemia é responsável por insuficiência cardíaca congestiva (Gardiner, 1989), além de promover a deposição de imunocomplexos na superfície do eritrócito, provocando eritrofagocitose (Murray, Dexter, 1988). Outros sintomas também relatados em animais infectados com *T. vivax* incluem aborto, hiperemia, aumento dos nódulos linfáticos, edema submandibular, ceratite, produção de leite diminuída e perda de peso acentuada (Anosa, Isoun, 1983; Facer et al., 1982; Fidelis Junior et al., 2016; Igbokwe et al., 1996; Osorio et al., 2008).

A suscetibilidade de bovinos, caprinos e ovinos à infecção por *T. vivax* na África varia de animais altamente susceptíveis a tripanotolerantes (Akinwale et al., 2006; Dwinger et al., 1986). Em geral, isolados do oeste da África são mais patogênicos para o gado que os do leste Africano. Raramente, no leste da África e também na África central, ocorre a síndrome hemorrágica disseminada e comprometimento do sistema nervoso, como relatado em Uganda e Quênia (Kimeto et al., 1990; Magona et al., 2008; Masake, 1980).

No Brasil, infecções naturais e experimentais de bovinos com *T. vivax* no Pantanal não resultaram em sinais clínicos significativos e os animais se recuperam na ausência de tratamento específico (Paiva et al., 2000). Por outro lado, o primeiro surto de *T. vivax* diagnosticado em bovinos no município de Catolé do Rocha (Paraíba), caracterizou-se por alta severidade da doença, com os animais apresentando, além dos sintomas típicos, sinais nervosos traduzidos por incoordenação, tremores musculares, cegueira transitória e/ou permanente, hipermetria e lesões histológicas indicativas de meningoencefalite e malácia (Batista et al., 2007, 2011). Esta patogenicidade severa foi reproduzida em ovinos e caprinos infectados experimentalmente, que apresentaram febre, anemia, leucopenia, perda de peso e miocardite (Batista et al., 2006, 2007, 2009, 2011; Rodrigues et al., 2013; Silva et al., 2013).

À medida que a infecção crônica causada por *T. vivax* evolui, o que ocorre com muitos animais sem tratamento específico, o parasitismo da fase aguda tende a decrescer como resultado da resposta imune do hospedeiro. A variação antigênica do parasita e a produção de resposta imune específica prolongam a infecção crônica (Jackson et al., 2012; Turner, 1997). Anemia, atraso no crescimento, perda de peso, aborto, redução da fertilidade e queda na produção de leite são os achados mais frequentes em animais na fase crônica da infecção por *T. vivax* (Batista et al., 2009; Maikaje et al., 1991; Rodrigues et al., 2013; Silva et al., 2013; Vargas, Arellano, 1997). Estudos experimentais com *T. vivax* em caprinos e ovinos induziram diferentes níveis de patogenia e redução da produtividade e revelaram raças mais resistentes (Geerts et al., 2009; Masake, 1980; Osaer et al., 1999).

Quanto aos valores bioquímicos, a diminuição nos níveis plasmáticos de glicose é comum em animais infectados por *T. vivax* (Kadima et al., 2000). Estudos demonstram modificações importantes induzidas pela tripanossomíase no nível sérico protéico, aumento de uréia, excreção urinária de creatinina e perda de peso dos animais, além da elevação das proteínas plasmáticas totais (Fidelis Junior et al., 2016; Paiva et al., 2000; Vertegen et al., 1991).

1.3.1.3 Alterações anatomopatológicas.

Em geral, as alterações anatomopatológicas em infecções por *T. vivax* são inespecíficas e nem sempre ocorrem. Quando ocorrem, entre as alterações macroscópicas mais comuns destacam-se a palidez na carcaça, atrofia gelatinosa dos depósitos de gordura corporal, aumento de volume do coração, esplenomegalia, acúmulo de líquido nas cavidades torácica e abdominal e saco pericárdio e aumento de volume dos gânglios linfáticos (Batista et al., 2008a,b; Stephen, 1986).

Como frequentemente observada em bovinos e caprinos infectados por *T. vivax*, as análises histopatológicas apresentam infiltrado de células mononucleares, além de alterações degenerativas em vários tecidos analisados (Jones et al., 2000). O estudo histopatológico de tecidos de animais infectados por *T. vivax* mostrou que, em algumas ocasiões, a presença dos tripanossomas na corrente sanguínea é seguida de migração extravascular e pode provocar lesões graves (Batista et al., 2007, 2011; Losos, Ikede, 1972; Seiler et al., 1981; Whitelaw et al., 1988). A localização extravascular do *T. vivax* assume importante papel na elucidação da patogênese de lesões nos diversos sistemas. Este fato tem grande importância na fisiopatogenia das lesões inflamatórias e degenerativas descritas no coração (Masake, 1980), sistema nervoso (Batista et al., 2007, 2011; Whitelaw et al., 1988), testículos e epidídimo (Bezerra et al., 2008) e ovários (Rodrigues et al., 2013).

Para obter mais detalhes sobre a biologia de *T. vivax*, suas interações com o hospedeiro e, conseqüentemente, sua patogênese, estudos experimentais têm sido realizados em diversos animais como bovinos, caprinos e ovinos e, mais recentemente, em modelos murinos (Chamond et al., 2010).

Neste último caso, os resultados obtidos com um isolado de parasita infeccioso para os roedores foram consistentes com as observações de campo (Chamond et al., 2010). A infecção experimental de caprinos com isolados de *T. vivax* da Paraíba mostrou importantes alterações do sistema nervoso central na fase crônica, incluindo sinais nervosos, meningite e meningoencefalite (Batista et al., 2011). Quanto à viabilidade oocitária, os resultados revelam, comparativamente a animais não infectados, número total de folículos (valor médio) menor em cabras infectadas e, além disso, integridade folicular bastante afetada pelo parasita, com maior número de folículos degenerados, principalmente nos estágios de desenvolvimento primordial e primário (Rodrigues et al., 2013).

1.3.1.4 Diagnóstico.

O diagnóstico de infecções por *T. vivax* é rotineiramente realizado por métodos parasitológicos, como esfregaços de sangue e microhematócrito, que são pouco sensíveis, particularmente em animais na fase crônica, que apresentam baixa parasitemia. Os primeiros ensaios sorológicos também foram pouco sensíveis, não diferenciando infecções correntes das passadas (Gardiner, Mahmoud, 1992; Wells, 1984). Os ensaios imunoenzimáticos de ELISA (Nantulya et al., 1992), apesar de permitirem diagnosticar infecções atuais, mostraram baixa especificidade e sensibilidade (Rebeski et al., 1999). Com o objetivo de aprimorar os métodos de diagnóstico, novos ensaios sorológicos empregaram o antígeno GM6, uma proteína com sequencia homóloga à da proteína associada com o flagelo descrita em *T. brucei* e *T. congolense* (Pillay et al., 2013). Testes realizados com o antígeno GM6 de *T. vivax* (TvGM6), que se apresentou conservado para os isolados desta espécie, indicaram, em ELISA indireto e tanto para infecções homólogas quanto heterólogas, especificidade e sensibilidade satisfatórias para diagnosticar *T. vivax* em várias amostras de bois coletadas a campo (Pillay et al., 2013).

As baixas parasitemias nos animais cronicamente infectados dificultam o diagnóstico, que é comumente efetuado por métodos parasitológicos pouco sensíveis ou por métodos sorológicos pouco específicos. Essa situação, em conjunto com a dificuldade de se obter culturas *in vitro* que permitam dispor de quantidades abundantes de parasitas, tem limitado significativamente o estudo dessa espécie, o desenvolvimento de métodos diagnósticos, bem como a análise da diversidade genética e estudos populacionais.

Com o advento dos métodos moleculares, testes de PCR foram desenvolvidos com base em DNA satélite ou microssatélite (Masiga et al., 1992; Morlais et al., 2001), espaçador interno transcrito do rDNA (ITS1) (Adams, Hamilton, 2008; Cox et al., 2005; Desquesnes et al., 2001) e gene spliced-leader (SL) (Ventura et al., 2001). Métodos baseados nesses marcadores apresentaram limitações em detectar as populações de *T. vivax* do leste Africano (Cortez et al., 2006; Ventura et al., 2001). A maioria dos ensaios de PCR disponíveis inicialmente não era capaz de detectar isolados de *T. vivax* do leste da

África, com exceção do ensaio baseado no antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal Tv27 de *T. vivax*, que detectou isolados do oeste e leste Africano (Masake et al., 1997). No entanto, quando aplicado em amostras de DNA de probóscides das moscas tsé-tsé, os resultados do teste nem sempre eram positivos, indicando a existência de isolados e/ou genótipos desconhecidos de *T. vivax* (Malele et al., 2003; Njiru et al., 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos alguns métodos diagnósticos para *T. vivax*. Técnicas sorológicas, como ELISA e RIFI, provaram ser eficazes para a detecção de *T. vivax* em animais cronicamente infectados (Cadioli et al., 2012; Sampaio et al., 2015). No entanto, a persistência de anticorpos por longos períodos não diferencia animais com infecção vigente e passada, gerando, assim, custos adicionais para o tratamento dos rebanhos. Nesta situação, as técnicas de diagnóstico molecular são mais adequadas. Nosso grupo desenvolveu um ensaio de PCR baseado no gene que codifica a enzima catepsina L-like, capaz de detectar todos os isolados de *T. vivax*. Esse método mostrou-se específico e sensível na detecção do parasita em amostras de sangue de ruminantes da América do Sul, oeste e leste da África (Cortez et al., 2009). Um outro teste que tem sido estudado é o LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), teste rápido, simples e que pode ser realizado em áreas com recursos laboratoriais limitados (Notomi et al., 2000). Observou-se que a capacidade do LAMP para detecção de *T. vivax* em amostras de sangue de bovinos que não apresentam parasitemia foi superior a do PCR convencional (Cadioli et al., 2015).

Para estudos epidemiológicos de fatores de risco das tripanossomíases é, de um modo geral, importante conhecer os hospedeiros reservatórios, os vetores e a prevalência das diferentes espécies de tripanossomas em diferentes regiões geográficas. Grandes problemas têm sido encontrados na identificação direta dos tripanossomas em amostras de sangue, devido às baixas parasitemias e infecções mistas, e também em amostras de moscas tsé-tsé, devido às baixas taxas de infecção e presença de infecções mistas.

Atualmente, pelo menos 10 diferentes espécies de tripanossomas africanos podem ser identificados por testes de PCR espécie-específico (Adams et al., 2010b). Embora estes testes tenham excelente poder discriminatório, é caro executar várias reações de PCR para cada amostra de campo. A identificação, por um único PCR seguido de eletroforese em gel de agarose, tem capacitado a discriminação das espécies de uma forma mais eficiente e econômica, pelos diferentes tamanhos de ITSrDNA (Adams et al., 2006; Desquesnes et al., 2001). Este teste também tem limitações, pois tripanossomas com o mesmo tamanho do fragmento ITS-1 não podem ser identificados, e isto levou ao desenvolvimento do Fluorescent Fragment Length Barcoding (FFLB), baseado na amplificação por PCR de quatro segmentos parciais dentro do SSU e LSU (Hamilton et al., 2008). A partir de pequenas sequências de nucleotídeos marcadas com fluorócoros, fragmentos são amplificados por PCR, dentro

do SSU e LSU. Com o auxílio de um sequenciador e eletroforese capilar, que nos fornecem comprimentos de fragmentos únicos para cada região, é possível formar um padrão espécie/genótipo específico que é capaz de identificar a presença de tripanossomas em infecções simples e mistas com precisão (Hamilton et al., 2008). Esta metodologia foi testada para tripanosomas africanos (Adams, Hamilton, 2008; Hamilton et al., 2008) e tripanossomas da América do Sul (Hamilton et al., 2011) e tem sido utilizada como “barcoding” mostrando grande utilidade na identificação e caracterização de espécies de tripanossomas.

A utilização do método FFLB levou à descoberta de um novo tripanossoma africano, transmitido pela mosca tsé-tsé e mais relacionado com *T. brucei* e cujo tamanho do fragmento de ITS-1 é o mesmo do de *T. simiae* e *T. simiae* Tsavo, provável motivo de não ter sido identificado anteriormente (Adams et al., 2008a; Hamilton et al., 2008). Este tripanossoma, identificado em *Glossina pallidipes* da região costeira da Tanzânia, especificamente o Parque Nacional Msubugwe (Adams et al., 2008a), foi encontrado nos intestinos médios e proboscides das moscas tsé-tsé, mas o hospedeiro vertebrado ainda é desconhecido. Além da capacidade de identificar novos tripanossomas, outra grande vantagem do FFLB é identificar múltiplas espécies em infecções mistas e a possibilidade do processamento simultâneo de muitas amostras (Adams et al., 2008b, 2010).

1.3.1.5 Diversidade genética, taxonomia e relações filogenéticas.

Nos estudos filogenéticos iniciais, baseados em apenas uma sequência disponível da SSU rRNA do isolado Y486 (Oeste da África), a posição taxonômica de *T. vivax* foi muito discutida, levando a controvérsias sobre a polifilia do gênero *Trypanosoma* (Hamilton et al., 2004; Hughes et al., 2003a, Piontkivska, 2003; Stevens et al., 2001). Porém, com a inclusão de novos isolados, as análises filogenéticas utilizando os genes ribossômicos posicionaram, com maior estabilidade, *T. vivax* como grupo irmão do clado que contém todos os tripanossomas africanos (Cortez et al., 2006).

Estudos moleculares mais recentes foram de grande importância nos avanços em diagnóstico, compreensão da epidemiologia e patologia, fatores de risco na transmissão, diversidade e relacionamento entre isolados da África e América do Sul (Adams et al., 2010a; Cortez et al., 2006; Duffy et al., 2009; Ventura et al., 2001). Estas investigações, ainda que restritas a um pequeno número de isolados de áreas geográficas muito restritas diante da distribuição de *T. vivax*, têm sugerido uma grande complexidade genética de *T. vivax* e do subgênero *Duttonella* em geral, particularmente na África.

O subgênero *Duttonella* apresenta *T. vivax* como espécie-tipo, com subespécies originalmente descritas com base em dados morfológicos: *T. v. vivax*, *T. v. uniforme* e *T. v. ellipsiprymni* na África, e *T. v. viennei* na América Central e do Sul (Hoare, 1972; Shaw, Lainson, 1972). Estas subespécies têm

sido reconhecidas por diferenças geográficas e aspectos biológicos, morfológicos e patológicos. *T. v. uniforme* foi caracterizado como o menor tripanossoma que ocorre, principalmente, na África central (Hoare, 1972). *Trypanosoma v. vivax* e *T. v. viennei*, apesar de morfológicamente indistinguíveis, foram consideradas subespécies distintas devido a sua transmissão cíclica ou mecânica, respectivamente. A validade dessas subespécies sempre foi bastante discutida, já que *T. v. vivax* pode ser mecanicamente transmitido em áreas livres de tsé-tsé na África (Delafosse et al., 2006; Sinshaw et al., 2006). Nos últimos anos, os estudos realizados com ferramentas moleculares sobre a taxonomia de *T. vivax* levaram a maioria dos pesquisadores a desconsiderarem essa classificação e a adotarem apenas *T. vivax* como única espécie do subgênero *Duttonella* (Adams et al., 2010a; Ventura et al., 2001).

Os primeiros dados moleculares mostrando que a complexidade em *T. vivax* poderia ser maior do que se conhecia foram observados em ensaios de PCR incapazes de detectar isolados de bovinos do leste da África e em moscas tsé-tsé (Malele et al., 2003; Masake et al., 1997; Njiru et al., 2004). O relacionamento genético inferido por sequências do gene SL demonstrou que isolados de *T. vivax* da América do Sul e um isolado do Oeste da África (Y486 da Nigéria) formavam um grupo altamente homogêneo e que, portanto, *T. v. vivax* e *T. v. viennei* correspondiam a uma só espécie (Ventura et al., 2001). Entretanto, em filogenias baseadas no gene SSU rRNA, um isolado do Leste da África (IL3905 do Quênia) apresentou maior divergência com os isolados da América do Sul e também com isolados do Oeste da África, corroborando a complexidade de *T. vivax* (Cortez et al., 2006).

Um tripanossoma obtido de um antílope capturado em Moçambique (Leste da África) foi comparado filogeneticamente com os isolados de *T. vivax* previamente descritos. Este isolado foi posicionado com *T. vivax*, apresentando-se, porém, distante de todos os outros isolados, inclusive dos africanos. As diferenças morfológicas e moleculares sugeriram que este isolado poderia representar uma nova espécie relacionada à *T. vivax* e corroboraram a alta complexidade do subgênero *Duttonella* (Rodrigues et al., 2008). Esse novo isolado foi comparado com outros isolados Africanos e Sul Americanos com base em sequências do gene gGAPDH, reafirmando a homogeneidade dos isolados da América do Sul e sua maior proximidade com isolados do Oeste da África, quando comparados com os do Leste da África (Adams et al., 2010a). Filogenias inferidas com sequências do gene gGAPDH amplificadas a partir de preparações de DNA de probóscides de *Glossina pallidipes* e *G. swynnertoni* coletadas na Tanzânia (Parque do Serengeti) revelaram dois novos genótipos de *T. vivax* - *T. vivax* A e B, filogeneticamente distintos dos isolados da África (Oeste) e América do Sul, denominados de *T. vivax* C (Adams et al., 2010a).

Até o momento, estudos filogenéticos moleculares baseados nos genes SSU rRNA, SL e CATL e no espaçador ITS rDNA demonstraram uma alta homogeneidade genética entre isolados de animais assintomáticos do Pantanal (BR) e Venezuela e isolados de animais com sintomatologia severa na

Paraíba e Rio Grande do Sul. Portanto, bovinos infectados com o mesmo isolado ou isolados muito similares geneticamente apresentam diferentes sinais clínicos que variam desde infecções totalmente assintomáticas a muito graves (Batista et al., 2009; Cortez et al., 2006; Da Silva et al., 2009; Ventura et al., 2001).

1.3.1.6 Adaptação de *Trypanosoma vivax* em animais de laboratório e culturas.

Os primeiros trabalhos que descrevem infecções em camundongos com isolados de *T. vivax* do Oeste da África demonstraram que apenas parasitas dos estágios iniciais (formas metacíclicas) de uma infecção natural são capazes de infectar esses animais (Desowitz, Watson, 1951; Leeflang et al., 1976). Outros estudos não foram capazes de estabelecer a infecção utilizando isolados de *T. vivax* do Leste da África, sugerindo assim, uma grande variação entre isolados de diferentes regiões (Leeflang et al., 1976; Mahan, Black, 1989; Ndao et al., 2004; Robson, Ashkar, 1972; Zwart et al., 1973).

Diversas linhagens de camundongos foram comparadas frente à infecção por *T. vivax*, utilizando um clone do isolado Y486 da Nigéria adaptado em camundongos há mais de 30 anos, que revelou que todas as linhagens testadas foram infectadas, com melhores resultados obtidos com camundongos BALB/c (Chamond et al., 2010). Este mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu modelos *in vivo* de infecção por *T. vivax* utilizando uma cepa já adaptada da Nigéria (D'Archivio et al., 2011). Neste trabalho, foi possível mostrar que as infecções podem ser reprodutíveis utilizando camundongos das linhagens C57BL/6, BALB/c e camundongos “outbred” não consanguíneos que reproduzem parâmetros parasitológicos, histológicos e patológicos da infecção similares aos encontrados no gado infectado no campo. Estes modelos experimentais *in vivo* são úteis para explorar fatores imunobiológicos da infecção por *T. vivax*, que são essenciais para esclarecer, por exemplo, a função de alguns fatores de virulência *in vivo* (Chamond et al., 2009; Trager, 1959).

Alguns trabalhos avaliaram o crescimento *in vitro* de isolados de *T. vivax* do Oeste e Leste da África, descrevendo entre eles diferenças no comportamento em cultura, sendo necessária a suplementação com soros de diferentes animais e a utilização de monocamadas de células de moscas tsé-tsé ou de mamíferos (Brun, Moloo, 1982; Gumm, 1991; Trager, 1975; Zweggarth et al., 1991).

O crescimento de *T. vivax in vitro* nas formas encontradas no inseto vetor foi primeiramente descrito por Trager em 1959 e, em meados da década 1970, na presença de tecidos de moscas tsé-tsé; porém, as culturas não eram estáveis e os parasitas não sobreviviam por mais de 18 dias. Testes posteriores utilizaram formas tripomastigotas sanguíneas coletadas em bovinos experimentalmente infectados, que evidenciaram a diferenciação destas formas em formas epimastigotas, sem o uso de células de tecidos de inseto ou de mamíferos; porém, não foi possível a manutenção contínua por passagens sucessivas (Isoun, Isoun, 1974). Outros ensaios, também dependentes de monocamadas

de células, com subsequente adaptação ao cultivo axênico das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, foram propostos por vários grupos (Fish et al., 1987; Gumm, 1991; Hirumi et al., 1983, 1991; Rebeski et al., 1999; Zweggarth et al., 1991).

Protocolos mais adequados foram desenvolvidos para a manutenção de cultura axênica de três espécies de tripanossomas responsáveis pela tripanossomíase animal Africana: *T. b. brucei*, *T. congolense* e *T. vivax* (Brun, Schonenberger, 1979; Coustou et al., 2010; Gardiner, 1989). Estes estudos pioneiros levaram rapidamente a manipulação genética bem-sucedida de *T. b. brucei* e *T. congolense*. Culturas axênicas de formas epimastigotas (não infectantes) de *T. vivax* foram adaptadas *in vitro* com sucesso, inclusive com a diferenciação do parasita em formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes (D'Archivio et al., 2011).

1.4 Subgênero *Pycnomonas*.

Trypanosoma suis foi descrito pela primeira vez por Ochmann em 1905, que o encontrou em um rebanho de porcos doentes em Dar-es-Salaam, Tanzânia (Hoare, 1972; Stephen, 1986). Após este relato, *T. suis* foi novamente descrito na década de 1950, quando foi realizado um estudo completo do seu ciclo de vida e morfologia (Peel, Chardome, 1954). Como as espécies do subgênero *Trypanozoon*, o ciclo de desenvolvimento de *T. suis* na mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) faz-se pela multiplicação no intestino médio e a subsequente colonização das glândulas salivares, não estando, porém, claro se formas metacíclicas infectantes são também produzidas nas glândulas salivares. Após este período, este tripanossoma foi descrito nas glândulas salivares da mosca tsé-tsé (*Glossina vanhoofi*) coletada no Congo (Van Den Berghe, Zaghi, 1963) e em isolados de moscas tsé-tsé coletadas no Quênia (Janssen e Wijers, 1974), onde a maioria dos isolados foi caracterizada como *T. simiae* e identificaram como *T. suis* um isolado produzindo infecção crônica em porcos exibindo muitas das características desta espécie. Porém, a partir de material criopreservado, este isolado do Quênia foi definitivamente identificado como *T. congolense* Tsavo (Majiwa et al., 1993). A relação filogenética próxima deste tripanossoma com *T. simiae simiae* levou a sua reclassificação como *T. simiae* Tsavo (Gibson et al., 2001).

Hoare, 1972, acreditava que *T. suis* era, de fato, uma espécie de tripanossoma e não um sinônimo de *T. simiae*, e que a mesma poderia ser um elo importante na compreensão da evolução dos ciclos de desenvolvimento dos tripanossomas na mosca tsé-tsé. Propôs, então, que *T. suis* fazia parte de outro subgênero, *Pycnomonas*, para refletir sua biologia única. Desde então, não houve mais relatos sobre o aparecimento de *T. suis* (Gibson et al., 2001; Janssen, Wijers, 1974) e a única comprovação da sua existência são as lâminas coradas com Giemsa (Peel, Chardome, 1954).

Com o advento das técnicas moleculares e desenvolvimento de um método chamado Fluorescent Fragment Length Barcoding (FFLB) (Hamilton et al., 2008), foi descoberta uma nova espécie de tripanosoma, identificada em *Glossina pallidipes* coletada no Parque Nacional de Msubugwe, Tanzânia (Adams et al., 2008a). A análise filogenética da região 18S do gene rRNA e gGAPDH mostrou que o novo tripanossoma é mais intimamente relacionado com *T. brucei*, estando, porém fora do subgênero *Trypanozoon* (Adams et al., 2010b; Hamilton et al., 2008). Esta posição filogenética, entre os subgêneros *Trypanozoon* e *Nannomonas*, é esperada para *T. (Pycnomonas) suis*. Esta hipótese ainda é suportada por outras evidências, como por exemplo, o local de desenvolvimento de *T. suis* dentro da mosca tsé-tsé, semelhante às espécies dos subgêneros *Trypanozoon* e *Nannomonas* (Hoare, 1972; Stephen, 1986).

Recentemente, o tripanosoma denominado Msubugwe foi isolado do intestino médio de *G. pallidipes* (isolados G1-62 e F2-J). Dois elementos altamente repetitivos foram identificados no genoma desse tripanossoma: uma repetição de 177 pb localizada predominantemente nos minicromossomos, e uma repetição 138 pb, amplamente dispersa no genoma (Hutchinson, Gibson, 2015). Um teste de PCR desenvolvido com base em sequências específicas de cada repetição foi capaz de identificar *T. suis* em lâminas de esfregaço sanguíneo de porcos infectados da década de 1950, confirmando a identidade do tripanossoma Msubugwe como *Trypanosoma (Pycnomonas) suis* (Hutchinson, Gibson, 2015). Este mesmo estudo apresenta dados do cariótipo molecular e de sequências do gene de Spliced Leader, capazes de distinguir *T. suis* de outros tripanossomas africanos transmitidos pela mosca tsé-tsé.

O tripanossoma Msubugwe, agora chamado de *T. suis*, foi unicamente relatado em mosca tsé-tsé (*G. pallidipes*) (Adams et al., 2008b), o que significa que pouco se conhece sobre sua gama de hospedeiros e patogenicidade. A fim de conhecer um pouco mais sobre os possíveis hospedeiros vertebrados do *T. suis* foram realizadas infecções experimentais em camungongos, ratos, coelhos, ruminantes domésticos, jumentos, cachorros, gatos e mamíferos selvagens, todas sem sucesso (Peel, Chardome, 1954; Stephen, 1986). A identificação do tripanossoma Msubugwe como *T. suis* significa que já é possível o seu posicionamento entre os mais importantes tripanosomas patogênicos, já que *T. suis* foi originalmente descrito em porcos doentes na Tanzânia (Hoare, 1972) e, posteriormente, apontado como causa de uma infecção crônica em porcos adultos e de uma patogenicidade mais grave em leitões (Peel, Chardome, 1954).

1.5 Subgênero *Nannomonas*.

O subgênero *Nannomonas* compreende espécies de tripanossomas patogênicas de grande importância para animais domésticos, como bois, cabras, ovelhas e porcos. *Trypanosoma congolense* é a espécie-tipo do subgênero e, assim como *T. vivax* e *T. b. brucei*, causa a Nagana em bovinos na

África. Atualmente, o subgênero é formado por *T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi* e *T. simiae* Tsavo. Durante muitos anos, o subgênero foi conhecido por albergar apenas duas espécies, *T. congolense* e *T. simiae*, identificadas apenas por critérios morfológicos e diferenças de virulência. Estudos moleculares evidenciaram por cariotipagem e sequências de DNA repetitivo que *T. congolense* apresenta diferentes tipos e/ou genótipos (Savannah, Forest e Kilifi), que tem se mostrado muito divergentes, apesar de pertencerem a uma única espécie (Clausen et al, 1998; Majiwa et al, 1993; Masiga et al, 1992; Rodrigues et al., 2014). Anteriormente, as características morfológicas dos tripanossomas foram o principal parâmetro para a classificação de espécies. No entanto, isto conduziu a muitos erros de classificação que estão sendo solucionados pela utilização de métodos moleculares. A partir destes métodos foi possível descobrir novos tripanossomas em moscas tsé-tsé (como *T. godfreyi*) e reclassificar outras espécies, como no caso de *T. congolense* Tsavo que foi renomeado para *T. simiae* Tsavo (Adams et al, 2010; Gibson et al, 2001; Majiwa et al, 1993).

As análises filogenéticas baseadas em sequências dos genes ribossômico e gGAPDH foram muito importantes para reconhecer novas espécies dentro do subgênero *Nannomonas*. Novos tipos ou "linhagens" de *T. congolense* e *T. simiae* foram recentemente sugeridos para isolados de moscas tsé-tsé da República da África Central (Voptyka et al., 2015), reforçando a complexidade dos isolados que formam este subgênero. A variedade de hospedeiros, patogenicidade e distribuição de alguns dos tripanossomas do subgênero *Nannomonas* ainda são pouco conhecidas, porém, apenas muito recentemente foram evidenciados os primeiros hospedeiros vertebrados (javalis) de *T. godfreyi* e *T. simiae* Tsavo em áreas preservadas da Tanzânia e Zambia (Auty et al., 2012). Diferentes mamíferos domésticos e selvagens podem servir como hospedeiros e há um grande número de espécies e subespécies de moscas tsé-tsé envolvidas na transmissão destes parasitas. *T. congolense* é altamente prevalente em hospedeiros de importância econômica como ovinos, caprinos, bovinos e suínos (Adams et al., 2010b) assim como em moscas tsé-tsé (Nthiwa et al., 2015; Isaac et al., 2016).

A patogenicidade varia entre os diferentes genótipos de *T. congolense*, como evidenciado por estudos experimentais que mostraram uma maior virulência em *T. congolense* Savannah, moderada para Forest e avirulenta para Kilifi (Bengaly et al, 2002; Motloang et al., 2014). A variação da virulência é um parâmetro biológico importante para distinguir *T. congolense* de *T. simiae* e *T. godfreyi* em suínos infectados. Uma doença aguda e fatal está presente na infecção por *T. simiae*, enquanto infecção crônica é característica em *T. congolense* e uma infecção assintomática em *T. godfreyi* (Stephen, 1986). Em contraste com a ampla gama de hospedeiros reconhecida para os genótipos de *T. congolense*, apenas porcos domésticos são conhecidos por serem suscetíveis a *T. simiae* e *T. godfreyi*, e não há conhecimento da patogenicidade de *T. simiae* Tsavo para os javalis, único hospedeiro associado a esta espécie até agora (Auty et al, 2012). As diferenças na patologia e curso da infecção

em animais infectados com tripanossomas do subgênero *Nannomonas*, levantam questões sobre os mecanismos biológicos, bioquímicos e imunológicos que estão envolvidos em cada caso. Estudos mais abrangentes são necessários para melhor compreensão dos aspectos epidemiológicos e de variabilidade genética das espécies deste subgênero.

1.6 Genes e sequências empregadas nas análises moleculares de polimorfismo e relacionamento genético.

1.6.1 Gene Ribossômico.

Esses genes são moléculas adequadas para inferência de relacionamentos filogenéticos porque são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos e apresentam domínios com diferentes graus de conservação (Sogin et al., 1986). Apesar de múltiplas cópias, essas são aparentemente homogeneizadas por evolução em concerto. Devido a regiões com diferentes graus de conservação, esses genes são excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos (Adams et al., 2010a; Fermino et al., 2015; Hamilton et al., 2008; Lima et al., 2012, 2013, 2015a,b; Maia da Silva et al., 2004a).

Os tripanosomatídeos possuem uma das mais complexas moléculas de RNA ribossômicos, compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos), separadas por um espaçador intergênico (IGS), que se repetem em "tandem" no genoma dos parasitas em mais de 100 vezes. O gene ribossômico é formado pelos seguintes componentes: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 28S (LSU ou subunidade maior) que é fragmentado em duas massas de alto peso molecular (28Sa e 28Sβ). As subunidades 18S e 28S possuem sequências altamente conservadas e entre elas estão presentes os espaçadores internos transcritos (ITS) que possuem um grau intermediário de conservação (ITS 1-4). O espaçador externo transcrito (ETS) possui sequências altamente variáveis e flangeia a extremidade 3' do SSU, separando-o do espaçador intergênico (IGS) (Figura 3). Os diferentes graus de conservação fazem das diferentes regiões dos cistrons ribossômicos excelentes alvos para identificar gêneros, espécies e isolados de tripanosomatídeos (Sogin et al., 1986).

As sequências da subunidade menor (SSU) possuem oito regiões conservadas (U1-U8), flaqueadas por regiões variáveis, o que facilita o desenho de primers e a padronização das reações de PCR, e nove regiões variáveis (V1-V9). A comparação de um grande número de espécies e isolados permitiu selecionar a região variável V7V8 da SSUrRNA como DNA *barcoding*, utilizado para caracterizar a coleção de tripanosomatídeos do nosso grupo. Apenas esta região foi escolhida por vários motivos: o tamanho, que permite fácil amplificação por PCR e sequenciamento direto com a utilização de primers universais para os tripanosomatídeos; ausência de polimorfismo intra-específico;

alinhamento confiável devido à existência de regiões muito conservadas; sequências suficientemente polimórficas para a identificação das espécies já descritas, sendo, portanto, excelentes para identificar novas espécies. Além disso, as regiões mais polimórficas permitem a identificação de linhagens e genótipos. As sequências V7V8 são úteis para inferir o relacionamento genético entre organismos relacionados e indicam os organismos que merecem ser incluídos em filogenias com sequências maiores e outros genes, podendo, também, ser incluídas em análises combinadas com outras sequências. Atualmente, um número importante de sequências do gene SSUrRNA de tripanossomatídeos estão depositadas em bancos de dados, o que permite comparações mais aprimoradas, incluindo maior número de táxons, para obter reconstruções filogenéticas mais confiáveis. Para os tripanossomatídeos, a subunidade maior é formada por duas moléculas de alto peso molecular (24S α e 24S β) e por quatro subunidades de rRNAs (S1, S2, S4 e S6) de baixo peso molecular (Sogin et al., 1986).

Figura 3 - Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos.

❖ Espaçadores Internos Transcritos (ITS):

As sequências dos espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 diferem inter e intra-especificamente e esse alto grau de variabilidade faz destas regiões excelentes alvos para análises de tripanossomatídeos muito relacionados, permitindo distinguir espécies de um subgênero e linhagens, isolados e genótipos de uma espécie, sendo utilizadas como alvos para diagnóstico e marcadores taxonômicos. As sequências desses espaçadores tem sido muito utilizadas para *barcoding* (Hamilton et al., 2008). Análises de ITSrDNA revelaram variabilidade inter e intraespecífica em *Leishmania* sp. e *Endotrypanum* sp. (Cupolillo et al., 2000; Kuhls et al., 2005), linhagens de *T. cruzi* (Cuervo et al., 2002; Fernandes et al., 1999; Luna-Marin et al., 2009; Marcili et al., 2009; Santos et al., 2002), *T. rangeli* (Maia da Silva et al., 2004a), espécies de tripanossomas Africanos (Desquesnes et al., 2001; Njiru et al., 2005; Rodrigues et al., 2008), genótipos de *T. theileri* (Rodrigues et al., 2006, 2010) e tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2008, 2007) e de serpentes (Viola et al., 2008a, 2009).

1.6.2 Gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal – gGAPDH.

Existem três genes de GAPDH, dois que codificam a enzima glicosomal (gGAPDH) e outro que codifica a enzima citosólica (cGAPDH) (Hannaert et al., 1992, 1998; Kendall et al., 1990) (Figura 4). Os genes de GAPDH têm uma baixa taxa de evolução molecular, tornando-os adequados para o estudo sobre evolução ao longo de grandes escalas de tempo. Os genes citosólicos são mais estreitamente relacionados com genes bacterianos do que os genes GAPDH de eucarióticas e, assim, formam uma linhagem separada (Hannaert et al., 1998).

Figura 4 - Representação esquemática dos genes de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicosomal (gGAPDH).

De modo similar ao que acontece com sequências da SSUrRNA, sequências do gene gGAPDH são recomendadas para análises filogenéticas e posicionamento taxonômico dos tripanossomatídeos e têm se mostrado úteis para efetuar o “barcoding” desses organismos (Hamilton et al., 2004, 2007; Hughes et al., 2003b; Piontkivska, 2003). Os genes de gGAPDH codificam proteínas e são susceptíveis a pressões seletivas, apresentando taxas de evolução menores que as de genes não codificadores. Por esta razão, esses genes têm mostrado um alto potencial para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, revelando alinhamentos confiáveis mesmo entre sequências de organismos geneticamente muito distantes. Porém, por serem relativamente conservados, genes de gGAPDH não são úteis para o estudo do polimorfismo intraespecífico e de relacionamento entre espécies geneticamente muito relacionadas. Análises baseadas nos genes de SSUrRNA e gGAPDH geram topologias congruentes e seu uso concatenado resulta em topologias mais robustas (Hamilton et al., 2004, 2005, 2007; Viola et al., 2009).

1.6.3 Genes de cisteína proteases: *Catepsina L*.

Proteases são enzimas que desempenham um papel vital no metabolismo, estando também envolvidas na infectividade, na diferenciação celular, na evasão da resposta imune e na patogenicidade dos tripanossomas (Garcia et al., 2011; Jefferson et al., 2016). Devido à grande diversidade, as proteases podem ser classificadas com base em dois critérios principais: tipo de reação catalisada e os mecanismos catalíticos envolvidos. De acordo com o mecanismo catalítico, as proteases podem ser classificadas em cinco classes principais, de acordo com os aminoácidos reativos dos respectivos sítios

catalíticos: Serina-proteases, Aspártico-proteases, Metallo-proteases, Treonina-proteases e Cisteína-proteases (Sajid, McKerrow, 2002).

Apesar da ampla variabilidade de proteases, o conhecimento destas enzimas na família Trypanosomatidae é limitado e a maior parte dos estudos concentra-se nas Cisteíno-proteases (CPs), justamente porque são cruciais para muitos aspectos do ciclo de vida destes parasitas. Nesse sentido, as CPs têm sido muito exploradas como potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas, vacinas, assim como para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e genotipagem (Atkinson et al., 2009; Sajid, McKerrow, 2002).

A maior parte das cisteína-proteases descritas pertencem ao Clã CA, um agrupamento de famílias de proteínas relacionadas bioquímica e evolutivamente e que compartilham regiões peptídicas conservadas. A característica distintiva deste Clã é a presença da tríade catalítica Cisteína, Histidina e Asparagina (C-H-N) no domínio catalítico da enzima. Aqui são agrupadas as catepsinas B, C, K, L e S dos mamíferos, assim como seus equivalentes em outros organismos, inclusive protozoários (catepsinas-like). As Catepsinas (clã CA, família C1) tipicamente apresentam pré-domínio (ou peptídeo sinal), pró-domínio, domínio central ou catalítico e uma extensão C-terminal, de tamanho variável, característica dos cinetoplastídeos (Figura 5) (Alvarez et al., 2012; Atkinson et al., 2009; Sajid, McKerrow, 2002).

Figura 5 - Representação do gene da Catepsina L – “like” em tripanossomatídeos.

Catepsinas L e B (CATL e CATB) são as CPs responsáveis pelas principais atividades proteolíticas dos tripanossomatídeos (Campetella et al., 1992; Eakin et al., 1992; Lima et al., 1994). Estudos iniciais realizados com *T. cruzi* identificaram a sequência, organização e expressão da cisteíno-protease mais estudada da espécie, a Cruzipaína, a qual é sintetizada por uma família de genes de múltiplas cópias dispostas em tandem, quase sempre idênticas (Cazzulo et al., 1989; Eakin et al., 1992). De maneira similar, genes ortólogos já foram descritos em *T. b. brucei* (Brucipaína), *T. b. rhodesiense* (Rhodesaína), *T. congolense* (Congopaína), *T. rangeli* (Rangelipaína) e *T. carassii*.

Estudos demonstraram que genes CatL-like são marcadores úteis para diagnóstico, genotipagem e reconstruções filogenéticas de *T. vivax*, *T. theileri*, *T. rangeli*, *T. cruzi* e espécies aliadas (Cortez et al., 2009; Garcia et al., 2011; Lima et al., 2012; Ortiz et al., 2009; Rodrigues et al., 2010). Acredita-se que as múltiplas sequências dos genes codificadores destas enzimas estejam submetidas à evolução em concerto, razão pela qual genes CATL poderiam ser apropriados para inferências filogenéticas (Jackson, 2007). Análises restritas a um pequeno número de sequências de “CATL-like” de alguns cinetoplastídeos têm mostrado congruência entre as filogenias obtidas com SSUrRNA e com genes de gGAPDH, sugerindo sua aplicação para avaliar o relacionamento entre tripanossomas e estudos filogenéticos (Lima et al., 2012; Ortiz et al., 2009; Rodrigues et al., 2014).

O polimorfismo do domínio catalítico dos genes que codificam a congopaina de *T. congolense* foi objeto de um estudo realizado pelo nosso grupo (Rodrigues et al., 2014) que demonstrou que os genes de congopaina divergiram de acordo com cada subgrupo de *T. congolense* (Savannah, Forest e Kilifi) e também evidenciaram um grande polimorfismo entre isolados de *T. congolense* do subgrupo Savannah, que segregaram em 4 grupos diferentes (SAV1-SAV4). Este mesmo estudo também demonstrou que os genes de congopaina são alvos importantes para o diagnóstico, genotipagem e inferências filogenéticas e taxonômicas entre os isolados de *T. congolense* e outros membros do subgênero *Nannomonas* (Rodrigues et al., 2014). A aplicabilidade dos genes de CATL também foi demonstrada tanto no que refere ao diagnóstico específico e sensível, como no relacionamento entre isolados e posicionamento filogenético de *T. rangeli*, um parasita não patogênico, porém estreitamente relacionado com *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas na América Latina (Ortiz et al., 2009).

A existência de múltiplas cópias de genes CATL nos genomas de tripanossomas sugere que as sequências destes genes poderiam ser consideradas marcadores apropriados para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos. Este gene foi caracterizado para isolados africanos e Sul americanos de *T. vivax*, sendo também avaliada sua adequação como marcador genético para análise de estrutura populacional e diagnóstico. A análise filogenética de sequências correspondentes aos domínios catalíticos CatL-like revelou polimorfismo substancial permitindo distinguir genótipos de *T. vivax*, de acordo com os grupos polimórficos de sequências (TviCatL1-9), que foram separadas por grandes distâncias genéticas. A análise filogenética dos dados de genes CatL-like apoiou as relações entre espécies de tripanossomas refletidas nas filogenias baseadas em análises de SSU rRNA. Observou-se que diferentes sequências de CatL-like para cada genótipo fornecem alvos úteis para estudos epidemiológicos e de genética de populações, além da descoberta de sequências CatL-like compartilhadas por todos os genótipos de *T. vivax*, mas não por outros tripanossomas, o que permitiu padronizar um PCR diagnóstico específico e sensível para estudos epidemiológicos na América do Sul e África (Cortez et al., 2009).

1.6.6 Microssatélites.

Muitos estudos utilizando microssatélites têm sido realizados para tripanossomas, principalmente, de interesse humano, mas muitas informações têm sido acrescentadas sobre tripanossomas de interesse veterinário e isso pode ser claramente observado nos tripanossomas do clado *T. brucei*. Microssatélites são seqüências curtas (1 a 6 pb), repetidas em tandem, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos (Subirana e Messeguer, 2008).

A taxa de mutação dos microssatélites, e, assim, a variabilidade, é maior do que a observada para a isoenzima ou marcadores RFLP, em que a variabilidade é provavelmente principalmente devido aos mecanismos de recombinação (Levinson e Gutman, 1987). Por isso, a análise de microssatélite é altamente adequada, em estudos genéticos e taxonômicos, para estudar as relações entre espécies estreitamente relacionadas ou dentro de populações da mesma espécie (Garcia et al., 2014). Além disso, são flanqueadas por seqüências únicas e conservadas, o que nos permite desenvolver ensaios de PCR para sua amplificação e análises (Requena et al., 1996).

As análises de seqüências de microssatélites se dão pelo número das unidades de repetição que é determinado para cada alelo de um determinado locus. As análises da combinação dos tamanhos de alelos para diferentes loci nos fornecem perfis que, geralmente, resultam em picos únicos e permitem segregar espécies, subespécies, linhagens ou genótipos.

Com relação ao *T. cruzi* muito se tem avançado no conhecimento sobre a extensa diversidade genética, o que, acredita-se, contribui para a variação clínica observada entre os pacientes chagásicos. Sendo assim, os estudos com microssatélites são utilizados para tentar desvendar a estrutura populacional de *T. cruzi*, caracterização do polimorfismo genético e definição de linhagens (Oliveira et al., 1998; Llewellyn et al., 2011; Zafra et al., 2011; Messenger et al., 2015).

Entre os tripanossomas de animais de interesse econômico, análise de microssatélites pode revelar diversidades genéticas desconhecidas, estruturas de populações e parâmetros biogeográficos destes parasitas, como tem sido demonstrado para *T. brucei* spp. (Biteau et al., 2000; Balmer et al., 2011; Capewell et al., 2013b) e *T. congolense* (Morrison et al., 2009; Simo et al., 2013).

Os estudos genéticos de *T. vivax* iniciaram com marcadores que não foram capazes de resolver as relações entre populações da América do Sul e Oeste da África. O estudo genético mais abrangente de *T. vivax* por análise de microssatélite foi restrito a isolados de muas da Gâmbia, tais resultados sugerem uma população clonal (Duffy et al., 2009). Um polimorfismo considerável foi demonstrado em Camarões (Morlais et al., 2001) e Uganda (Biryomumaisho et al., 2013), apesar de poucos isolados examinados.

Referências*

- Adams ER, Hamilton PB, Rodrigues AC, Malele II, Delespaulx V, Teixeira MM, Gibson W. New *Trypanosoma (Duttonella) vivax* genotypes from tsetse flies in East Africa. *Parasitology*. 2010a; 137: 641-50.
- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitology*. 2010b; 26:324-328.
- Adams ER, Hamilton PB, Malele, II, Gibson WC. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Disease*. 2008a;8(4):439-44.
- Adams ER, Hamilton PB. New molecular tools for the identification of trypanosome species. *Future Microbiology*. 2008;3(2):167-76.
- Adams ER, Malele, II, Msangi AR, Gibson WC. Trypanosome identification in wild tsetse populations in Tanzania using generic primers to amplify the ribosomal RNA ITS-1 region. *Acta Tropica*. 2006;100(1-2):103-9.
- Akinwale OP, Nock IH, Esievo KA, Edeghere HU, Olukosi YA. Study on the susceptibility of Sahel goats to experimental *Trypanosoma vivax* infection. *Veterinary Parasitology*. 2006;137(3-4):210-3.
- Alvarez C, Bermudez MA, Romero LC, Gotor C, Garcia I. Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *The New Phytologist*. 2012;193(1):165-77.
- Alvarez F, Cortinas MN, Musto H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of *Trypanosoma*. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 1996;5(2):333-43.
- Angwech H, Nyeko JH, Opiyo EA, Okello-Onen J, Opiro R, Echodu R, Malinga GM, Njahira MN, Skilton RA. Heterogeneity in the prevalence and intensity of bovine trypanosomiasis in the districts of Amuru and Nwoya, Northern Uganda. *BMC Veterinary Research*. 2015; 11: 255.
- Anosa VO, Isoun TT. Pathology of experimental *Trypanosoma vivax* infection in sheep and goats. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B Journal of Veterinary Medicine Series B*. 1983;30(9):685-700.
- Atkinson HJ, Babbitt PC, Sajid M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends Parasitology*. 2009;25(12):573-81.
- Auty H, Anderson NE, Picozzi K, Lembo T, Mubanga J, Hoare R, Fyumagwa RD, Mable B, Hamill L, Cleaveland S, Welburn SC. Trypanosome diversity in wildlife species from the serengeti and Luangwa Valley ecosystems. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(10):e1828.
- Balmer O, Beadell JS, Gibson W, Caccone A. Phylogeography and taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(2):e961.
- Batista JS, Rodrigues CM, Garcia HA, Bezerra FS, Olinda RG, Teixeira MM, Soto-Blanco B. Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. *Veterinary Research*. 2011;42:63.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Batista JS, Oliveira AF, Rodrigues CM, Damasceno CA, Oliveira IR, Alves HM, Paiva ES, Brito PD, Medeiros JM, disease outbreak Rodrigues AC, Teixeira MM. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: from acute to chronic cryptic infection. *Veterinary Parasitology*. 2009;165(1-2):131-5.
- Batista J, Bezerra F, Lira R, Carvalho J, Rosado Neto A, Petri A, Teixeira M. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28:63-9.
- Batista J, Oliveira A, Barbosa E, Barros F, Sousa F. Infecção experimental em caprinos com *Trypanosoma vivax*. 2008;9:673-85.
- Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MM, Madruga CR, Simoes SD, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*. 2007;143(2):174-81.
- Batista J, Riet-Correa F, Barbosa R, Guerra J. Infecção experimental por Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2006;266(1):31-7.
- Bengaly Z, Sidibe I, Ganaba R, Desquesnes M, Boly H, Sawadogo L. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Veterinary Parasitology*. 2002; 30;108(1):1-19.
- Bezerra FSB, Garcia HA, Alves HM, Oliveira IRS, Silva AE, Teixeira MMG, Batista JS. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2008;28:575-82.
- Biryomumaisho S, Rwakishaya EK, Melville SE, Cailleau A, Lubega GW. Livestock trypanosomosis in Uganda: parasite heterogeneity and anaemia status of naturally infected cattle, goats and pigs. *Parasitology Research*. 2013;112(4):1443-50.
- Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T. Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000;105(2):187-202.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MM, Camargo EP. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*. 2013;164(1):129-52.
- Borst P. Maxi-circles, glycosomes, gene transposition, expression sites, transsplicing, transferrin receptors and base J. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2016;205(1-2):39-52.
- Borst P, Sabatini R. Base J: Discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annual Review of Microbiology*. 2008;62:235-51.
- Botero A, Thompson CK, Peacock CS, Clode PL, Nicholls PK, Wayne AF, Lymbery AJ, Thompson RC. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). *International Journal for Parasitology Parasites and wildlife*. 2013;2:77-89.
- Brener Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*. 1961;3:43-9.
- Brun R, Moloo SK. In vitro cultivation of animal-infective forms of a West African *Trypanosoma vivax* stock. *Acta Tropica*. 1982;39(2):135-41.

- Brun R, Schonenberger M. Cultivation and Invitro Cloning of Procyclic Culture Forms of *Trypanosoma brucei* in a Semi-Defined Medium. *Acta Tropica*. 1979;36(3):289-92.
- Cadioli FA, Fidelis Junior OL, Sampaio PH, dos Santos GN, Andre MR, Castilho KJ, Machado RZ. Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Veterinary Parasitology*. 2015;214(1-2):174-7.
- Cadioli FA, Barnabe Pde A, Machado RZ, Teixeira MC, Andre MR, Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Teixeira MM, Marques LC. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in Sao Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*. 2012;21(2):118-24.
- Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992;50(2):225-34.
- Capewell P, Cooper A, Duffy CW, Tait A, Turner CM, Gibson W, Mehlitz D, Macleod A. Human and animal *Trypanosomes* in Cote d'Ivoire form a single breeding population. *PloS One*. 2013a;8(7):e67852.
- Capewell P, Clucas C, Dejesus E, Kieft R, Hajduk S, Veitch N, Steketee PC, Cooper A, Weir W, Macleod A. The TgsGP gene is essential for resistance to human serum in *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Pathogens*. 2013b;9(10):e1003686.
- Carvalho A, Abrão D, Facury Filho E, Paes P, Ribeiro M. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008;60:769-71.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proceedings Biological Sciences/The Royal Society*. 2004;271(1545):1251-62.
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 1998;73(3):203-66.
- Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1989;33(1):33-41.
- Cecchi G, Paone M, Argiles Herrero R, Vreysen MJ, Mattioli RC. Developing a continental atlas of the distribution and trypanosomal infection of tsetse flies (*Glossina* species). *Parasites & Vectors*. 2015;8:284.
- Chamond N, Cosson A, Blom-Potar MC, Jouvion G, D'Archivio S, Medina M, Droin-Bergere S, Huerre M, Goyard S, Minoprio P. *Trypanosoma vivax* infections: pushing ahead with mouse models for the study of Nagana. I. Parasitological, hematological and pathological parameters. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(8):e792.
- Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Minoprio P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a *Trypanosoma vivax* proline racemase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2009;165(2):170-9.
- Clausen PH, Adeyemi I, Bauer B, Breloeer M, Salchow F, Staak C. Host preferences of tsetse (Diptera: Glossinidae) based on bloodmeal identifications. *Medical and Veterinary Entomology*. 1998;12(2):169-80.
- Coley AF, Dodson HC, Morris MT, Morris JC. Glycolysis in the african trypanosome: targeting enzymes and their subcellular compartments for therapeutic development. *Molecular Biology International*. 2011;2011:123702.
- Cortez A, Rodrigues A, Garcia H, Neves L, Batista J, Bengaly Z, Paiva F, Teixeira M. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America-characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*. 2009;23:44 - 51.

- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MM. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*. 2006;133(Pt 2):159-69.
- Coustou V, Guegan F, Plazolles N, Baltz T. Complete In Vitro Life Cycle of *Trypanosoma congolense*: Development of Genetic Tools. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(3).
- Cox A, Tilley A, McOdimba F, Fyfe J, Eisler M, Hide G, Welburn S. A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental Parasitology*. 2005;111(1):24-9.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(6):877-80.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*. 2000;16(4):142-4.
- D'Archivio S, Medina M, Cosson A, Chamond N, Rotureau B, Minoprio P, Goyard S. Genetic engineering of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and in vitro differentiation under axenic conditions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(12):e1461.
- Da Silva AS, Garcia Perez HA, Costa MM, Franca RT, De Gasperi D, Zanette RA, Amado JA, Lopes ST, Teixeira MM, Monteiro SG. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitology Research*. 2011;108(1):23-30.
- Da Silva A, Costa M, Polenz M, Polenz C, Teixeira M, Lopes S, Monteiro S. First report of *Trypanosoma vivax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural* 2009;39:2550-4.
- Dagnachew S, Terefe G, Abebe G, Barry DJ, Goddeeris BM. Comparative biochemical changes in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from tsetse infested and non-tsetse infested areas of northwest Ethiopia. *Veterinary Parasitology*. 2014;205(3-4):451-9.
- De Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 2009;44(2):67-124.
- Delafosse A, Thebaud E, Desquesnes M, Michaux Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. *Preventive Veterinary Medicine*. 2006;74(2-3):108-19.
- Deschamps P, Lara E, Marande W, López-García P, Ekelund F, Moreira D. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that Trypanosomatids arose from within bodonids. *Molecular Biology and Evolution*. 2011;28:53-8.
- Desowitz RS, Watson HJ. Studies on *Trypanosoma vivax*. I. Susceptibility of white rats to infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1951;45(3-4):207-19.
- Desquesnes M. Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. Paris: OIE & CIRAD; 2004. 190p.
- Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungana A, Davila AM. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(5-6):610-4.
- Dhollander S, Jallow A, Mbodge K, Kora S, Sanneh M, Gaye M, Bos J, Leak S, Berkvens D, Geerts S. Equine trypanosomosis in the Central River Division of The Gambia: a study of veterinary gate-clinic consultation records. *Preventive Veterinary Medicine*. 2006;75(3-4):152-62.

- Dirie MF, Otte MJ, Thatthi R, Gardiner PR. Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from Colombia. *Parasitology*. 1993;106 (Pt 1):21-9.
- Duffy CW, MacLean L, Sweeney L, Cooper A, Turner CM, Tait A, Sternberg J, Morrison LJ, MacLeod A. Population genetics of *Trypanosoma brucei rhodesiense*: clonality and diversity within and between foci. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(11):e2526.
- Duffy CW, Morrison LJ, Black A, Pinchbeck GL, Christley RM, Schoenefeld A, Tait A, Turner CM, MacLeod A. *Trypanosoma vivax* displays a clonal population structure. *International Journal for Parasitology*. 2009;39(13):1475-83.
- Dvorakova N, Cepicka I, Qablan MA, Gibson W, Blazek R, Siroky P. Phylogeny and Morphological Variability of Trypanosomes from African Pelomedusid Turtles with Redescription of *Trypanosoma mocambicum* Pienaar, 1962. *Protist*. 2015;166(6):599-608.
- Dwinger RH, Grootenhuis JG, Murray M, Moloo SK, Gettinby G. Susceptibility of buffaloes, cattle and goats to infection with different stocks of *Trypanosoma vivax* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. *Research in Veterinary Science*. 1986;41(3):307-15.
- Dyer NA, Lawton SP, Ravel S, Choi KS, Lehane MJ, Robinson AS, Okedi LM, Hall MJ, Solano P, Donnelly MJ. Molecular phylogenetics of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) based on mitochondrial (COI, 16S, ND2) and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on the palpalis group. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 2008;49(1):227-39.
- Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(11):7411-20.
- Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10(3):564-7.
- Facer CA, Crosskey JM, Clarkson MJ, Jenkins GC. Immune haemolytic anaemia in bovine trypanosomiasis. *Journal of Comparative Pathology*. 1982;92(3):393-401.
- Fermio BR, Paiva F, Soares P, Tavares LE, Viola LB, Ferreira RC, Botero-Arias R, de-Paula CD, Campaner M, Takata CS, Teixeira MM, Camargo EP. Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2015;4(3):368-78.
- Fermio B, Viola L, Paiva F, Garcia H, de Paula C, Botero-Arias R, Takata CS, Campaner M, Hamilton P, Camargo E, Teixeira M. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasites & Vectors*. 2013;6(1):313.
- Fernandes O, Santos S, Junqueira A, Jansen A, Cupolillo E, Campbell D, Zingales B, Coura JR. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:195-7.
- Ferreira R, De Souza A, Freitas R, Campaner M, Takata C, Barrett T, Shaw J, Teixeira M. A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Euk Microbiol*. 2008;55:427 - 35.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*. 2007;134(Pt 11):1623-38.

Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Machado RZ, Andre MR, Marques LC, Cadioli FA. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*. 2016;25(1):69-81.

Fish WR, Nelson RT, Hirumi H. Cell adhesion in *Trypanosoma*: in vitro studies of the interaction of *Trypanosoma vivax* with immobilized organic dyes. *The Journal of Protozoology*. 1987;34(4):457-64.

Flegontov P, Votypka J, Skalicky T, Logacheva MD, Penin AA, Tanifuji G, Onodera NT, Kondrashov AS, Volf P, Archibald JM, Lukes J. *Paratrypanosoma* is a novel early-branching trypanosomatid. *Current Biology : CB*. 2013;23(18):1787-93.

Galiza GJ, Garcia HA, Assis AC, Oliveira DM, Pimentel LA, Dantas AF, Simoes SV, Teixeira MM, Riet-Correa F. High mortality and lesions of the central nervous system in trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. *Veterinary Parasitology*. 2011;182(2-4):359-63.

Garcia H, Rodrigues A, Rodrigues C, Bengaly Z, Minervino A, Riet-Correa F, Machado R, Paiva F, Batista J, Neves L, Hamilton P, Teixeira M. Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. *Parasites & Vectors*. 2014;7:210.

Garcia HA, Kamyngkird K, Rodrigues AC, Jittapalapong S, Teixeira MM, Desquesnes M. High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary Parasitology*. 2011;180(3-4):363-7.

Garcia H, Garcia M, Perez G, Bethencourt A, Zerpa E, Perez H, Mendoza-Leon A. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2006;100:297-305.

Garcia H, Garcia M, Perez H, Mendoza-Leon A. The detection and PCR-based characterization of the parasites causing trypanosomiasis in water-buffalo herds in Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2005;99:359-70.

Gardiner PR, Mahmoud MM. Salivarian trypanosomes grateful to the following individuals for kindly providing DNA or causing disease in livestock outside sub-Saharan African. Parasitic blood samples: *T. vivax* from West Africa and Colombia were donated. *Protozoa*. 1992: 277-313.

Gardiner PR. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*. 1989;28:229-317.

Geerts S, Osaer S, Goossens B, Faye D. Trypanotolerance in small ruminants of sub-Saharan Africa. *Trends Parasitology*. 2009;25(3):132-8.

Gibson WC, Lom J, Peckova H, Ferris VR, Hamilton PB. Phylogenetic analysis of freshwater fish trypanosomes from Europe using ssu rRNA gene sequences and random amplification of polymorphic DNA. *Parasitology*. 2005;130(Pt 4):405-12.

Gibson WC, Stevens JR, Mwendia CM, Ngotho JN, Ndung'u JM. Unravelling the phylogenetic relationships of African trypanosomes of suids. *Parasitology*. 2001;122(Pt 6):625-31.

Gonzales JL, Chacon E, Miranda M, Loza A, Siles LM. Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Veterinary Parasitology*. 2007;146(1-2):9-16.

Guerra M, AB FJ, Santos H, Abreu-Silva A, Gomes dos Santos A. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. *Ciência Rural*. 2008;38:833-5.

- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(4):435-42.
- Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(5-6):443-52.
- Gumm ID. The axenic cultivation of insect forms of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and development to the infective metacyclic stage. *The Journal of Protozoology*. 1991;38(3):163-71.
- Haanstra JR, Gonzalez-Marcano EB, Gualdron-Lopez M, Michels PA. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016;1863(5):1038-48.
- Hamilton PB, Lewis MD, Cruickshank C, Gaunt MW, Yeo M, Llewellyn MS, Valente SA, Maia da Silva F, Stevens JR, Miles MA, Teixeira MM. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2011;11(1):44-51.
- Hamilton PB, Adams ER, Malele, II, Gibson WC. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2008;8(1):26-33.
- Hamilton P, Gibson W, Stevens J. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 2007;44:15 - 25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *International Journal for Parasitology*. 2005;35(4):431-43.
- Hamilton P, Stevens J, Gaunt M, Gidley J, Gibson W. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*. 2004;12:1393 - 404.
- Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *Journal of Molecular Evolution*. 1998;47(6):728-38.
- Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1992;55(1-2):115-26.
- 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. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995;70(1-2):181-5.
- Hirumi H, Hirumi K, Moloo S, Shaw K. In vitro cultivation of bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma vivax* without feeder cell layers. *Journal of Protozoology Research*. 1991;1:1-12.
- Hirumi H, Nelson R, Hirumi K. Complete cyclic development of *Trypanosoma vivax* in vitro. *The Journal of Protozoology*. 1983;30:6A.
- Hoare C. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972.

- Hoare C, Wallace F. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*. 1966;212:1385-6.
- Holmes P. Tsetse-transmitted trypanosomes--their biology, disease impact and control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2013;112 Suppl:S11-4.
- Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *The Journal of Protozoology*. 1963;10:20-63.
- Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Molecular Biology Evolution*. 2003a;20(4):644-52.
- Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2003b;2(1):15.
- Hury A, Goldshmidt H, Tkacz ID, Michaeli S. Trypanosome spliced-leader-associated RNA (SLA1) localization and implications for spliced-leader RNA biogenesis. *Eukaryotic Cell*. 2009;8(1):56-68.
- Hutchinson R, Gibson W. Rediscovery of *Trypanosoma (Pycnomonas) suis*, a tsetse-transmitted trypanosome closely related to *T. brucei*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2015;36:381-8.
- Igbokwe IO, Umar IA, Oimage JJ, Ibrahim ND, Kadima KB, Obagaiye OK, Saror DI, Esievo KA. Effect of acute *Trypanosoma vivax* infection on cattle erythrocyte glutathione and susceptibility to in vitro peroxidation. *Veterinary Parasitology*. 1996;63(3-4):215-24.
- Isaac C, Ciosi M, Hamilton A, Scullion KM, Dede P, Igbinosa IB, Nmorsi OP, Masiga D, Turner CM. Molecular identification of different trypanosome species and subspecies in tsetse flies of northern Nigeria. *Parasites & Vectors*. 2016;23(9):301.
- Isoun TT, Isoun MJ. In vitro cultivation of *Trypanosoma vivax* isolated from cattle. *Nature*. 1974;251(5475):513-4.
- Jackson A, Berry A, Aslett M, Allison H, Burton P, Vavrova-Anderson J, Brown R, Browne H, Corton N, Hauser H, Gamble J, Gilderthorp R, Marcello L, McQuillan J, Otto T, Quail M, Sanders M, Tonder A, Ginger M, Field M, Barry J, Hertz-Fowler C, Berrimana M. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 2012;109(9):3416-21.
- Jackson AP. Tandem gene arrays in *Trypanosoma brucei*: Comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. *BMC Evolution Biology*. 2007;7.
- Jakes K, O'Donoghue P, Adlard R. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. *Parasitology*. 2001;123:483-7.
- Janssen JA, Wijers DJ. *Trypanosoma simiae* at the Kenya coast. A correlation between virulence and the transmitting species of *Glossina*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1974;68(1):5-19.
- Jefferson T, McShan D, Warfield J, Ogungbe IV. Screening and Identification of Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Cathepsin L with Antitrypanosomal Activity. *Chemical Biology & Drug Design*. 2016;87(1):154-8.
- Jensen RE, Englund PT. Network news: the replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*. 2012;66:473-91.

- Jin L, Chakraborty R. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Molecular Biology Evolution*. 1994;11(1):120-7.
- Johnson CM. Bovine trypanosomiasis in Panama. *American Journal of Tropical Medicine*. 1941;21:289-97.
- Jones TW, Davila AM. *Trypanosoma vivax*-out of Africa. *Trends Parasitology*. 2001;17(2):99-101.
- Jones T, Hunt R, King N. *Patologia veterinária*. São Paulo: Manole; 2000. 1415 p.
- Kadima KB, Gyang EO, Saror DI, Esievo KAN. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and effects of lactose in saline infusion. *Veterinarski Arhiv*. 2000;70:67-74.
- Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *The EMBO Journal*. 1990;9(9):2751-8.
- Kimeto B, Mugeru G, Nyaga P. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary Parasitology*. 1990;34:295 - 301.
- Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist*. 2014;165(5):594-604.
- Krafsur ES. Tsetse flies: genetics, evolution, and role as vectors. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2009;9(1):124-41.
- Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schonian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes and Infection/Institut Pasteur*. 2005;7(11-12):1224-34.
- Langella O. Populations, 1.2.30: population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). CNRS, editor. France 1999.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-8.
- Lee YF, Cheng CC, Lin NN, Liu SA, Tung KC, Chiu YT. Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan. *The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science*. 2010;72(4):417-24.
- Leefflang P, Buys J, Blotkamp C. Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *International Journal for Parasitology*. 1976;6(5):413-7.
- Leger M, Vienne M. Epizootie à trypanosomes chez les boidés de la Guyane Française. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 1919;12:258-66.
- Lemos M, Fermino BR, Simas-Rodrigues C, Hoffmann L, Silva R, Camargo EP, Teixeira MM, Souto-Pradon T. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. *Parasites & Vectors*. 2015;8:573.
- Leonard G, Soanes D, Stevens J. Resolving the question of trypanosome monophyly: a comparative genomics approach using whole genome data set with low taxon sampling. *Infection, Genetics and Evolution* 2011;11 955–9.
- Leta S, Alemayehu G, Seyoum Z, Bezie M. Prevalence of bovine trypanosomosis in Ethiopia: a meta-analysis. *Parasites & Vectors*. 2016; 9, 139.

Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology Evolution*. 1987;4(3):203-21.

Lima AP, Tessier DC, Thomas DY, Scharfstein J, Storer AC, Vernet T. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1994;67(2):333-8.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana M Jr, Pavan AC, Carranza JC, Lim BK, Campaner M, Takata CS, Camargo EP, Hamilton PB, Teixeira MM. New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to *Neotropical Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasites & Vectors*. 2015a; 23;8:657.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica*. 2015b;151:166-77.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MM. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasites & Vectors*. 2013. 3;6(1):221.

Lima L, Silva F, Neves L, Attias M, Takata C, Campaner M, de Souza W, Hamilton P, Teixeira M. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist*. 2012;163:856 - 72.

Linhares G, Dias Filho F, Fernandes P, SCD. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). *Ciência Animal Brasileira*. 2006;7:455-60.

Liu Y, Englund PT. The rotational dynamics of kinetoplast DNA replication. *Molecular Microbiology*. 2007;64(3):676-90.

Llewellyn MS, Rivett-Carnac JB, Fitzpatrick S, Lewis MD, Yeo M, Gaunt MW, Miles MA. Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. *International Journal of Parasitology*. 2011;41(6):609-14.

Losos GJ, Ikede BO. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Veterinary Pathology*. 1972;9:1-71.

Lukes J, Kuchta R, Scholz T, Pomajbíková K. (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends Parasitology*. 2014;30(8):377-85.

Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*. 2002;1(4):495-502.

Lukes J, Jirku M, Dolezel D, Kral'ova I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *Journal of Molecular Evolution*. 1997;44(5):521-7.

Luna-Marin KP, Jaramillo-Londono CL, Hernandez-Torres J, Gutierrez-Marin R, Vallejo GA, Angulo-Silva VM. ITS-RFLP- and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander, Colombia. *Parasitology Research*. 2009;105(2):519-28.

Madrugá C. Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanosoma (Duttonella) vivax* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2004;14:46-7.

- Magona J, Walubengo J, Odimin J. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. *Acta Tropica*. 2008;107:186 - 91.
- Mahan SM, Black SJ. Differentiation, multiplication and control of bloodstream form *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in mice. *The Journal of Protozoology*. 1989;36(4):424-8.
- Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, Paiva F, Nunes VL, Camargo EP, Teixeira MM. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica*. 2009, 109(3):199-207.
- Maia Da Silva F, Junqueira A, Campaner M, Rodrigues A, Crisante G, Ramirez L, Caballero Z, Monteiro F, Coura J, Añez N, Teixeira M. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular Ecology*. 2007;16(16):3361-73.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira A, Coura J, Anez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2004a;129(5):549-61.
- Maia da Silva F, Rodrigues A, Campaner M, Takata C, Brigido M, Junqueira A, Coura J, Takefa G, Shaw J, Teixeira MM. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. 2004b;128 283-94.
- Maikaje DB, Sannusi A, Kyewalabye EK, Saror DI. The course of experimental *Trypanosoma vivax* infection in Uda sheep. *Veterinary Parasitology*. 1991;38(4):267-74.
- Majiwa PA, Maina M, Waitumbi JN, Mihok S, Zweggarth E. *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*. 1993;106 (Pt 2):151-62.
- Malele, II, Ouma JO, Enyaru JC, Matovu E, Alibu V, Auma JE, Onyoyo SG, Bateta R, Changasi RE, Mukiria PW, Ndung'u K, Gitonga PK, Mwaniki LM, Nyingilili HS, Lyaruu EA, Kapange LA, Kamau PK, Masiga DK. Comparative diagnostic and analytical performance of PCR and LAMP-based trypanosome detection methods estimated using pooled whole tsetse flies and midguts. *Veterinary parasitology*. 2013;197(3-4):549-56.
- Malele I, Craske L, Knight C, Ferris V, Njiru Z, Hamilton P, Lehane S, Lehane M, Gibson W. The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2003;3(4):271-9.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *International Journal for parasitology*. 2009;39(5):615-23.
- Masake R, Majiwa P, Moloo S, Makau J, Njuguna J, Kabata J, Ole-Moiyoi O, Nantulya V. Sensitive and specific of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*. 1997;85:193-205.
- Masake R. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. *The Veterinary Record*. 1980;107:551 - 7.
- Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *International Journal for Parasitology*. 1992;22(7):909-18.

- Maslov D, Votýpka J, Yurchenko V, Lukes J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitology*. 2013;29:43–52.
- Merzlya E, Yurchenko V, Kolesnikov A, Alexandrov K, Podlipaev S, Maslov D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2001;48(2):161-9.
- Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2015;13(8):995-1029.
- Moloo SK, Orinda GO, Sabwa CL, Minja SH, Masake RA. Study on the sequential tsetse-transmitted *Trypanosoma congolense*, *T. brucei brucei* and *T. vivax* infections to African buffalo, eland, waterbuck, N'Dama and Boran cattle. *Veterinary Parasitology*. 1999;80(3):197-213.
- Monzón C, Mancebo O, Giménez J, Russo A. Evolución de la Trypanosomosis bovina por *Trypanosoma vivax* en Formosa (Argentina). Años 2007-2012 y su potencial dispersión en el país. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*. 2013;72:38-44.
- Monzón C, Mancebo O, Jiménez J. *Trypanosoma vivax* en Búfalos (*Bubalus bubalis*) en Formosa, Argentina. *Veterinaria Argentina XXVIII*. 2011;275(18):1-5.
- Monzón C, Mancebo O, Russo A. Primera Descripción de *Trypanosoma vivax* en Argentina. *Veterinaria Argentina XXV*. 2008; 247(17):492-8.
- Moreira D, Lopez-Garcia P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54:1861-75.
- Morlais I, Ravel S, Grebaut P, Dumas V, Cuny G. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Tropica*. 2001;80(3):207-13.
- Morrison LJ, Vezz, L, Rowan T, Hope JC. Animal African Trypanosomiasis: Time to Increase Focus on Clinically Relevant Parasite and Host Species. *Trends Parasitology*. 2016; pii: S1471-4922(16)30029-0.
- Morrison LJ, Tweedie A, Black A, Pinchbeck GL, Christley RM, Schoenefeld A, Hertz-Fowler C, Macleod A, Turner CM, Tait A. Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense*. *PLoS One*. 2009;4(5):e5564.
- Motloang MY, Masumu J, Mans BJ, Latif AA. Virulence of *Trypanosoma congolense* strains isolated from cattle and African buffaloes (*Syncerus caffer*) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2014;1:81.
- Muhanguzi D, Picozzi K, Hattendorf J, Thrusfield M, Kabasa JD, Waiswa C, Welburn, SC. The burden and spatial distribution of bovine African trypanosomes in small holder crop-livestock production systems in Tororo District, south-eastern Uganda. *Parasites & Vectors*. 2014;7:603.
- Murray M, Dexter T. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. *Acta Tropica*. 1988;45:389-432.
- Muturi CN, Ouma JO, Malele, II, Ngure RM, Rutto JJ, Mithofer KM, Enyaru J, Masiga DK. Tracking the feeding patterns of tsetse flies (*Glossina* genus) by analysis of bloodmeals using mitochondrial cytochromes genes. *PLoS One*. 2011;6(2):e17284.
- Nantulya VM, Lindqvist KJ, Stevenson P, Mwangi EK. Application of a monoclonal antibody-based antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay (antigen ELISA) for field diagnosis of bovine trypanosomiasis at Nguruman, Kenya. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1992;86(3):225-30.

- Ndao M, Magnus E, Buscher P, Geerts S. *Trypanosoma vivax*: a simplified protocol for in vivo growth, isolation and cryopreservation. *Parasite*. 2004;11(1):103-6.
- Njiokou F, Simo G, Mbida Mbida A, Truc P, Cuny G, Herder S. A study of host preference in tsetse flies using a modified heteroduplex PCR-based method. *Acta Tropica*. 2004;91(2):117-20.
- Njiru Z, Constantine C, Guya S, Crowther J, Kiragu J, Thompson R, Dávila A. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology Research*. 2005;95:186-92.
- Njiru ZK, Ndung'u K, Matete G, Ndungu JM, Gibson WC. Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in animals from sleeping sickness foci in East Africa using the serum resistance associated (SRA) gene. *Acta Tropica*. 2004;90(3):249-54.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(12).
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *International Journal for Parasitology*. 1999;29(2):331-9.
- Nthiwa DM, Odongo DO, Ochanda H, Khamadi S, Gichimu BM. Trypanosoma Infection Rates in *Glossina* Species in Mtito Andei Division, Makueni County, Kenya. *Journal of Parasitology Research*. 2015;607432.
- Oliveira JB, Hernandez-Gamboa J, Jimenez-Alfaro C, Zeledon R, Blandon M, Urbina A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*. 2009;163(1-2):136-9.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 1998;95(7):3776-80.
- Ortega-Montalvo HA, Ron-Román JW, Reyna-Bello A, Chavez-Larrea MA. First report and molecular identification of *Trypanosoma vivax* in cattle from Ecuador. XIII International Congress of Parasitology. México 2014.
- Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, Alfieri SC, Teixeira MM. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Tropica*. 2009;112(3):249-59.
- Osaer S, Goossens B, Kora S, Gaye M, Darboe L. Health and productivity of traditionally managed Djallonke sheep and West African dwarf goats under high and moderate trypanosomosis risk. *Veterinary Parasitology*. 1999;82(2):101-19.
- Osorio A, Madruga C, Desquesnes M, Soares C, Ribeiro L, Costa S. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the new world - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103:1 - 13.
- Otte MJ, Abuabara JY, Wells EA. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. *Tropical Animal Health and Production*. 1994;26(3):146-56.
- Paiva F, De Lemos RAA, Nakazato L, Mori AE, Brum KE, Bernardo KCA. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil: I – Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2000;9:135-41.

Paiva F, Lemos R, Oshiro E, Salvador S, Nakazato L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 1997;6:349-51.

Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-9.

Peel E, Chardome M. Experimental study of strains of *Trypanosoma simiae*, Bruce 1912, transmitted by *Glossina brevipalpis* of Mosso, Urundi. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*. 1954;34(3):345-59.

Pillay D, Izotte J, Fikru R, Buscher P, Mucache H, Neves L, Boulange A, Seck MT, Bouyer J, Napier GB, Chevtzoff C, Coustou V, Baltz T. *Trypanosoma vivax* GM6 antigen: a candidate antigen for diagnosis of African animal trypanosomosis in cattle. *Plos One*. 2013;8(10):e78565.

Pinchbeck GL, Morrison LJ, Tait A, Langford J, Meehan L, Jallow S, Jallow J, Jallow A, Christley RM. Trypanosomosis in The Gambia: prevalence in working horses and donkeys detected by whole genome amplification and PCR, and evidence for interactions between trypanosome species. *BMC Veterinary Research*. 2008;4:7.

Porcel BM, Denoeud F, Opperdoes F, Noel B, Madoui MA, Hammarton TC, Field MC, Da Silva C, Couloux A, Poulain J, Katinka M, Jabbari K, Aury JM, Campbell DA, Cintron R, Dickens NJ, Docampo R, Sturm NR, Koumandou VL, Fabre S, Flegontov P, Lukes J, Michaeli S, Mottram JC, Szoor B, Zilberstein D, Bringaud F, Wincker P, Dollet M. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *Plos Genetics*. 2014;10(2):e1004007.

Pritchard J, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155:945-59.

Ralston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annual Review of Microbiology*. 2009;63:335-62.

Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *International journal for Parasitology*. 2008;38(8-9):869-84.

Rebeski DE, Winger EM, Van Rooij EM, Schochl R, Schuller W, Dwinger RH, Crowther JR, Wright P. Pitfalls in the application of enzyme-linked immunoassays for the detection of circulating trypanosomal antigens in serum samples. *Parasitology Research*. 1999;85(7):550-6.

Requena JM, Lopez MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*. 1996;12(7):279-83.

Robson J, Ashkar TS. The efficiency of different diagnostic methods in animal trypanosomiasis; based on surveys carried out in Nyanza Province, Kenya. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa Bulletin des Epizooties en Afrique*. 1972;20(4):303-6.

Rodrigues A, Ortiz P, Costa-Martins A, Neves L, Garcia H, Alves J, Camargo E, Alfieri S, Gibson W, Teixeira M. Congopain genes diverged to become specific to Savannah, Forest and Kilifi subgroups of *Trypanosoma congolense*, and are valuable for diagnosis, genotyping and phylogenetic inferences. *Infection Genetics and Evolution* 2014;23:20-31.

Rodrigues C, Olinda R, Silva T, Vale R, da Silva A, Lima G, Garcia H, Teixeira M, Batista J. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. *Veterinary Parasitology*. 2013;191:146 - 53.

Rodrigues A, Garcia H, Ortiz P, Cortez A, Martinkovic F, Paiva F, Batista J, Minervino A, Campaner M, Pral E, Alfieri S, MMG T. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International* 2010;59:318-25.

- Rodrigues AC, Neves L, Garcia HA, Viola LB, Marcili A, Da Silva FM, Sigauque I, Batista JS, Paiva F, Teixeira MM. 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*. 2008;135(11):1317-28.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006;132(Pt 2):215-24.
- Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell' Porto A, Milder RV, Takeda GF, Teixeira MM. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Veterinary Parasitology*. 2003;116(3):185-207.
- Rogers DJ, Robinson TP. Tsetse distribution. In: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA, editors. *The trypanosomiasis*. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2004. p. 139–80.
- Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002;120(1):1-21.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Sampaio PH, Fidelis OL, Marques LC, Machado RZ, Barnabe PD, Andre MR, Balbuena TS, Cadioli FA. Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with *Trypanosoma vivax*. *Veterinary Parasitology*. 2015;211(3-4):141-5.
- Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, Campbell DA, Fernandes O. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2002;96(8):755-64.
- Sehgal RN, Iezhova TA, Marzec T, Valkiunas G. *Trypanosoma naviformis* sp. nov. (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) from widespread African songbirds, the Olive sunbird (*Cyanomitra olivacea*) and Yellow-whiskered greenbul (*Andropadus latirostris*). *Zootaxa*. 2015;4034(2):342-50.
- Sehgal RN, Jones HI, Smith TB. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology*. 2001;10(9):2319-27.
- Seiler RJ, Omar S, Jackson AR. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection (surra) of horses. *Veterinary Pathology*. 1981;18(1):120-2.
- Shaw JJ, Lainson R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1972;66(1):25-32.
- Silva RA, da Silva JA, Schneider RC, de Freitas J, Mesquita D, Mesquita T, Ramirez L, Rivera Davila AM, Pereira ME. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996;91(5):561-2.
- Silva R, Silva J, Shneider R, Freitas J, Mesquita T, Ramirez L, Dávila A, Pereira M. Bovine Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brasil. *Trynews*. 1995;4(1-2).
- Silva T, Olinda R, Rodrigues C, Camara A, Lopes F, Coelho W, Ribeiro M, Freitas C, Teixeira M, Batista J. Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. *Veterinary Research*. 2013;44:1.

- Simo G, Sobgwi PF, Njitchouang GR, Njiokou F, Kuiate JR, Cuny G, Asonganyi T. Identification and genetic characterization of *Trypanosoma congolense* in domestic animals of Fontem in the South-West region of Cameroon. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;18:66-73.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitology*. 2006;22:168-74.
- Sinshaw A, Abebe G, Desquesnes M, Yoni W. Biting flies and *Trypanosoma vivax* infection in three highland districts bordering lake Tana, Ethiopia. *Veterinary Parasitology*. 2006;142(1-2):35-46.
- Slapeta J, Morin-Adeline V, Thompson P, McDonell D, Shiels M, Gilchrist K, Votypka J, Vogelneust L. Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology*. 2016:1-14.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(5):1383-7.
- Solano P, Ravel S, de Meeûs T. How can tsetse population genetics contribute to African trypanosomiasis control? *Trends Parasitology*. 2010;26:255-63.
- Stephen LE. Trypanosomiasis: a veterinary perspective. New York: Pergamon Press; 1986.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;15:226-32.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*. 2001;48:1-56.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 1999;118 (Pt 1):107-16.
- Stevens J, Gibson W. A key to understanding *Trypanosoma* trees. *Parasitology Today*. 1998;14(8):334-5.
- Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends in Biochemical Sciences*. 2005;30(2):97-105.
- Subirana JA, Messeguer X. Structural families of genomic microsatellites. *Gene*. 2008;408(1-2):124-32.
- Svobodova M, Zidkova L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votypka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(Pt 2):423-32.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*. 2013;30(12):2725-9.
- Tang HJ, Lan YG, Wen YZ, Zhang XC, Desquesnes M, Yang TB, Hide G, Lun ZR. Detection of *Trypanosoma lewisi* from wild rats in Southern China and its genetic diversity based on the ITS1 and ITS2 sequences. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2012;12(5):1046-51.
- Teixeira M, Borghesan T, Ferreira R, Santos M, Takata C, Campaner M, Nunes V, Milder R, de Souza W, Camargo E. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of Proteobacterial symbionts. *Protist*. 2011;162:503 - 24.

- Trager W. On the cultivation of *Trypanosoma vivax*: a tale of two visits in Nigeria. *The Journal of Parasitology*. 1975;61(1):3-11.
- Trager W. Tsetse-fly tissue culture and the development of trypanosomes to the infective stage. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1959;53:473-91.
- Turner CM. The rate of antigenic variation in fly-transmitted and syringe-passaged infections of *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiology Letters*. 1997;153(1):227-31.
- Valkiunas G, Iezhova TA, Carlson JS, Sehgal RN. Two new *Trypanosoma* species from African birds, with notes on the taxonomy of avian trypanosomes. *The Journal of Parasitology*. 2011;97(5):924-30.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica*. 2009;110(2-3):137-47.
- Van Den Berghe L, Zaghi AJ. Wild Pigs as Hosts of *Glossina vanhoofi* Henrard and *Trypanosoma suis* Ochmann in the Central African Forest. *Nature* 1963;197:1126-7.
- Van den Bossche P, de La Rocque S, Hendrickx G, Bouyer J. A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends Parasitology*. 2010;26:236-43.
- Van den Bossche P, Shumba W, Njagu C, Shereni W. The distribution of bovine trypanosomosis in Zimbabwe and an evaluation of the value of an anti-trypanosomal antibody detection ELISA as a tool for monitoring the effectiveness of tsetse control operations. *Tropical Animal Health and Production*. 2001;33(5):391-405.
- Vargas TM, Arellano SC. La tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. *Veterinaria Montividel*. 1997;33:136.
- Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MM. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Experimental Parasitology*. 2001;99(1):37-48.
- Vertegen MWA, Zwart D, Van Der Hel W, Brouwer BO, Wensing T. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on the energy and nitrogen metabolism of West African Dwarf Gotas. *Journal Animal Science*. 1991;69:1667-77.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates in: *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. (Eds), Academic Press, London/New York/San Francisco,. Academic Press, London/New York/San Francisco 1976:1-34.
- Viola L, Attias M, Takata C, Campaner M, De Souza W, Camargo E, Teixeira M. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2009;56:594 - 602.
- Viola L, Campaner M, Takata C, Ferreira R, Rodrigues A, Freitas R, Duarte M, Grego K, Barrett T, Camargo E, Teixeira 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*. 2008a;135:595 - 605.
- Viola L, Almeida R, Ferreira R, Campaner M, Takata C, Rodrigues A, Paiva F, Camargo E, Teixeira M. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman jacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and GAPDH genes. *Parasitology*. 2008b;136:55 - 75.20.

- Votypka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesarova M, Grybchuk D, Lukes J, Yurchenko V. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. Protist. 2014;165(6):825-38.
- Votypka J, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, Yurchenko V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. Protist. 2013;164(6):763-81.
- Votypka J, Obornik M, Volf P, Svobodova M, Lukes J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. Parasitology. 2002;125(Pt 3):253-63.
- Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Experimental Parasitology. 1966;18(1):124-93.
- Wells EA. Animal trypanosomiasis in South America. Preventive Veterinary Medicine. 1984;2:31-41.
- Wen YZ, Lun ZR, Zhu XQ, Hide G, Lai DH. Further evidence from SSCP and ITS DNA sequencing support *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* as subspecies or even strains of *Trypanosoma brucei*. Infection, Genetics and Evolution. 2016; 41:56-62.
- Whitelaw DD, Gardiner PR, Murray M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. Parasitology. 1988;97 (Pt 1):51-61.
- Yurchenko V, Kostygov A, Havlova J, Grybchuk-Ieremenko A, Sevcikova T, Lukes J, Sevcik J, Votypka J. Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 2016;63(2):198-209.
- Zafra G, Mantilla JC, Jacome J, Macedo AM, Gonzalez CI. Direct analysis of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* populations from tissues of Colombian chagasic patients. Human Pathology. 2011;42(8):1159-68.
- Zwart D, Peril NM, Keppler A, Goedbloed E. A comparison of methods for the diagnosis of trypanosomiasis in East African domestic ruminants. Tropical Animal Health and Production. 1973;5:79-86.
- Zweygarth E, Gray MA, Kaminsky R. Axenic in vitro cultivation of *Trypanosoma vivax* trypomastigote forms. Tropical Medicine and Parasitology: Official Organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit. 1991;42(1):45-8.