André Guilherme da Costa Martins

Genes codificadores de proteínas implicadas na relação de espécies do gênero *Trypanosoma* com seus hospedeiros: diversidade, transferência horizontal e relações filogenéticas.

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira

Versão original

RESUMO

Costa-Martins AG. Genes codificadores de proteínas implicadas na relação de espécies do gênero *Trypanosoma* com seus hospedeiros: diversidade, transferência horizontal e relações filogenéticas. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O gênero Trypanosoma representa um grupo diversificado de endoparasitas de invertebrados e vertebrados que exibem ciclos de vida complexos, com uma grande variabilidade de hospedeiros, formas infectantes e multiplicativas, e estratégias de transmissão e de evasão das defesas dos hospedeiros. Nos hospedeiros vertebrados, os tripanossomas em geral se proliferam na corrente sanguínea, mas alguns são capazes de invadir tecidos e espaços extra-vasculares, e algumas espécies se desenvolvem intracelularmente. Essa diversidade apresentada pelos tripanossomas depende de um amplo arsenal de proteínas que regulam uma variedade de processos complexos envolvidos nas relações entre hospedeiros e parasita, incluindo enzimas, chaperonas, proteínas de superfície celular e receptores. Diversas proteínas com uma variedade de funções têm sido extensivamente estudadas nas espécies patogênicas para o homem, T. cruzi e T. brucei. No entanto, essas espécies representam apenas uma pequena fração de diversidade do gênero Trypanosoma. Visando contribuir para o conhecimento sobre as proteínas envolvidas em estratégias adaptativas dos tripanossomas, espécies patogênicas foram comparadas com espécies não-patogênicas representativas de linhagens filogenéticas distantes, que exibem diversas diferenças em suas relações com os vetores e hospedeiros vertebrados. Com este intuito, neste estudo foram examinados os genomas de vários tripanossomas a fim de avaliar o repertório genético, a ocorrência de transferência horizontal de genes, a organização genômica e as relações filogenéticas dos genes que codificam as seguintes proteínas: chaperonas das famílias de proteínas de choque térmico (Hsp70 e proteínas p23/alfa-cristalinas) e enzimas codificadoras das enzimas Prolina racemase (PRAC) e catepsina-L like (CATL-like).

Os membros da superfamília Hsp70 são chaperonas que desempenham uma série de funções fisiológicas e em situações de estresse, como mudanças de temperatura e pH, ambientes extra- e intracelulares e estresse oxidativo contribuindo, assim, para a adaptação, diferenciação e sobrevivência dos tripanossomatídeos tanto em invertebrados quanto em vertebrados de todas as classes. O repertório de Hsp70 presente em tripanossomas foi definindo nesse estudo, com base em análises de polimorfismo, arquitetura de domínios e relações filogenéticas, com as seguinte famílias: Famílias de Hsp70 conservadas presentes no citoplasma (CAN Hsp70, Hsp70.4 and Hsp70.c and Hsp110), reticulo endoplasmático (Grp78, Grp170) e mitocôndria (mtHsp70/Lc2.2); uma família mitocondrial extra (mtHsp70/Lc2.1) cuja presença em todos os gêneros de tripanossomatídeos exceto Trypanosoma foi comprovada neste estudo; as famílias recém-descritas, Hsp70.a e Hsp70.b, sem ortólogos definidos em outros organismos, aqui demostrada como ubíquas nos cinetoplastídeos. A análise filogenética sugeriu que a controversa família Hsp70.b foi adquirida com um único e antigo evento de transferência horizontal (HGT) de uma DnaK-like de um doador bacteriano. Todas as famílias de TryHsp70, exceto Grp78, foram localizadas em regiões altamente sintênicas. Finalmente, dois parálogos bastante divergentes, DnaK e DnaK-like, foram identificados exclusivamente nos genomas dos endossimbiontes abrigados pelos tripanossomatídeos de insetos do gênero Angomonas e Strigomonas. Análises filogenéticas com os ortólogos de cada família corroboram, de um modo geral, os principais clados suportados pela filogenia tradicional de Trypanosomatidae, com relações filogenéticas no gênero Trypanosoma melhor apoiadas nas inferências obtidas com genes das famílias Hsp70.a, CAN Hsp70, Hsp70.b e Hsp110 indicando, assim, que genes Hsp70 são excelentes marcadores filogenéticos independentemente de sua origem evolutiva.

Os domínios p23/α-cristalino (ACD) representam uma estrutura antiga e conservada, presente em muitas famílias de chaperonas eucarióticas, inclusive proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (sHSP) presentes eucariotos e procariotos, que atuam como chaperonas em diversas vias celulares tais como proliferação, diferenciação, sinalização, modulação imunológica e resistência à patógenos. Entretanto, pouco se sabe sobre o repertório e as funções destas proteínas em protozoários parasitas. Nossa pesquisa em vários genomas de Trypanosoma spp. corroborou uma única sHSPs em todos os tripanossomatídeos investigados e, além disso, revelou um repertório compartilhado em todas as espécies de Trypanosoma, formado por oito proteínas ACD. Ortólogos de todas essas proteínas foram também encontrados em Leishmania spp., vários gêneros de tripanossomatídeos de insetos e Bodo spp. Sete proteínas ACD (TryDYX1C1, TrySGT1, Tryp23A, Tryp23B, TryNudC1, TryNudC2 e HSP20) são conservadas em eucariotos em geral, enquanto duas (TryACDP e TryACD-TPR) não apresentaram ortólogos nos bancos de dados disponíveis para outros organismos. Para

discutir possíveis funções das proteínas ACD em tripanossomas, a arquitetura dos domínios e motivos funcionais foi comparada com os respectivos arquétipos com funções conhecidas em outros organismos.

Este estudo inclui também análises de genes codificadores das enzimas prolina racemase (PRAC) e Catepsina L-like (CATL) de Trypanosoma spp. As enzimas CATL desempenham um papel importante nos processos de infecção, diferenciação celular, patogenicidade, virulência e evasão das defesas do hospedeiro em tripanossomas. Neste estudo, pela primeira vez, a principal CATL de T. congolense - congopaina, foi caracterizada em isolados dos três subgrupos genéticos (Savannah, Forest e Kilifi), que variam na virulência, patogenicidade e distribuição geográfica. O polimorfismo, organização estrutural e genealogia revelaram que o repertório de genes de congopaina divergiu de forma espécies-específica para cada subgrupo de T. congolense, com Savannah exibindo sequências altamente polimórficas, inter- e intra-isolados, enquanto os grupos Forest e Kilifi apresentaram diversidade moderada e limitada. Além disso, um PCR baseado nos genes de congopaina foi desenvolvido para um diagnóstico sensível e específico de todos os subgrupos de T. congolense. As descobertas deste estudo demonstram que os genes de congopaina são úteis para o diagnóstico, genotipagem e inferências filogenéticas e taxonômicas de T. congolense.

A enzima PRAC é responsável pela interconversão entre L- e D-prolina livre, presente em um grupo restrito de bactérias agindo como um fator de virulência. O primeiro gene eucariótico de PRAC foi descrito em T. cruzi e, em seguida, em T. vivax, e estudos funcionais e imunológicos provaram que essa proteína promove ativação policlonal de células B em animais infectado, o que leva a um atraso na resposta imunológica específica do hospedeiro e garante a sobrevivência do parasita. Neste estudo, as análises genômicas de homólogos da PRAC revelaram uma única cópia em 12 das 15 espécies de tripanossomas investigadas: nos parasitas de mamíferos T. cruzi, T. cruzi marinkellei, T. dionisii, T. erneyi, T. rangeli, T. conorhini e T. lewisi; e nos tripanossomas de anuros, serpentes, crocodilos, lagartos e pássaros. T. rangeli apresentou apenas pseudogenes; T. brucei, T. congolense e espécies relacionadas, exceto T. vivax que é filogeneticamente mais distante, perderam completamente o gene PRAC. A genealogia dos homólogos PRAC suportada uma história evolutiva congruente com a filogenia de Trypanosoma. Este dado, juntamente com dados de sintenia, das relações filogenéticas com PRAC procariotas, e a ausência de genes PRAC em tripanossomatídeos dos outros gêneros, bodonídeos e euglenídeos, sugerem que um ancestral comum de Trypanosoma adquiriu o gene PRAC, em um evento único de HGT, de uma bactéria Firmicutes ancestral, mais relacionada ao gênero Gemella e outros bacilos do que a Clostridium como previamente sugerido.

Palavras chaves: *Trypanosoma*. Proteínas do Choque térmico. Catepsina L. Genômica comparativa. Transferência horizontal de genes. Filogenia. Evolução.

ABSTRACT

Costa-Martins AG. Genes encoding proteins implicated in the relationship of *Trypanosoma* species with their hosts: diversity, horizontal transfer and phylogenetic relationships. [Ph.D. thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The genus Trypanosoma represents a diverse group of obligate endoparasites of invertebrates and vertebrates, displaying a complex life cycle in which host range, life cycles, infective and multiplicative forms, transmission, and infection and evasion of host defense strategies varies broadly according to species. Inside its vertebrate hosts, trypanosomes proliferate in the bloodstream, but some species invade extra-vascular tissues, and a few species develop in intracellular compartments. The Trypanosoma diversity relies on a vast arsenal of proteins that regulate an assortment of complex processes involved in host-parasite relationships, including enzymes, chaperones, cell surface proteins and receptors, which have been extensively studied in the human trypanosomes T. cruzi and T. brucei. However, these species represent a small fraction of the trypanosome diversity. To contribute to the knowledge about some proteins involved in trypanosome adaptive strategies, pathogenic species were compared with a wide set of non-pathogenic species varying in many traits on the vector and vertebrate-host relationships, and representing distant phylogenetic lineages. With this purpose, in this study we surveyed several trypanosome genomes to assess genetic repertoires, gene horizontal transfers, genome organization and phylogenetic relationships based on genes encoding the following proteins: chaperones of Heat Shock Proteins (Hsp70 and p3/alpha-crystalline proteins) and enzymes of Proline racemase (PRAC) and Cathepsin-L like (CATL-like).

The members of Hsp70 superfamily are chaperones that play a range of physiological roles, and contribute to the trypanosomatid adaptation, differentiation, and surviving in invertebrates and all classes of vertebrates under stressful situations such as shifts of temperature and pH, extra- and intracellular environments, and oxidative stress. Trypanosome Hsp70 repertoire defined in this study through polymorphism, architecture domain, phylogenetic and evolutionary analyses included: Cytosolic (CAN Hsp70, Hsp70.4 and Hsp70.c and Hsp110), ER (Grp78, Grp170) and mitochondrial (mtHsp70/Lc2.2) evolutionarily conserved Hsp70 families; an extra mitochondrial member (mtHsp70/Lc2.1) herein identified in trypanosomatids of several genera except Trypanosoma; and the last discovered TryHsp, Hsp70.a and Hsp70.b, ubiquitous in kinetoplastids with no clear orthologs in other eukaryotes. The phylogenetic analyses suggested that the controversial Hsp70.b family was acquired through a single and ancient HGT from a bacterial DnaK-like donor. All TryHsp70 families, except Grp78, were located in highly syntenic genome regions. Finally, divergent DnaK or DnaK-like paralogs were identified exclusively in the genomes of the endosymbionts harbored by the insect trypanosomatids of the genera Angomonas and Strigomonas. Phylogenetic analyses of orthologs from each family corroborated the main clades supported by the traditional phylogeny of Trypanosomatidae. The best resolved phylogenies of the genus Trypanosoma were obtained with Hsp70.a, CAN Hsp70, Hsp70.b, and Hsp110, indicating that Hsp70 genes are valuable phylogenetic markers regardless of their evolutionary origin.

The p23/α-crystallin domain (ACD) represent an ancient and conserved structure present in many eukaryotic chaperone families, including the small heat shock proteins (sHSP) of eukaryotes and prokaryotes, acting as molecular chaperone in diverse cellular pathways such as cell proliferation, differentiation, signalization, immunological modulation and pathogen resistance. However, little is known about the repertoires and functions of these proteins in parasitic protozoans. In the preset study, we also searched for ACD proteins including the sHSP in several genomes and found a single sHSP in the genomes of all trypanosomatids investigated. In addition, we uncovered a shared repertoire formed by eight additional ACD proteins in all Trypanosoma spp. regardless of the remarkable differences in hosts, life cycles, cell compartments and mechanisms employed to survive in stressful situations. Orthologues of all ACD proteins were also identified in Leishmania, several genera

of insect trypanosomatids, and Bodo spp. Seven identified ACD proteins (TryDYX1C1, TrySGT1, Tryp23A, Tryp23B, TryNudC1, TryNudC2, HSP20) are found in eukaryotes in general, whereas two (TryACD-TPR) were not previously identified in other organisms. The domain architecture and functional motifs of ACD proteins in trypanosomes were compared with those of ACD archetypes.

Additionally, this study includes the analyses of proline racemase (PRAC) and Cathepsin L-like (CATL) enzymes of Trypanosoma spp. The CATL enzymes are encoded by multiple gene families, and play important roles in infection processes, cell differentiation, pathogenicity, virulence, and host defense of Trypanosoma spp. Here, for the first time, congopain, the major CATL of the livestock pathogenic T. congolense, was characterized in isolates of the three genetically groups (Savannah, Forest, and Kilifi), which vary in virulence, pathogenicity and geographical distribution. The polymorphism, structural organization, and genealogy revealed that the repertoire of congopain genes diverged to become specific for each group of T. congolense, with Savannah exhibiting highly polymorphic sequences inter- and intra-isolates, whereas Forest and Kilifi groups showed moderate and limited diversity respectively. In addition, a PCR targeting congopain was developed for specific and sensitive diagnosis of all T. congolense groups. Findings from this study demonstrated that congopain genes are valuable targets for the diagnosis, genotyping, phylogenetic and taxonomic inferences of T. congolense.

The PRAC enzyme is responsible for the interconversion of free L- and D-proline in a restricted group of bacteria, playing a relevant role as a virulence factor. The first eukaryotic PRAC was described in T. cruzi and then in T. vivax, and proved to promote polyclonal activation of B cell in infected animals, then delaying host specific immunological response against the parasites, and ensuring parasite survival in vertebrate hosts. Herein, the genomic search of PRAC homologs revealed single copy PRAC genes in 12 of 15 Typanosoma spp. investigated: T. cruzi and T. cruzi marinkellei, T. dionisii, T. erneyi, T. rangeli, T. conorhini and T. lewisi, all parasites of mammals; trypanosomes from anurans, snakes, crocodiles, lizards and birds. T. rangeli possesses only PRAC pseudogenes, maybe in the process of being lost. Our findings corroborated that T. brucei, T. congolense and their allied species, except the more distantly related T. vivax, have completely lost PRAC genes. The genealogy of PRAC homologs supported an evolutionary history congruent with the Trypanosoma phylogeny. This finding, together with the synteny of PRAC loci, the relationships with prokaryotic PRAC inferred by taxon-rich phylogenetic analysis, and the absence in trypanosomatids of any other genera, bodonids and euglenids suggested that a common ancestor of Trypanosoma gained PRAC gene by a single and ancient HGT from a Firmicutes bacterium more closely related to Gemella and other Bacilli spp. than to Clostridium as previously suggested.

Keywords: *Trypanosoma*. Heat Shock Proteins. Cathepsin L. Comparative genomics. Horizontal Gene Transference. Phylogeny. Evolution.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O filo Euglenozoa

O filo Euglenozoa (Eukaryota; Excavata) compreende eucariotos unicelulares flagelados que apresentam ampla diversidade morfológica e genética. O filo inclui tanto espécies de vida livre (fagotróficas, osmotróficas e fotossintéticas) quanto espécies comensais e parasitas obrigatórios e facultativos (Moreira et al., 2004, 2007; Simpson, Roger, 2004). Características morfológicas e inferências filogenéticas permitiram a classificação dos organismos pertencentes ao filo Euglenozoa em três classes: Kinetoplastea, Diplonemea e Euglenoidea (Busse, Preisfeld, 2002; Moreira et al., 2001, 2004). A recente inclusão de amostras obtidas de ambientes aquáticos com baixas concentrações de oxigênio revelou a existência de mais um grupo, nomeado como Symbiontida. Este é composto por flagelados de vida livre que possuem uma estreita relação com epibiontes bacterianos aderidos a matriz extracelular (Yubuki et al., 2009). Além da diversidade de espécies, o filo Euglenozoa destaca-se por singularidades que incluem desde a organização celular até a genômica (Simpson, Roger, 2004). Em geral, o filo Euglenozoa é marcado pela presença de maquinarias celulares e genômicas ditas "barrocas", que incluem: transcrição simultânea de dezenas de genes em tripanossomatídeos (Myler et al., 1999); edição pós-transcricional massiva do RNA mitocondrial em cinetoplastídeos (Estévez, Simpson, 1999); íntrons dentro de íntrons em euglenídeos (Thompson et al., 1997); presença de uma base hipermodificada (base J) no genoma nuclear dos tripanossomas (Borst, Sabatini, 2008); e transsplicing entre o pré-mRNA e o gene Spliced Leader, que é encontrado ao longo de todo o filo Euglenozoa (Sturm et al., 2001).

Os euglenídeos (classe Euglenoidea) compreendem protozoários fototróficos, fagotróficos e osmotróficos (Breglia et al., 2007; Preisfeld et al., 2001). As espécies fototróficas, assim como algas verdes, apresentam cloroplastos com clorofila A e B nas membranas tilacóides (Nisbet, 1984). Apesar da semelhança fisiológica e estrutural entre euglenídeos e algas verdes restringir-se ao cloroplasto, a similaridade entre plastídios levou, no passado, à classificação artificial das espécies fotossintéticas como "algas verdes". A grande diferença morfológica entre euglenídeos e algas e a presença de uma membrana tripla envolvendo o cloroplasto de euglenídeos sugeriu sua origem a partir de um evento de endossimbiose secundária entre euglenídeos e algas verdes (Gibbs, 1981). A hipótese de endossimbiose secundária foi mais tarde apoiada por inferências filogenéticas obtidas a partir da subunidade menor do gene ribossômico (SSU rRNA) e genes codificantes de proteínas (Karnkowska et al., 2015; Linton et al., 1999; Sogin et al., 1986) que posicionaram os euglenídeos fotossintéticos próximos aos demais euglenídeos, diplonemídeos e cinetoplastídeos. O sequenciamento do genoma

plastidial de euglenídeos permitiu confirmar a hipótese da endossimbiose secundária (Hrdá et al., 2012; Turmel et al., 2009).

O grupo formado pelos diplonemídeos (classe Diplonemea) reune organismos biflagelados fagotróficos de vida livre, encontrados no sedimento e em superfícies submersas marinhas, e por parasitas facultativos de crustáceos (Kent et al., 1987; Lara et al., 2009). Os diplonemídeos são divididos em apenas dois gêneros, *Diplonema* e *Rhynchopus*, que se destacam dentro de Euglenozoa por não possuírem plastídios e cinetoplasto, este último encontrado nos cinetoplastídeos (Simpson, Roger, 2004). Estudos moleculares baseados na SSU rRNA sugeriram inicialmente que euglenídeos e diplonemídeos pudessem ser grupos irmãos (Preisfeld et al., 2001). No entanto, inferências baseadas em genes codificantes de proteínas de choque térmico (HSP70 e HSP90), e que incluem um número maior de *taxa*, contradizem o relacionamento inicial e indicam uma maior proximidade dos diplonemídeos com cinetoplastídeos (Simpson, Roger, 2004).

A classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, compreende as famílias Trypanosomatidae e Bodonidae. A principal característica dos cinetoplastídeos é a presença de uma única mitocôndria modificada que contém uma região rica em moléculas de DNA (kDNA) denominada cinetoplasto (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). O kDNA é constituído por um grande número moléculas de DNA dupla-fita e circulares, conhecidas como maxicírculos e minicírculos. Nas espécies da ordem Trypanosomatidae, essas moléculas estão concatenadas de maneira a formar uma rede única e densa, o que não é observado em Bodonidae (Simpson et al., 2002). Análises filogenéticas baseadas em 18S rRNA dividiram os cinetoplastídeos em duas subclasses: Prokinetoplastina, que compreende uma única ordem (Prokinetoplastida) e Metakinetoplastina, que é dividida em quatro ordens: Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida, que correspondem aos bodonídeos; e Trypanosomatida, que compreende os tripanossomatídeos (Moreira et al., 2004). Os bodonídeos são em geral organismos biflagelados e de vida livre, exceto os dos gêneros Cryptobia e Trypanoplasma, que são parasitas de peixes. As espécies de vida livre são encontradas tanto no solo quanto em ambientes aquáticos, de água doce e salgada, e atuam como micropredadores que auxiliam no equilíbrio microbiológico destes ambientes (D'Avila-Levy et al., 2009). Os bodonídeos são divididos em vários gêneros, entre eles: Ichthyobodo, Perkinsiella, Bodo, Neobodo, Parabodo, Trypanoplasma, Dimastigella, Rhynchobodo, Rhynchomonas e Cryptobia (López-García et al., 2003; Moreira et al., 2004; von der Heyden, Cavalier-Smith, 2005).

1.2 A família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastidada) é constituída por parasitas obrigatórios de insetos, insetos fitófagos e plantas, e artrópodes hematófagos ou sanguessugas e vertebrados (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008; Teixeira, 2010). O sucesso evolutivo dos tripanossomatídeos como parasitas é inquestionável, pois, depois dos nematóides, representam o grupo de eucariotos com a maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001). As espécies de tripanossomatídeos apresentam profundas diferenças biológicas, estruturais e fisiológicas entre si. O ciclo de vida desses organismos é complexo, com a presença de diversas formas que variam de acordo com a espécie e com a fase do ciclo de vida. A classificação das diferentes formas é feita em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante. As principais formas encontradas nos tripanossomatídeos são: tripomastigota, amastigota, epimastigota, opistomastigota e promastigota. Com base na morfologia e em marcadores moleculares, a família Trypanosomatidae está dividida em 18 gêneros, sendo 14 compostos de parasitas monoxênicos de insetos (Sergeia, Crithidia, Blastocrithidia, Wallacemonas, Leptomonas, Herpetomonas, Lafontella, Angomonas, Kentomonas, Strigomonas, Blechomonas, Jaenimonas, Lotmaria e Paratrypanosoma), três heteroxênicos (Endotrypanum, Leishmania, Trypanosoma), que circulam entre artrópodes hematófagos e vertebrados, e um gênero heteroxênico (Phytomonas) encontrado em insetos fitófagos e plantas (Borghesan et al., 2013; Flegontov et al., 2013; Kostygov et al., 2014; Lukeš et al., 2014; Maslov et al., 2013; Merzlyak et al., 2001; Svobodova et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2013, 2014;). Alguns gêneros de tripanossomatídeos possuem uma estreita relação com endossimbiontes bacterianos, como é o caso de Angomonas, Strigomonas e Kentomonas (Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014). Partículas virais também foram descritas em associação com *Phytomonas*, *Angomonas* e *Leishmania* (Marche et al., 1993; Molyneux, 1974; Motta et al., 2003). Desse modo, incluindo o genoma nuclear e do cinetoplasto, podem estar presentes em alguns casos até quatro genomas em uma mesma célula.

Filogenias moleculares baseadas tanto em marcadores ribossomais quanto em genes codificantes suportam a estreita relação entre tripanossomatídeos e bodonídeos, não estando, porém, ainda bem definido o posicionamento filogenético dos dois grupos dentro dos cinetoplastídeos (Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). Um estudo recente com filogenias baseadas em 64 genes codificantes corroborou a posição dos tripanossomatídeos dentro da subclasse Metakinetoplastina, como grupo irmão da ordem Eubodonida, o que torna os bodonídeos per se um grupo parafilético (Moreira et al., 2004). A posição filogenética dos tripanossomatídeos entre os

bodonídeos parasitas e de vida livre levantou muitas questões sobre o aparecimento do parasitismo e da evolução dos grupos monoxênicos e heteroxênicos (Figura 1).

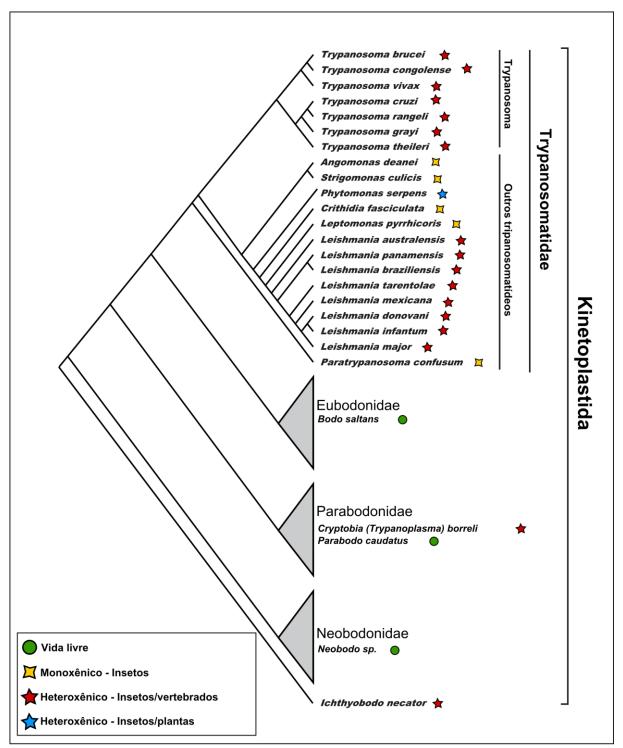


Figura 1 - Relações filogenéticas e variação do modo de vida entre os principais clados de cinetoplastídeos: Os triângulos representam um grande número de espécies condensadas em uma única ramificação, sendo algumas espécies do grupo nomeadas. Figura adaptada de Jackson, 2015.

A hipótese mais aceita defende o surgimento dos tripanossomatídeos a partir de um ancestral de vida livre e aquático, relacionado ao grupo atual dos eubodonídeos, sendo *Bodo saltans* a

espécie mais próxima conhecida (Deschamps et al., 2011). O ancestral de vida livre, ao ser ingerido por insetos, teria se adaptado ao ambiente intestinal, dando origem a um organismo monoxênico de insetos. Este, por sua vez, teria divergido dando origem aos diversos grupos de tripanossomatídeos monoxênicos de insetos. O padrão de ramificação filogenético dos gêneros que compõem a família Trypanosomatidae sugere que o salto do parasitismo monoxênico para heteroxênico ocorreu múltiplas vezes e em diferentes momentos na evolução da família (Figura1) (Stevens 2008; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1994). Nesses saltos, ancestrais monoxênicos, ao colonizarem o trato digestório de insetos hematófagos e fitófagos, podem ter sido inoculados nos tecidos de vertebrados e plantas, adaptandose e dando origem aos gêneros heteroxênicos (Teixeira, 2010). A recente descrição de um novo gênero aparentemente monoxênico, *Paratrypanosoma*, que se posiciona na base dos demais gêneros em inferências baseadas nos marcadores gGAPDH e SSU rRNA, reforça a hipótese de múltiplos saltos para o modo de vida heteroxênico (Flegontov et al., 2013).

1.3 O gênero Trypanosoma

O gênero Trypanosoma é composto por espécies que alternam o ciclo de vida entre hospedeiros invertebrados e vertebrados. A diversidade dos tripanossomas está refletida em ambos hospedeiros. Conforme o tripanossoma, os vetores podem ser dípteros, hemípteros, pulgas, carrapatos e sanguessugas, e os hospedeiros vertebrados podendo compreender aves, répteis, anfíbios, peixes e mamíferos (Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). A maior parte das espécies se desenvolve somente ciclicamente no vetor. A exceção ocorre em Trypanosoma evansi, Trypanosoma equiperdum e Trypanosoma vivax. As duas primeiras são somente transmitidas mecanicamente por insetos hematófagos e pelo coito respectivamente, enquanto T. vivax é transmitido tanto pela via mecânica por moscas hematófagas quanto ciclicamente pela mosca tsé-tsé. A adaptação à transmissão mecânica é responsável pela disseminação destas espécies para fora do cinturão africano de ocorrência da mosca tsé-tsé, considerada vetor natural desses tripanossomas. A transmissão exclusivamente mecânica observada em *T. evansi* e em *T. equiperdum* é possivelmente responsável pela perda parcial ou total do cinetoplasto, essencial para o desenvolvimento cíclico no inseto vetor (Lun et al., 2010). A maior parte dos estudos sobre os tripanossomas está restrita a espécies patogênicas que possuem interesse médico humano e veterinário. A ampla distribuição geográfica, variedade de nichos ecológicos, ecótopos e mecanismos de transmissão das espécies estudadas sugerem que a diversidade ainda é subestimada.

Até o momento, são conhecidos três tripanossomas naturalmente infectantes para o homem: Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, que inclui duas subespécies – T. b. gambiense, T. b. rhodesiense, e Trypanosoma rangeli. As duas primeiras espécies são respectivamente os agentes etiológicos da doença de Chagas e do sono, enquanto *T. rangeli*, embora capaz de infectar humanos, até agora não é considerado patogênico. Por sua vez, *T. vivax, T. evansi, T. equiperdum, Trypanosoma congolense, T. brucei brucei* e *Trypanosoma simiae* são agentes de tripanossomíases animais. Essas espécies são todas de origem africana e patogênicas para bovinos, bufalinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos, sendo responsáveis por perdas econômicas em países da África, Ásia e Américas Central e do Sul (Morrison, MacLeod, 2011). A maior parte dos tripanossomas circula no ambiente silvestre como enzootias, transmitidos por vetores associados com seus hospedeiros e respectivos ecótopos. Recentemente, junto ao surgimento de técnicas de diagnóstico molecular tem sido reportado um aumento no número infecções humanas atípicas por tripanossomas, como *Trypanosoma lewisi, T. vivax, T. evansi, T. congolense e T. brucei brucei* (Truc et al., 2013, 2014). Apesar dos casos serem até agora restritos a indivíduos imunossuprimidos ou desnutridos, a possibilidade do aparecimento de doenças emergentes tem redirecionado o foco dos novos estudos para espécies antes negligenciadas (Truc et al., 2013).

Ao longo do ciclo de vida, os tripanossomas podem apresentar-se sob as formas epimastigota, tripomastigota (sanguíneo ou metacíclico) e, em alguns casos, amastigota. As formas infectantes presentes nos vertebrados são denominadas tripomastigotas sanguíneos. Estas, quando ingeridas pelos vetores durante o repasto sanguíneo, sofrem alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, diferenciando-se em epimastigotas, que são as formas multiplicativas adaptadas ao novo ambiente. Uma vez cessada a fase multiplicativa, as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. O local onde se dá a metaciclogênese no vetor determina a via de transmissão, se contaminativa (caso das espécies de Trypanosoma cujos tripomastigotas metacíclicos desenvolvem-se nas porções posteriores do tubo digestório e são eliminadas juntamente com as fezes do vetor) ou inoculativa (metaciclogênese nas porções anteriores e glândulas salivares do vetor e consequente inoculação com a saliva), durante o repasto sanguíneo (Hoare, 1972). Com exceção de *T. rangeli,* transmitido por ambas as vias, as demais espécies utilizam apenas uma das estratégias de transmissão (Gilles, 1999). Com base no desenvolvimento no vetor e, consequentemente, na via de eliminação das formas infectantes, os subgêneros que infectam mamíferos foram separados em Secções Stercoraria e Salivaria (Hoare, 1964). A taxonomia das espécies do gênero *Trypanosoma* era tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos existentes, nas formas encontradas no sangue de vertebrados e também no inseto vetor. Além da morfologia, o comportamento biológico, hospedeiro e localização geográfica também eram considerados na classificação. Centenas de espécies foram descritas em mamíferos e classificadas em oito subgêneros com base nesses critérios (Hoare, 1972).

A Secção Salivaria compreende apenas espécies de origem africana, a maioria transmitida ciclicamente por moscas tsé-tsé (gênero *Glossina*). O local de desenvolvimento dentro da mosca varia conforme a espécie, ocorrendo nas porções anteriores do tubo digestivo e glândulas salivares (*T. brucei* spp.), apenas na porção anterior do tubo digestivo (*T. congolense*), ou restrito à probóscide no caso de *T. vivax* (Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Stevens, 2008; Stevens et al., 2001). A Secção Stercoraria compreende três subgêneros: *Schizotrypanum* cuja espécie-tipo é *T. cruzi*; *Herpetosoma* (espécie-tipo *T. lewisi*) e *Megatrypanum* (espécie-tipo *Trypanosoma theileri*) (Hoare, 1964, 1972). As espécies pertencentes a esta Secção se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor e são transmitidas pela contaminação com as fezes dos vetores deixadas durante o repasto sanguíneo. *T. lewisi* e *T. theileri* apresentam restrição quanto aos hospedeiros vertebrados (roedores e ungulados respectivamente) e possuem ampla distribuição geográfica. Por outro lado, *T. cruzi* e *T. rangeli* infectam uma grande diversidade de mamíferos e são restritos às Américas Central e do Sul (Guhl, Vallejo, 2003; Hoare, 1972).

Embora a monofilia do gênero Trypanosoma tenha sido contestada em estudos iniciais baseados em SSU rRNA (Maslov et al., 1996), trabalhos que incluem um número maior de taxa e adicionam outros marcadores confirmam o gênero como monofilético (Hamilton et al., 2004; Leonard et al., 2011; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001). A visão atual das relações filogenéticas entre as espécies de tripanossomas é tradicionalmente baseada nos genes de SSU rRNA e gGAPDH (Hamilton et al., 2004, 2007; Hannaert et al., 1998; Stevens, 2008). O gênero Trypanosoma possui uma divisão em duas linhagens filogenéticas conhecidas como clados aquático e terrestre (Figura 2) (Hamilton et al., 2004, 2007; Stevens 2008; Stevens et al., 2001). O clado aquático compreende tripanossomas isolados de sanguessugas e vertebrados de hábitos aquáticos ou semiaquáticos, principalmente peixes de água doce e salgada e anfíbios. Também foram encontrados isolados de tartaruga, camaleão e ornitorrinco que pertencem a esse grupo (Dvořáková et al., 2015; Hamilton et al., 2007; Paparini et al., 2014). As espécies do clado aquático são transmitidas principalmente por sanguessugas aquáticas; contudo, flebotomíneos foram relatados como vetores de tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2008). Por sua vez, os tripanossomas de vertebrados terrestres são isolados de mamíferos, aves, crocodilianos, cobras e lagartos e são transmitidos por uma ampla diversidade de vetores que incluem carrapatos, moscas, mosquitos, hemípteros e pulgas (Hamilton et al., 2007). Inferências filogenéticas baseadas nos marcadores tradicionais e incluindo diferentes conjuntos de taxa revelam a existência vários clados entre as espécies da linhagem terrestre (Figura 2): os clados *T. brucei; T. cruzi; T. lewisi;* T. theileri; T. rangeli-T. conorhini; T. avium; T. corvi e clados de tripanossomas de crocodilianos e de lagartos e serpentes (Cavazzana et al., 2010; Hamilton et al., 2004, 2005, 2007, 2008, 2009; Lima et al., 2012b; Maia da Silva et al., 2010; Rodrigues et al., 2006; Stevens, 2008; Stevens et al., 2001).

O clado T. brucei compreende uma grande diversidade de tripanossomas de origem africana, pertencentes à Secção Salivaria e naturalmente transmitidos pela mosca tsé-tsé (Adams et al., 2010; Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972). As espécies desse clado são classificadas em quatro subgêneros: Trypanozoon (T. brucei sspp. T. evansi e T. equiperdum), Duttonella (T. vivax); Pycnomonas (T. suis) e Nannomonas (T. congolense e T. simiae) (Hoare, 1972). O clado T. theileri corresponde ao subgênero Megatrypanum, sendo formado por tripanossomas restritos a ungulados (ordem Artiodactyla). T. theileri é cosmopolita, não patogênico ao hospedeiro vertebrado e transmitido por moscas hematófagas da família Tabanidae (Garcia et al., 2011; Rodrigues et al., 2006, 2010). O clado T. lewisi corresponde ao subgênero Herpetosoma, que compreende espécies cosmopolitas encontradas principalmente em roedores silvestres e domésticos (Hoare, 1972; Maia da Silva et al., 2010). Inicialmente, com base na morfologia das formas sanguíneas, Herpetosoma incluía também T. rangeli. No entanto, inferências filogenéticas baseadas em diversos marcadores moleculares permitiram a revisão desse subgênero que agora compreende apenas as espécies do clado T. lewisi (Hamilton et al., 2007; Maia Da Silva et al., 2007; Stevens, Gibson, 1999). O clado *T. cruzi* compreende o subgênero Schizotrypanum, o clado T. rangeli-T. conohrini, Trypanosoma livingstonei (Lima et al., 2013), Trypanosoma wauwau (Lima et al., 2015), isolados de morcegos (Trypanosoma sp. Bat) e carnívoros (Trypanosoma sp. NanDoum1) da África (Cavazzana et al., 2010; Hamilton et al., 2009; Stevens et al., 2001), e de marsupiais australianos incluindo um isolado de canguru (*Trypanosoma* sp. H25) (Stevens et al., 1999) (Figura 2).

Todas as espécies do clado *T. cruzi* desenvolvem-se nas porções posteriores do trato digestório do inseto vetor e pertencem à Secção Stercoraria. O subgênero *Schizotrypanum* inclui *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei, Trypanosoma dionisii, Trypanosoma erneyi, Trypanosoma vespertilionis, Trypanosoma hastatus, Trypanosoma hedricki, Trypanosoma myoti e Trypanosoma phyllostomus. Embora várias espécies tenham sido descritas nesse clado, somente <i>T. c. marinkellei T. dionisii* e *T. erneyi* foram confirmadas por marcadores moleculares (Cavazzana et al., 2010). As espécies de *Schizotrypanum* apresentam forte restrição quanto ao hospedeiro vertebrado, sendo encontradas somente em morcegos, exceto *T. cruzi* que naturalmente infecta mamíferos de diversas ordens (Cavazzana et al., 2010; Hoare 1972; Marcili et al., 2009; Molyneux, 1991).

O clado *T. rangeli-T. conorhini* posiciona-se como grupo irmão do subgênero *Schizotrypanum* e compreende *T. rangeli, T. conorhini, Trypanosoma* sp. Bat e *Trypanosoma* sp. NanDoum1 (Hamilton et al., 2009). Basal à ramificação formada por *T. rangeli, T. conorhini* e *Schizotrypanum* posiciona-se o

grupo formado por isolados de marsupiais australianos e *T. wauwau*, uma nova espécie encontrada em morcegos da América do Sul (Lima et al., 2015). *T. livingstonei*, parasita de morcegos africanos, representa a espécie mais basal pertencente ao clado *T. cruzi* (Lima et al., 2013).

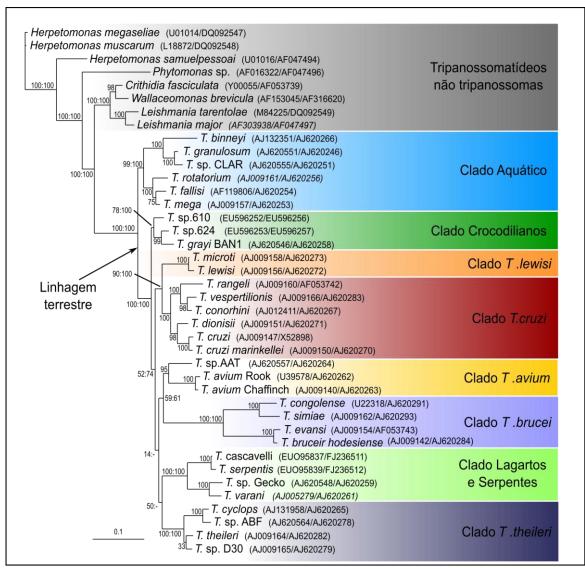


Figura 2 - Inferência filogenética do gênero Trypanosoma. Análise concatenada dos genes SSU rRNA e gGAPDH incluindo 32 espécies de tripanosomas que representam os principais clados. Figura adaptada de Viola et al., 2009.

A presença de tripanossomas restritos a morcegos da Europa, África, América em vários pontos da ramificação do clado *T. cruzi* sugere que as espécies desse grupo evoluíram de um tripanossoma ancestral exclusivo de morcegos (Figura 3). Ao longo da evolução e expansão dos morcegos, esse ancestral divergiu, originando as espécies atuais, que foram dispersas junto dos morcegos através dos continentes. A dispersão dessas espécies restritas a morcegos foi acompanhada de saltos desses tripanossomas para outros mamíferos. Essa hipótese para o surgimento do clado *T. cruzi* ficou conhecida como *bat seeding* (Hamilton et al., 2012b). O padrão de ramificação filogenético das espécies encontradas em mamíferos não morcegos sugere que o salto entre hospedeiros ocorreu

de maneira independente e inúmeras vezes ao longo desse processo (Figura 3) (Hamilton et al., 2012a, 2012b; Lima et al., 2012b, 2013, 2015).

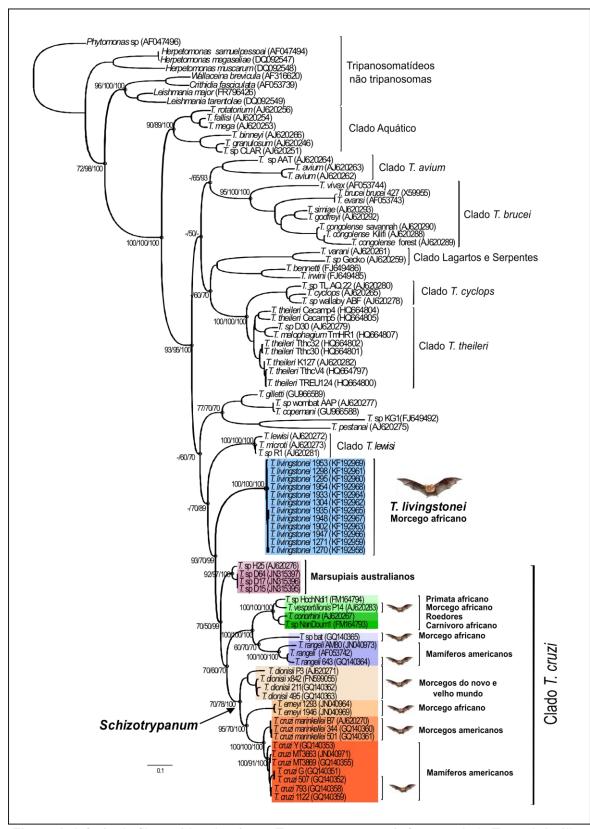


Figura 3: Inferência filogenética do gênero Trypanosoma com ênfase no clado T. cruzi. Análise baseada no gene gGAPDH. Figura adaptada de Lima et al., 2013.

Dentro da linhagem terrestre, os tripanossomas de vertebrados não mamíferos compreendem três clados: tripanossomas de crocodilianos, de aves e de lagartos e serpentes (Hamilton et al., 2007). Embora muitas espécies de tripanossomas tenham sido descritas infectando esses hospedeiros, poucas foram confirmadas por técnicas moleculares e posicionadas em filogenias, o que faz deste grupo de tripanossomas o menos estudado. Além disso, os critérios taxonômicos tradicionais, como morfologia das formas sanguíneas e em cultura, espécie do hospedeiro de origem e localização geográfica se mostraram pouco confiáveis para o gênero *Trypanosoma*. Isto ocorre pela quantidade de infecções mistas e pela variabilidade de restrição ao hospedeiro e distribuição geográfica entre as espécies de tripanossomas.

O clado dos tripanossomas de crocodilianos é formado por três espécies: Trypanosoma grayi, de crocodilos africanos e transmitido pela mosca tsé-tsé, Trypanosoma ralphi e Trypanosoma terena, ambos isolados de jacarés da América do Sul e cujo vetor ainda é desconhecido (Fermino et al., 2013). Inferências atuais baseadas nos genes de gGAPDH e SSU rRNA e que incluem as três espécies posicionam esse clado na base da linhagem terrestre (Fermino et al., 2013, 2015). Recentemente, outro estudo mostrou que Trypanosoma clandestinus, encontrado em jacarés e possivelmente transmitido por sanguessugas, está mais relacionado com as espécies do clado aquático do que com as do clado de tripanossomas de crocodilianos (Fermino et al., 2015). O clado dos tripanossomas de aves apresenta ao menos três subclados: *T. corvi, T. avium* e *T. benetti* (Hamilton et al., 2007; Votýpka et al., 2002). Embora as relações filogenéticas dentro de cada subclado pareçam consistentes usando os marcadores tradicionais, as relações entre os subclados ainda não estão claras, sendo possível que não formem um clado monofilético (Hamilton et al., 2007). Por último, o clado dos tripanossomas de lagartos e serpentes agrupa espécies obtidas de vertebrados da ordem Squamata (lagartos e serpentes) (Viola et al., 2009). Até o momento, as posições filogenéticas dos subclados de tripanossomas de aves e do clado de tripanossomas de lagartos e serpentes não estão bem estabelecidas dentro do gênero *Trypanosoma*.

1.4 Evolução genômica em tripanossomas e outros tripanossomatídeos

Ao longo da última década, o sequenciamento de nova geração, seguido pela diminuição gradual dos custos, revolucionou o estudo da parasitologia. O surgimento dessa nova tecnologia ampliou o conhecimento sobre as interações entre parasita e hospedeiro e, consequentemente, mudou a visão sobre os mecanismos de infecção, invasão, escape imunológico, evolução, resistência a drogas e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (Lv et al., 2015). Filogenias, antes limitadas pela escassez de caracteres, agora contam com um vasto repertório de marcadores moleculares, essenciais para estudos micro e macroevolutivos (Jackson 2015b). Mesmo quando o objetivo não é

diretamente filogenético, como o estudo funcional de genes, a possibilidade de comparar genes e vias metabólicas entre espécies relacionadas torna o pensamento evolutivo necessário.

Parasitas tendem a compartilhar alguns fenômenos na evolução de seus genomas, que conforme a espécie, possuem um papel maior ou menor na sobrevivência dos organismos (Jackson, 2015b). Entre esses, pode se citar a redução do conteúdo genômico, aparecimento de genes espécie específicos, recrutamento de genes para novas funções e transferências horizontal de genes (Capewell et al., 2015; Jackson, 2015b; Lv et al., 2015; Wijayawardena et al., 2013). Onze anos após a publicação dos genomas de T. cruzi (El-Sayed et al., 2005a), T. brucei (Berriman et al., 2005) e Leishmania major (Ivens et al., 2005), os genomas nucleares de diversas outras espécies e subespécies foram sequenciados, estando disponíveis em bancos públicos (Tabela 1). Embora a maioria dos genomas seja de espécies com importância médica humana e veterinária, um esforço recente tem sido feito para aumentar a representatividade e preencher as lacunas evolutivas entre as espécies patogênicas. Entre os genomas recém-sequenciados de tripanossomatídeos considerados não patogênicos para o homem e animais domésticos estão os de Crithidia fasciculata, Endotrypanhum monterogeii, T. grayi, T. cruzi marinkellei e T. rangeli (Kelly et al., 2014; Schwarz et al., 2015; Stoco et al., 2014). A comparação entre os genomas dos tripanossomatídeos revelou uma série de singularidades, tais como a conservação da sintenia de grande parte do genoma, mesmo entre espécies com grande tempo de divergência, um arsenal complexo de proteínas de superfície e uma grande quantidade de genes que vieram de transferência horizontal (Ghedin et al., 2004; Jackson, 2015a; Opperdoes, Michels, 2007).

Tabela 1 - Informações gerais sobre o genoma de organismos parasitas. Adaptado de Lv et al., 2015.

Taxon	Tamanho (Mb)	Cromossomos	Conteúdo GC%	Genes
Trematoídes				
Clonorchis sinensis	516	56	44.8	13634
Opisthorchis viverrini	634.5	12	43.7	16379
Schistosoma haematobium	385	16	34.3	13073
Schistosoma japonicum	398	16	34.1	13469
Schistosoma mansoni	363	16	35.3	11809
Nematoídes				
Brugia malayi	93.7	10	30.5	11515
Loa loa	91.4	12	31	14907
Vecator americanus	244	12	40.2	19151
Trichinella spiralis	64	12	33.9	15808
Trichuris suis	80	-	43.9	14781
Cestoídes				
Echinococcus granulosus	151.6	18	42.1	11325
Echinococcus multilocularis	115	18	42.2	10345

Taenia solium	122.3	-	42.9	12490
Protozoários				
Babesia bovis	8.2	6	41.8	2228
Babesia microti	6.5	3	36	3500
Cryptosporidium hominis	9.2	8	31.7	3994
Eimeria falciformis	44	14	52.9	5879
Entamoeba histolytica	23.75	-	22.4	9938
Giardia intestinalis	11.7	10	49	4889
Leishmania braziliensis	32	35	57.76	8314
Leishmania donovani	32.4	36	59.06	8195
Leishmania major	32.8	36	62.5	8272
Plasmodium falciparum	23.3	14	19.4	5403
Plasmodium vivax	26.8	14	42.28	5433
Trichomonas vaginalis	176.44	6	32.7	59681
Trypanosoma brucei	26.08	22	50.9	9068
Trypanosoma cruzi	55	28	50.9	12000
Microsporídeos				
Encephalitozoon intestinalis	2.3	-	-	1833
Enterocytozoon bieneusi	6	_	_	3804
Encephalitozoon cuniculi	2.9	-	-	1999

1.5 Estrutura e organização do genoma em tripanossomatídeos

Em geral, ao se adaptar a sobreviver do espólio de outro organismo, os parasitas sofrem um processo de simplificação fisiológica e fenotípica, decorrente da redução nas pressões seletivas que atuam sobre as características, antes necessárias ao modo de vida livre. Esse processo leva a perda massiva de genes em vias metabólicas e regulatórias, o que cria uma dependência fisiológica do parasita ao seu hospedeiro. Por exemplo, *Cryptosporidium hominis* precisa obter a maior parte dos aminoácidos e nucleotídeos da célula hospedeira, pois não é mais capaz de sintetizá-los (Xu et al., 2004). Desse modo, espera-se que a redução no número de genes seja refletida no tamanho do genoma. No caso extremo de *Encephalitozoon intestinalis*, o genoma foi reduzido a apenas 2,3 Mpb, que contém o mínimo necessário para manter a homeostase celular (Corradi, Slamovits, 2011). O número crescente de parasitas com o genoma sequenciado tem revelado que, embora exista a tendência à redução do genoma, esta característica não é ubíqua entre parasitas (Tabela 2).

Antes da disponibilidade dos genomas, era conhecido que os tripanossomatídeos apresentavam algumas deficiências metabólicas. A publicação dos primeiros genomas confirmou que

as limitações são decorrentes da perda de genes, tais como os envolvidos na biossíntese do heme, de purinas e de tetrahidrobiopterina (Korený et al., 2010; Marr et al., 1978; Ouellette et al., 2002;).

Tabela 2 - Genomas de tripanossomatídeos disponíveis em bancos públicos.

Гахоп	Сера	Número de acesso
Herpetomonas muscarum	TCC 001E	GenBank AUXJ01000000
Phytomonas serpens	P9	GenBank AIHY00000000.1
Phytomonas sp.	HART1	GenBank CAVR000000000.2
Phytomonas sp.	EM1	GenBank CAVQ000000000.1
Angomonas deanei	TCC 036E	GenBank AUXM01000000
Angomonas desouzai	TCC 079E	GenBank AUXL01000000
Strigomonas culicis	TCC 012E	GenBank AUXH01000000
Strigomonas galati	TCC 219	GenBank GCA_000482125
Strigomonas oncopelti	TCC 290E	GenBank AUXK01000000
Leptomonas pyrrhocoris	H10	TriTrypDB
Leptomonas seymouri	ATCC 30220	TriTrypDB
Lotmaria passim	SF	GeneBank AHIJ00000000
Crithidia fasciculata	Cf-Cl	TriTrypDB
Endotrypanum monterogeii	LV88	TriTrypDB
Leishmania enrietti	LEM3045	TriTrypDB
Leishmania martiniquensis	MARLEM2494	TriTrypDB
eishmania (Viannia) braziliensis	MHOMBR75M2904	TriTrypDB
eishmania (Viannia) panamensis	MHOM/COL/81/L13	TriTrypDB
eishmania (Leishmania) aethiopica	L147	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) amazonensis	MHOM/BR/71973/M2269	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) arabica	LEM1108	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) donovani	BPK282A1	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) gerbilli	LEM452	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) infantum	JPCM5	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) major	Friedlin	TriTrypDB
eishmania (Leishmania) mexicana	MHOM/GT/2001/U1103	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) tropica	L590	TriTrypDB
Leishmania (Leishmania) turanica	LEM423	TriTrypDB
eishmania (Sauroleishmania) tarentolae	ParrotTarII	TriTrypDB
Trypanosoma evansi	STIB 805	TriTrypDB
Trypanosoma brucei brucei	Lister 427	TriTrypDB
Trypanosoma brucei brucei	TREU927	TriTrypDB
Trypanosoma brucei gambiense	DAL972	TriTrypDB
Trypanosoma congolense	IL30000	TriTrypDB
Trypanosoma grayi	ANR4	TriTrypDB
Trypanosoma vivax	Y486	TriTrypDB
Trypanosoma rangeli	SC58	TriTrypDB
Trypanosoma cruzi cruzi	Dm28c	TriTrypDB
Trypanosoma cruzi cruzi	CL Brener	TriTrypDB

Trypanosoma cruzi cruzi	Sylvio X10.6	TriTrypDB
Trvpanosoma cruzi marinkellei	B7	TriTrvpDB

Assim como em outros parasitas, essas deficiências são supridas pelos hospedeiros e, em alguns casos, também por endossimbiontes bacterianos (Jackson, 2015a; Klein et al., 2013; Korený et al., 2010). Embora os tripanossomatídeos apresentem perdas de vários genes, o genoma haploide possui entre 25 a 35 Mb e densidade de genes variando entre 2,8 a 4,6 Kb/gene, o que é semelhante ao encontrado em organismos de vida livre, como *Saccharomyces cerevisiae* (12,5 Mb e 2,9 Kb/gene) e *Bodo saltans* (39,9 Mb e 2,1 Kb/gene) (El-Sayed et al., 2005b; Jackson, 2015a; Jackson et al., 2016). Em contraponto à perda de genes, os tripanossomatídeos desenvolveram algumas novidades metabólicas, como novos mecanismos de controle da homeostase redox, um sistema não canônico de transporte mitocondrial, ausência de proteínas ligantes nos extremos teloméricos, expansões de algumas famílias multigênicas por duplicação e aquisição de novos genes a partir de transferências horizontais (Krauth-Siegel, Comini, 2008; Jackson 2015a; Lira et al., 2007; Pusnik et al., 2009).

1.6 Organização sintênica em tripanossomatídeos

A comparação entre os genomas de diversas espécies de tripanossomatídeos revelou uma organização sintênica de genes e sob uma mesma orientação. Essa característica está presente nas regiões centrais de praticamente todos os cromossomos. A sintenia dos genes é observada em todas as espécies estudadas até o momento e inclui também *Bodo saltans*, o representante de vida livre filogeneticamente mais relacionado à família Trypanosomatidae (Figura 4) (Jackson et al., 2016).

A conservação da sintenia, mesmo após um longo tempo de divergência, está provavelmente relacionada a altas pressões seletivas (Ghedin et al., 2004). Estudos abrangentes de genômica comparativa mostram uma forte tendência à proximidade e conservação da ordem entre genes relacionados funcional ou fisiologicamente (Dávila López et al., 2010) No entanto, não há evidências suficientes de que esse fenômeno seja a única causa da sintenia extrema em tripanossomatídeos. A orientação única dentro dos blocos sintênicos é provavelmente fruto da pressão seletiva imposta pela transcrição policistrônica que ocorre nesses organismos; no entanto, a aquisição dessa característica dentro dos cinetoplastídeos permanece inexplicada (Jackson, 2015a). Enquanto a sintenia apresenta-se mais conservada no interior dos cromossomos, as regiões subteloméricas são pouco conservadas e concentram as famílias multigênicas especializadas que exibem altas taxas evolutivas e envolvidas no escape imunológico (El-Sayed et al., 2005b). Essas regiões ficaram conhecidas como zonas de contingência.

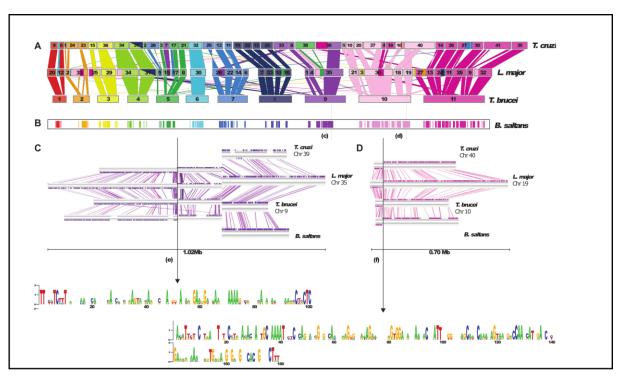


Figura 4 - Representação esquemática da organização genômica sintênica conservada ao longo de toda a família Trypanosomatidae e em Bodo saltans. A conservação da origem da replicação do bloco policistrônico é mostrada pelas setas. Adaptado de Jackson et. al., 2016.

1.7 Repertório de genes especializados

A existência de genes espécie-específicos, geralmente implicados na interação com o hospedeiro, é uma característica comum a vários grupos de parasitas, como tripanossomatídeos, oomicetos, cestoides e plasmódios (Adhikari et al., 2013; Carlton et al., 2008; Jackson et al., 2012, 2013; Tsai et al., 2013; Tyler et al., 2006). A duplicação gênica é um dos principais mecanismos que permitem o surgimento de inovações (Zhang, 2003). Segundo a teoria de nascimento e morte de genes, uma vez duplicadas, as cópias parálogas podem adquirir novas funções (neofuncionalização) ou funções semelhantes sob condições diferentes (subfuncionalização) ou degenerar, tornando-se pseudogenes (Lynch, Conery, 2000). Em tripanossomatídeos, a presença de múltiplas cópias dispostas em tandem é comum em várias famílias multigênicas, como proteínas de choque térmico e cisteína proteases (Folgueira, Requena, 2007; Sajid, McKerrow, 2002). Esse fenômeno é possivelmente decorrente da expressão policistrônica, na qual o número de cópias pode servir como controle da quantidade de mRNA transcrito (Jackson, 2015a).

Em geral, as cópias em tandem de um mesmo gene tendem a evoluir em concerto, de modo a exibirem pouco polimorfismo entre elas. Isso ocorre devido à recombinação não homóloga entre as cópias, processo conhecido como conversão gênica (Jackson, 2007). Embora prevalente no genoma dos tripanossomatídeos, a evolução em concerto não impede o surgimento de parálogos

especializados. Isso ocorre devido à quebra na estrutura de repetição em tandem por rearranjos cromossômicos e também pelo fato de que o processo de recombinação, além de permitir a evolução em concerto, também é capaz de promover diversificação entre cópias, que podem ser selecionadas de modo a apresentar novas funções (Jackson, 2007). A prolina racemase de *T. cruzi* é um exemplo de especialização funcional entre cópias, uma vez que TcPRACA e TcPRACB são expressas em etapas diferentes do ciclo do parasita e exercem funções diferentes (Chamond et al., 2003). Outro exemplo ocorre no clado *T. brucei* cujo receptor de transferrina, responsável pelo sequestro do ferro circulante do hospedeiro, evoluiu de um tipo de glicoproteína de superfície, responsável por promover a variação antigênica e escape do sistema imune (Jackson et al., 2012, 2013).

Outro mecanismo que promove a evolução genômica é a transferência horizontal de genes (HGT – horizontal gene transfer). A transferência horizontal (ou lateral) de genes se caracteriza pela transmissão de informação genética não herdada por descendência reprodutiva entre o receptor e o doador (Cooper, 2014; Keeling, Palmer 2008). Esse processo foi originalmente reconhecido na década de 60 em cepas de *Shigella*, durante um surto de disenteria no Japão (Akiba et al., 1960). Com o crescente aumento no número de genomas disponíveis, ficou evidente que, embora mais frequente em microrganismos, este processo é ubíquo e representa uma importante fonte de adaptação. São inúmeros os exemplos do aparecimento de adaptações decorrentes de transferência horizontal. Em mamíferos, a proteína conhecida como sincitina, que coordena a formação do sinciciotrofoblasto, responsável pela troca de nutrientes entre o feto e o útero, é de origem retroviral e foi adquirida em múltiplos eventos independentes ao longo da evolução dos mamíferos (Cornelis et al., 2015). A ocorrência de transferência horizontal é mais comum entre organismos como parasitas e endossimbiontes, que possuem estreita relação biológica com seus hospedeiros e organismos fagotróficos.

Em tripanossomatídeos, sabe-se que vários genes foram transferidos de várias fontes para esses parasitas, incluindo: enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos em *Leishmania* e *Trypanosoma* e genes relacionados a mobilização de cálcio e invasão celular em *T. cruzi* (origem bacteriana em ambos os casos); um sistema com seis polimerases de DNA responsáveis pela replicação do kDNA (origem viral); e enzimas e chaperonas similares às encontradas em plantas e cianobactérias (Folgueira, Requena, 2007; Hirt et al., 2015; Keeling, Palmer, 2008; Oliveira et al., 2014; Opperdoes, Michels, 2007; Silva et al., 2013). A presença de genes candidatos a terem sido transferidos de plantas ou cianobactérias para tripanossomatídeos levantou a hipótese de que a endossimbiose secundária, que gerou o cloroplasto presente nas espécies fotossintéticas de euglenídeos, possa ter ocorrido antes da divergência entre euglenídeos e cinetoplastídeos (Hannaert et

al., 2003). Entretanto, o padrão de distribuição desses genes entre os grupos que compõem o filo Euglenozoa indica que a aquisição do cloroplasto em euglenídeos é recente e que os genes encontrados em tripanossomatídeos foram adquiridos posteriormente.

A maior parte dos genes espécie-específicos está relacionada com escape imunológico, virulência e invasão de tripanossomas. A evolução desses genes apresenta características próprias, pois estão submetidos a pressões positivas de seleção e, desse modo, apresentam altas taxas de evolução, o que possibilita o rápido aparecimento de novas funções. *T. b. rhodesiense* é um exemplo, pois a resistência ao soro humano ocorre graças à presença da proteína conhecida como SRA (*Serum Resistance-Associated gene*), uma variante truncada de VSG (De Greef, Hamers, 1994; Jackson et al., 2012). Esses genes tendem a localizar-se em regiões próximas aos telômeros, que se tornaram regiões especializadas do controle da expressão e diversificação desses genes em tripanossomas. Cada clado apresenta seu próprio arsenal gênico, que é expresso em estágios específicos do ciclo de vida, garantindo a sobrevivência dos organismos tanto no hospedeiro vertebrado quanto no vetor. Na forma tripomastigota sanguínea, os genes das famílias das Mucinas e Trans-sialidases são destaque no clado *T. cruzi* (Cerqueira et al., 2008), enquanto que no clado *T. brucei* o foco está nos genes de VSGs (*Variant Surface Glycoprotein*) e ESAGs (*Expression Site Associated Genes*) (Jackson et al., 2012).

Os tripanossomatídeos apresentam regiões especializadas no genoma que dão suporte a esse amplo arsenal de genes espécie-específicos. Essas regiões encontram-se segregadas do genoma principal, situadas adjacentes aos telômeros. Elas oferecem um ambiente flexível com mecanismos epigenéticos distintos do resto do genoma e estrutura que permite altas taxas de recombinação (Figueiredo et al., Jackson, 2015^a; 2009; Rudenko 2010). Devido à alta taxa de diversificação dos genes presentes nesses *loci*, essas regiões ficaram conhecidas como zonas de contingência (Deitsch et al., 1997; Jackson, 2015a). Embora o surgimento de zonas de contingência seja fenômeno observável em vários grupos de parasitas, esta característica está acentuada em tripanossomatídeos, principalmente em tripanossomas. A variação antigênica é uma estratégia fundamental para a sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro e as zonas de contingência fornecem as características essenciais para incubação, regulação e diversificação dos genes envolvidos no fenômeno (Barry et al., 2003). Neste contexto, as VSGs presentes nos tripanossomas do clado *T. brucei* são um bom exemplo da importância evolutiva do surgimento das zonas de contingência (Jackson et al., 2012, 2013; Jackson, 2015a).

As VSGs são glicoproteínas expressas na superfície dos tripanossomas do clado *T. brucei* de maneira a formar uma monocamada que atua como uma barreira para os anticorpos produzidos

pelo hospedeiro. A expressão desses genes é coordenada por um sítio de expressão ES (*expression sites*) de modo que cada célula expressa somente uma variante de VSG por vez, que é substituída por outra quando o tripanossoma volta a expressar proteínas de superfície (Figura 5) (Jackson et al., 2012, 2013; Jackson, 2015a). Isso faz com que a monocamada protetora seja trocada periodicamente e exiba, a cada troca, uma combinação antigênica diferente. Isso possibilita que o tripanossoma se torne temporariamente invisível para a resposta imune humoral hospedeiro (Jackson, 2015a). A função do ES consiste em assegurar a expressão de uma única cópia de VSG e o silenciamento das demais. A troca entre as diferentes VSGs ocorre por recombinação não homóloga ou silenciamento do ES ativo seguido da ativação de outro (Horn, McCulloch, 2010; Rudenko, 2010). A comparação do ES entre as espécies do clado *T. brucei* revelou uma sequência conservada para todo o clado e a existência de sequências repetitivas promotoras da recombinação e genes que codificam proteínas conhecidas como ESAGs (Figura 5) (Berriman et al., 2002; Graham et al., 1999; Hertz-Fowler et al., 2008).

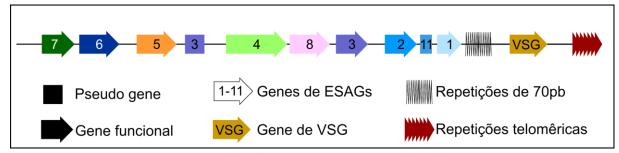


Figura 5 - Representação esquemática do sítio de expressão de T. b. brucei isolado Lister 427. Adaptado de Hertz-Fowler et al., 2008

Os genes que codificam ESAG6 e ESAG7 estão envolvidos na captação do ferro, essencial para a manutenção de diversas funções fisiológicas em tripanossomas. A captação do ferro ocorre via captação da transferrina circulante do hospedeiro por um receptor formado por hetorodímeros das ESAG6 e ESAG7 (Schell et al., 1991; Steverding, 2000, 2003). Os genes das ESAG6s e ESAG7s são homólogos entre si e ambos evoluíram a partir de uma variante de VSG presente no tripanossoma ancestral de *T. brucei* e *T. congolense* (Jackson et al., 2012, 2013). Apesar da similaridade entre as sequências desses genes, não são observadas recombinações entre os genes do receptor de transferrina e as VSGs (Jackson, 2015a).

As várias cópias dessas ESAGs mostraram-se muito polimórficas, com pelo menos 20 variantes descritas em *T. brucei* spp., e pouco polimórficas em *T. evansi* (Isobe et al., 2003; Witola et al., 2005). Estudos sugerem uma relação entre variabilidade de ESAG6 e ESAG7 e a manutenção da captação de ferro, mesmo na presença de anticorpos antiESAG6-7 que competem com a transferrina pela ligação ao receptor (Steverding, 2003). O polimorfismo das ESAG6 e ESAG7 também pode desempenhar um papel na capacidade de infectar hospedeiros diferentes, pois permite captação

contínua de ferro mesmo entre transferrinas de várias espécies de vertebrados (Young et al., 2008). Além da importância fisiológica para o parasita, os diferentes níveis de polimorfismo exibidos pelos tripanossomas africanos podem ser usados em estudos populacionais, identificação de genótipos e coevolução entre parasita e hospedeiro (Witola et al., 2005)

Além dos genes implicados no escape imunológico, os tripanossomas contam com um vasto arsenal de chaperonas e co-chaperonas, moléculas cruciais tanto para as transformações celulares sofridas ao longo do ciclo, quanto para assegurar a sobrevivência durante a troca do hospedeiro. O estresse celular não somente faz parte do ciclo de vida desses organismos como também desempenha um papel de gatilho que desencadeia profundas mudanças no padrão de expressão proteica e promove a diferenciação celular e progressão do ciclo dos parasitas (Folgueira, Requena, 2007; Pérez-Morales, Espinoza, 2015). Entre as diversas famílias de chaperonas presentes nos tripanossomas, as proteínas de choque térmico (HSP) destacam-se pela diversidade do repertório. Algumas famílias de HSP em tripanossomas apresentam genes especializados não encontrados em outros organismos e cuja função ainda é desconhecida, como a família HSP70, enquanto que, comparativamente a outros organismos, a família HSP40 possui ao menos duas vezes a quantidade de genes (Folgueira, Requena, 2007).

1.7.1 Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins* – HSPs) atuam como chaperonas moleculares que protegem proteínas recém-sintetizadas, desnaturadas ou danificadas, impedindo a formação irreversível de aglomerados proteicos (Burdon, 1986; Goloubinoff, De Los Rios, 2007; Lindquist, Craig 1988). Embora inicialmente descritas como específicas de condições de choque térmico, diversas condições de estresse celular (variação de pH, ação de toxinas, hipóxia, infecções, radiação e radicais livres) são capazes de desencadear a expressão de HSPs (Burdon, 1986; Lindquist, Craig, 1988). Isto ocorre devido ao aparecimento de proteínas na forma não nativa em condições de estresse celular (Feder, Hofmann, 1999). Embora vitais para assegurar a sobrevivência da célula em condições de estresse, elas também são constitutivamente expressas. As HSPs prestam assistência na síntese, ativação e transporte proteico entre compartimentos celulares (Folgueira, Requena, 2007; Genevaux et al., 2007; Goloubinoff, De Los Rios, 2007). As HSPs são ubíquas e fazem parte das proteínas com estrutura mais conservada ao longo da evolução. São encontradas sob a forma de um ou mais parálogos em todos os compartimentos da célula (Tutar, Tutar, 2010). A classificação das HSPs é feita conforme o peso molecular, sendo divididas atualmente em seis famílias e superfamílias: HSP90, HSP104/CLpB, HSP60/HSP10, HSP40, sHSP (Small heat shock proteins) e

HSP70, que incluiu a família HSP110 por homologia da sequência (Burdon, 1986; Easton et al., 2000; Lindquist, Craig, 1988; Tutar, Tutar, 2010).

Os parasitas correspondem a um caso peculiar, pois o estresse celular é parte crucial do ciclo de vida desses organismos. Neste caso, as HSPs, além de manter a homeostase, são usadas como estratégia de adaptação durante a troca entre hospedeiros. Para a grande maioria dos parasitas, a troca entre microambientes é acompanhada de variações de temperatura, concentração de micronutrientes e pH (Figura 6), alterações acompanhadas por uma forte indução de HSPs (Maresca, Carratu, 1992). Em tripanossomatídeos, análises proteômicas detalhadas durante a diferenciação de *Leishmania donovani* e *T. cruzi* mostraram aumento na síntese de HSP60, HSP70 (citosólica e mitocondrial) e HSP90 (Bente et al., 2003; Paba et al., 2004). Porém, ainda não é claro se as HSPs estão apenas relacionadas com o estresse celular momentâneo ou se atuam diretamente no processo de diferenciação celular (Folgueira, Requena, 2007; Maresca, Carratu, 1992).

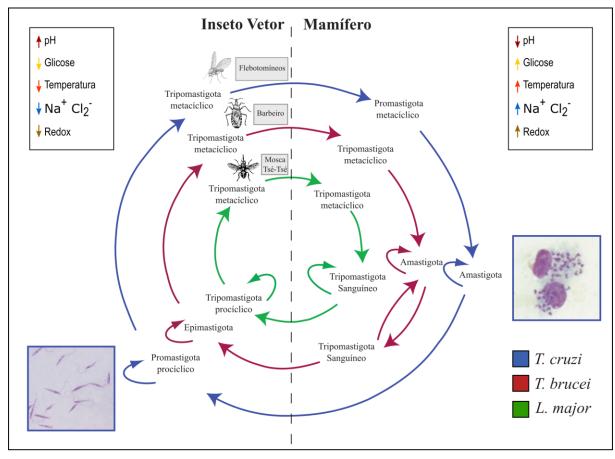


Figura 6 - Diferenças entre o microambiente encontrado no hospedeiro vertebrado e no vetor Adaptado de Folgueira e Requena, 2007 e Pérez-Morales e Espinoza 2015.

A família HSP104 é responsável por inibir a formação de agregados proteicos e também participa da reestruturação da estrutura terciária de peptídeos. Esta última característica faz com que essa família seja importante no controle da formação de *príons* (Shorter; Lindquist, 2008). Os

representantes dessa família são conhecidos como ClpB (bactérias), HSP104 (leveduras) e HSP101 (plantas). Estudos recentes mostraram a presença de um gene de HSP100 (membro das HSP104) em *Leishmania donovani*; indicando uma provável função no desenvolvimento normal do parasita, mutantes para os dois alelos apresentam amastigotas com morfologia aberrante (Krobitsch, Clos, 1999).

A família HSP60/HSP10, também conhecida como Chaperoninas do tipo I, está presente em bactérias e em organelas eucarióticas de origem procariótica, como mitocôndria e cloroplasto (Hirtreiter et al., 2009). A HSP60 necessita formar um complexo que inclui várias subunidades da HSP10, de modo a atuar como uma jaula, conhecida como gaiola de Anfinsen (Hartl, Hayer-Hartl, 2002), que retém proteínas recém-sintetizadas. Em tripanossomas, a concentração da HSP60 nas formas encontradas no inseto é de três a quatro vezes maior quando comparada à presente nas formas sanguíneas. Isso provavelmente decorre da adaptação do metabolismo mitocondrial durante a passagem entre os hospedeiros (Bringaud et al., 1995).

As HSP90s estão presentes em todos os compartimentos da célula e, embora tenham sido descritas como proteínas de estresse térmico, em condições normais representam de 1 a 2% de todas as proteínas da célula (Montalvo-Alvarez et al., 2008). Essa família, junto com a HSP70, é responsável pela reciclagem e pelo controle do tráfego de proteínas entre os compartimentos celulares. A maior parte das proteínas clientes da HSP90 está envolvida no controle do ciclo celular e transdução de sinal (Richter, Buchner, 2001; Pratt, Toft, 2003; Whitesell, Lindquist, 2005). Em tripanossomatídeos, vários genes que codificam HSP90 foram descritos, sobretudo para *T. b. brucei, T. cruzi* e *Leishmania* spp.: HSP83 no citoplasma (Dragon et al., 1987; Mottram et al., 1989; Shapira, Pedraza, 1990), Grp94 (Larreta et al., 2000; Folgueira, Requena, 2007) no retículo e mtHSP70 na mitocôndria (Folgueira, Requena, 2007). Na maior parte dos casos, foram encontradas várias cópias de cada gene dispostas em tandem (Folgueira, Requena, 2007).

Assim como as HSP90, os membros da família HSP70 são ubíquos e estão envolvidos no transporte através de membrana entre organelas, degradação de peptídeos instáveis, excreção, transdução de sinal, regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (Sharma, Masison, 2009; Zylicz, Wawrzynow, 2001). A família HSP110, embora classificada inicialmente como uma família a parte devido ao peso molecular, foi reclassificada com base na homologia da sequência como pertencente à família HSP70 (Easton et al., 2000). As HSP110s exibem baixa afinidade por proteínas clientes, carregando-as momentaneamente, função conhecida como *holdase*. No entanto, a principal função dessa família é atuar como co-chaperonas, estimulando a troca de ADP por ATP (*nucleotide exchange factor* – Nef) durante o mecanismo de acão, dependente de ATP, das demais HSP70s

(Dragovic et al., 2006). A arquitetura da família HSP70 é conservada, sendo composta por um sítio de ligação ao ATP, situado na porção amino-terminal, e outro de ligação às proteínas clientes, na porção carboxi-terminal, ambos ligados por uma região conservada denominada *Linker* (Figura 7) (Goloubinoff, De Los Rios, 2007).

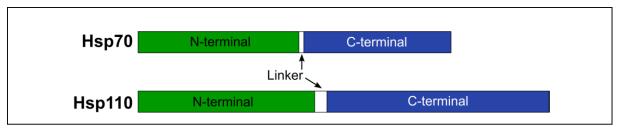


Figura 7 - Arquitetura da família Hsp70. A arquitetura e sequência são conservadas entre as Hsp110 e Hsp70.

Para desempenhar essa gama de funções, é necessária a associação com outras HSPs, como a HSP90 e HSP40, que parecem ter evoluído de maneira conjunta aos genes da superfamília HSP70 (Kabani, 2009). Proteínas da família HSP70 estão presentes em todos os compartimentos, podendo apresentar múltiplos membros em um mesmo compartimento (Kabani, Martineau, 2008). Em eucariotos, análises filogenéticas têm mostrado a existência de quatro grupos monofiléticos de HSP70, que correspondem ao citoplasma, retículo endoplasmático, mitocôndria e cloroplasto (Gupta, Golding, 1993; Gupta et al., 1994). A hipótese mais aceita para o surgimento desses grupos defende que as HSP70s citoplasmáticas e do retículo surgiram a partir de uma duplicação de uma HSP70 primitiva, presente no ancestral comum a todos os eucariotos, e se adaptaram aos compartimentos celulares em formação (Germot, Philippe, 1999). Os grupos residentes do cloroplasto e mitocôndria são de origem procariótica e foram transferidos para o núcleo pelo ancestral endossimbionte durante o processo de formação dessas organelas (Boorstein et al., 1994; Germot, Philippe, 1999; Gupta, Golding, 1993). Os genes de HSP70 têm sido usados em estudos filogenéticos de vários grupos de eucariotos, inclusive parasitas de importância médica, como *Cryptosporidium* spp. e *Babesia* spp., e, mais recentemente, para *Leishmania* spp. (Fraga et al., 2010; Sulaiman et al., 2000; Yamasaki et al., 2002).

Diversos genes de HSP70 foram descritos em tripanossomas e leishmanias no citoplasma (HSP70, HSP70.4, HSP70.c) (Folgueira, Requena, 2007; Glass et al., 1986; Lee et al., 1988, 1990; Requena et al., 1988); retículo (Grp78) (Bangs et al., 1993; Jensen et al., 2001; Tibbetts et al., 1994); mitocôndria (mtp70 – Lc2.1 e Lc2.2) (Campos et al., 2008; Engman et al., 1989); e HSP110s (Grp170 e HSP110) (Folgueira, Requena, 2007). Além desses genes, a comparação entre os genomas de *T. cruzi, T. b. brucei* e *L. major* revelou a existência de dois parálogos divergentes, HSP70.a e HSP70.b, sendo o primeiro sem ortólogos conhecidos fora de tripanossomatídeos e o segundo, semelhante ao encontrado em algumas cianobactérias, uma possível aquisição por transferência horizontal (Folgueira, Requena, 2007).

Os integrantes da família da HSP40 possuem sequência diversificada, embora todas compartilhem um domínio conhecido como Domínio J, com cerca de 70 resíduos, geralmente localizado na porção amino-terminal (Walsh et al., 2004). Esse domínio é fundamental para a parceria funcional entre as HSP40s e as HSP70s. Foram descritas inicialmente quatro HSP40 em *T. cruzi*, chamadas de TcJ1-4 (Tibbetts et al., 1998), mas a busca por genes contendo o domínio J em tripanossomatídeos mostrou a existência de pelo menos 67 genes presentes em *L. major*, *T. b. brucei* e *T. cruzi* (Folgueira, Requena, 2007). Embora exista uma expansão dessa família em tripanossomatídeos em relação a outros parasitas, a família HSP40 permanece como a menos estudada das HSPs nesses organismos.

As proteínas de choque térmico de baixo peso molecular (*Small Heat Shock Proteins* – sHSP) representam a família menos conservada, porém, amplamente difundida entre todos os reinos (de Miguel et al., 2009; Haslbeck et al., 2005;). Estruturalmente, todas as sHSPs possuem somente um domínio característico, considerado assinatura dessa família e relativamente conservado em tripanossomatídeos (Folgueira, Requena, 2007). Esse domínio recebe o nome de α-cristalino, pois as sHSPs são uma das classes de proteínas mais abundantes no cristalino de vertebrados. Estudos filogenéticos sugerem que as sHSPs divergiram bem cedo na história evolutiva, estando presente no último ancestral comum entre procariotos e eucariotos (Fu et al., 2006). O número de parálogos parece aumentar conforme o grau de complexidade do organismo, o que sugere a existência de funções especializadas relacionadas a tecidos (Haslbeck et al., 2005). Apesar da função importante em organismos parasitas (Pérez-Morales, Espinoza, 2015), a análise genômica *in silico* revelou um único gene, HSP20, em *T. brucei, L. major* e *T. cruzi* (Folgueira, Requena, 2007). Esse gene foi mais tarde caracterizado bioquimicamente em *T. cruzi* (Perez-Morales et al., 2009). Recentemente, o gene da HSP20 tem sido usado combinado ao da HSP70 para identificação de espécies de *Leishmania* (Fraga et al., 2013; Montalvo et al., 2014).

1.7.2 Catepsinas L-like de tripanossomas

A Catepsina L (CATL) é uma cisteína protease envolvida nos processos de invasão, multiplicação e diferenciação em tripanossoma, estando também envolvida na modulação da resposta imune do hospedeiro (Garcia et al. 2011a, 2011b; Jefferson et al. 2016). A CATL é sintetizada na forma de pré-pro-catepsina no retículo endoplasmático, em seguida direcionada para os lisossomos, quando o pré-domínio (peptídeo sinal) é removido, gerando a pro-catepsina. Ao chegar aos lisossomos sofre a conversão pelo pH ácido para a forma madura com atividade de endopeptidase. A CATL-like de tripanossomas possui quatro domínios: pré-domínio, que é o peptídeo sinal, pró-domínio, domínio catalítico e extensão carboxi-terminal. O domínio catalítico é responsável pela atividade da enzima,

sendo conservado em todas as espécies de tripanossoma. A comparação entre os genomas disponíveis mostrou uma grande quantidade de cópias dispostas em tandem (Campetella et al., 1992; Eakin et al., 1992). A enzima arquétipo, descrita em *T. cruzi* (TcrCATL), é codificada por pelo menos 130 genes que apresentam níveis variados de polimorfismo, contrastando com T. brucei e T. rangeli, que possuem cerca de 20 e 75 cópias, respectivamente (Campetella et al., 1992; Eakin et al., 1992). Desse modo, em tripanossomas a CATL é uma família multigênica cujos membros desempenham papéis diferentes conforme a espécie e o estágio do ciclo de vida e dessa forma são fundamentais para a sobrevivência do parasita. Estudos sugerem que todas as cisteína proteases similares com Catepsina L são homologas e divergiram, originando diversas variantes ao longo do processo de especiação (Sajid, McKerrow, 2002). Os genes de Catepsina L de tripanossomas têm sido usados com sucesso para diagnóstico, genotipagem, alvos terapêuticos e estudos evolutivos em T. theileri, T. rangeli, T. cruzi, T. brucei e T. vivax (Cortez et al. 2009; Ettari et al. 2016; Garcia et al. 2011a, 2011b; Jefferson et al. 2016; Lima et al. 2012a; Nakayima et al. 2013; Rodrigues et al. 2010, 2015; Ortiz et al. 2009). A grande diversidade de funções exibidas por essas proteases pode ter contribuído para complexidade do ciclo de vida e o grande número de hospedeiros e vetores observados em *Trypanosoma* (Alvarez et al., 2012; Atkinson et al., 2009; Lima et al., 2012a). Evidencias apontam que os blocos que compreendem as cópias de CATL são sintênicos e podem estar evoluindo em concerto; no caso dos tripanossomatídeos essa característica é compartilhada entre genes que se comportam como bons marcadores filogenéticos (Jackson, 2007). Nesse contexto, estudos apontam que os genes de CATL possuem potencial como marcadores para diagnóstico, para a determinação de genótipos e, também, estudos filogenéticos (Ruszczyk et al., 2008; Sakanari et al., 1997; Ortiz et al., 2009).

1.7.2 Prolina racemase

A prolina racemase (PRAC) pertence ao grupo das enzimas que promovem a interconversão entre os aminoácidos estereoisômeros levógiros (L) e dextrógiros (D), produzindo uma mistura racêmica. As enzimas pertencentes à classe das aminoácido-racemases são associadas a funções metabólicas, nutricionais e imunológicas em patógenos (Yoshimura, Esak, 2003). Essas enzimas estão presentes em uma grande variedade de procariotos e em alguns grupos de eucariotos cujo gene foi adquiro por transferência horizontal (Fitzpatrick et al., 2008; Visser et al., 2012; Yoshimura, Esak 2003). Em bactérias patogênicas, as aminoácido-racemases são responsáveis pela presença de Daminoácidos na parede celular, o que confere proteção contra a ação enzimática e os componentes proteolíticos do sistema imune dos hospedeiros (Coatnoan et al., 2009; Thompson et al., 1998).

Originalmente descrita em *Clostridium sticklandii* (Stadtman, Elliott, 1957), *T. cruzi* foi o primeiro eucarioto descrito com um gene funcional de prolina racemase (Reina-San-Martín et al.,

2000). Mais tarde, foi comprovada a existência do gene da PRAC em *T. vivax* (Chamond et al., 2009). Em *T. cruzi*, os estudos sobre a PRAC mostraram a existência de duas cópias, TcPRACA e TcPRACB, que são expressas diferencialmente e desempenham funções essenciais para a sobrevivência do parasita (Chamond et al., 2003, 2005). TcPRACA possui cerca de 45KDa e é secretada tanto por tripomastigotas metacíclicos quanto sanguíneos, graças à presença de um peptídio sinal, ausente na TcPRACB. A TcPRACB é menor devido à ausência de peptídeo sinal (cerca de 39kDa). Desse modo, a TcPRACB não é secretada, sendo expressa principalmente na forma epimastigota. Embora as duas difiram pela presença do peptídeo sinal e função, ambas compartilham cerca de 96% de identidade na sequência de aminoácidos (Chamond et al., 2003).

Estudos com inibidores da TcPRAC evidenciam que a inativação da enzima é responsável pela diminuição da proliferação e viabilidade do parasita, o que evidencia o potencial dessa enzima como alvo quimioterapêutico no tratamento da Doença de Chagas (Conti et al., 2011; Coutinho et al., 2009). Estudos imunológicos indicam que a TcPRACA secretada pelas formas sanguíneas é capaz de induzir a ativação policional dos linfócitos B e, consequentemente, um atraso na resposta imune humoral (Buschiazzo et al., 2006; Chamond et al., 2005; Reina-San-Martín et al., 2000). Também foi comprovada que TcPRAC é capaz de induzir a liberação de IL-10, interleucina responsável pela supressão de algumas vias imunológicas, deixando o hospedeiro susceptível a infecção por T. cruzi (Bryan, Norris, 2010; Chamond et al., 2003, 2005; Reina-San-Martín et al., 2000). Do mesmo modo que em bactérias, também foi sugerido que TcPRAC pudesse participar da incorporação de D-aminoácidos em peptídeos de superfície, o que tornaria T. cruzi resistente a ação proteolítica e enzimática do hospedeiro (Coatnoan et al., 2009; Reina-San-Martín et al., 2000). A procura por genes de PRAC em T. vivax revelou um único gene, TvPRAC, semelhante à TcPRACB por não possuir o peptídeo sinal e exibir parâmetros cinéticos e imunológicos semelhantes aos encontrados em *T. cruzi* (Chamond et al., 2009). Embora a TvPRAC não apresente sinalização para ser secretada, experimentos in vivo mostraram um aumento no número de linfócitos B, como também altos títulos de anticorpos no soro de camundongos (Chamond et al., 2009). Desse modo, foi levantada a possibilidade da TvPRAC ser secretada via bolso flagelar ou liberada na lise do parasita junto com o conteúdo intracelular (Chamond et al., 2009).

A comparação genômica entre as espécies de tripanossoma revelou que o *locus* do gene da PRAC é sintênico entre *T. vivax* e *T. cruzi.* Contudo, nenhum ortólogo da PRAC foi encontrado em *T. brucei brucei,* enquanto que em *T. congolense* foram encontrados apenas vestígios do que teria sido um pseudogene no loci homologo ao da TcPRAC e TvPRAC (Chamond et al., 2009). Nos genomas de *L. major, Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum,* o locus da PRAC parece ter sido ocupado por

um gene que codifica uma proteína da família Tub, ausente no loci correspondente em *Trypanosoma* (Chamond et al., 2003, 2009).

REFÊRENCIAS1

Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinforma Oxf Engl. 1 de maio de 2005;21(9):2104–5.

Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. Trends Parasitol. julho de 2010;26(7):324–8.

Adhikari BN, Hamilton JP, Zerillo MM, Tisserat N, Lévesque CA, Buell CR. Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. PloS One. 2013;8(10):e75072.

Akiba T, Koyama K, Ishiki Y, Kimura S, Fukushima T. On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella. Jpn J Microbiol. abril de 1960;4:219–27.

Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ. The peptidases of Trypanosoma cruzi: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. Biochim Biophys Acta. janeiro de 2012;1824(1):195–206.

Alves JMP, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG, et al., Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. PloS One. 2011;6(8):e23518.

Atkinson HJ, Babbitt PC, Sajid M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. Trends Parasitol. dezembro de 2009;25(12):573–81.

Bangs JD, Uyetake L, Brickman MJ, Balber AE, Boothroyd JC. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in Trypanosoma brucei. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. J Cell Sci. agosto de 1993;105 (Pt 4):1101–13.

Barry JD, Ginger ML, Burton P, McCulloch R. Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? Int J Parasitol. janeiro de 2003;33(1):29–45.

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al., Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite Leishmania donovani. Proteomics. setembro de 2003;3(9):1811–29.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al., The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. Science. 15 de julho de 2005;309(5733):416–22.

Berriman M, Hall N, Sheader K, Bringaud F, Tiwari B, Isobe T, et al., The architecture of variant surface glycoprotein gene expression sites in Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol. julho de 2002;122(2):131–40.

Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. J Mol Evol. janeiro de 1994;38(1):1–17.

Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CSA, Campaner M, Borda CC, Paiva F, et al., Molecular phylogenetic redefinition of Herpetomonas (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. Protist. janeiro de 2013;164(1):129–52.

Borst P, Sabatini R. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. Annu Rev Microbiol. 2008;62:235–51.

Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. J Eukaryot Microbiol. janeiro de 2007;54(1):86–92.

Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references.

Available from: http://www.icmje.org

[updated 2011 Jul 15].

-

De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors.

Bringaud F, Peyruchaud S, Baltz D, Giroud C, Simpson L, Baltz T. Molecular characterization of the mitochondrial heat shock protein 60 gene from Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol. outubro de 1995;74(1):119–23.

Bryan MA, Norris KA. Genetic immunization converts the trypanosoma cruzi B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen. Infect Immun. fevereiro de 2010;78(2):810–22.

Burdon RH. Heat shock and the heat shock proteins. Biochem J. 1 de dezembro de 1986;240(2):313–24.

Buschiazzo A, Goytia M, Schaeffer F, Degrave W, Shepard W, Grégoire C, et al., Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of Trypanosoma cruzi proline racemase. Proc Natl Acad Sci U S A. 7 de fevereiro de 2006;103(6):1705–10.

Busse I, Preisfeld A. Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. J Mol Evol. dezembro de 2002;55(6):757–67.

Camargo EP. Growth and Differentiation in Trypanosoma Cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. maio de 1964;6:93–100.

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. Mol Biochem Parasitol. fevereiro de 1992;50(2):225–34.

Campos RM, Nascimento M, Ferraz JC, Pereira MM, Rocha PO, Thompson GM, et al., Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various Leishmania species suggest novel biological functions. Mol Biochem Parasitol. agosto de 2008;160(2):157–62.

Capewell P, Cooper A, Clucas C, Weir W, Macleod A. A co-evolutionary arms race: trypanosomes shaping the human genome, humans shaping the trypanosome genome. Parasitology, fevereiro de 2015;142 Suppl 1:S108–19.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al., Comparative genomics of the neglected human malaria parasite Plasmodium vivax. Nature. 9 de outubro de 2008;455(7214):757–63.

Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol. abril de 2000;17(4):540–52.

Cavazzana M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, et al., Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats. Int J Parasitol. 1 de março de 2010;40(3):345–55.

Cerqueira GC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Hou L, Freitas-Silva DM, Machado CR, et al., Sequence diversity and evolution of multigene families in Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. janeiro de 2008;157(1):65–72.

Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Minoprio P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a Trypanosoma vivax proline racemase. Mol Biochem Parasitol. junho de 2009;165(2):170–9.

Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale J-C, Cosson A, Degrave WM, et al., Trypanosoma cruzi proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. Mol Microbiol. outubro de 2005;58(1):46–60.

Chamond N, Grégoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, et al., Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite Trypanosoma cruzi and definition of putative protein signatures. J Biol Chem. 2 de maio de 2003;278(18):15484–94.

Coatnoan N, Berneman A, Chamond N, Minoprio P. Proline racemases: insights into Trypanosoma cruzi peptides containing D-proline. Mem Inst Oswaldo Cruz. julho de 2009;104 Suppl 1:295–300.

Conti P, Tamborini L, Pinto A, Blondel A, Minoprio P, Mozzarelli A, et al., Drug discovery targeting amino acid racemases. Chem Rev. 9 de novembro de 2011;111(11):6919–46.

Cooper ED. Horizontal gene transfer: accidental inheritance drives adaptation. Curr Biol CB. 16 de junho de 2014;24(12):R562–4.

Cornelis G, Vernochet C, Carradec Q, Souquere S, Mulot B, Catzeflis F, et al., Retroviral envelope gene captures and syncytin exaptation for placentation in marsupials. Proc Natl Acad Sci U S A. 3 de fevereiro de 2015;112(5):E487–96.

Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, et al. Cathepsin L-like genes of Trypanosoma vivax from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. Mol Cell Probes. fevereiro de 2009;23(1):44–51.

Corradi N, Slamovits CH. The intriguing nature of microsporidian genomes. Brief Funct Genomics. maio de 2011;10(3):115–24.

Coutinho L, Ferreira MA, Cosson A, Batista MM, Batista D da GJ, Minoprio P, et al., Inhibition of Trypanosoma cruzi proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. dezembro de 2009;104(8):1055–62.

D'Avila-Levy CM, Volotão ACC, Araújo FM, de Jesus JB, Motta MCM, Vermelho AB, et al., Bodo sp., a free-living flagellate, expresses divergent proteolytic activities from the closely related parasitic trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. outubro de 2009;56(5):454–8.

Dávila López M, Martínez Guerra JJ, Samuelsson T. Analysis of gene order conservation in eukaryotes identifies transcriptionally and functionally linked genes. PloS One. 2010;5(5):e10654.

De Greef C, Hamers R. The serum resistance-associated (SRA) gene of Trypanosoma brucei rhodesiense encodes a variant surface glycoprotein-like protein. Mol Biochem Parasitol. dezembro de 1994;68(2):277–84.

Deitsch KW, Moxon ER, Wellems TE. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. setembro de 1997;61(3):281–93.

Deschamps P, Lara E, Marande W, Lopez-Garcia P, Ekelund F, Moreira D. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. Mol Biol Evol. janeiro de 2011;28(1):53–8.

Dragon EA, Sias SR, Kato EA, Gabe JD. The genome of Trypanosoma cruzi contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. Mol Cell Biol. março de 1987;7(3):1271–5.

Dragovic Z, Broadley SA, Shomura Y, Bracher A, Hartl FU. Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. EMBO J. 7 de junho de 2006;25(11):2519–28.

Dvořáková N, Čepička I, Qablan MA, Gibson W, Blažek R, Široký P. Phylogeny and Morphological Variability of Trypanosomes from African Pelomedusid Turtles with Redescription of Trypanosoma mocambicum Pienaar, 1962. Protist. dezembro de 2015;166(6):599–608.

Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from Trypanosoma cruzi. J Biol Chem. 15 de abril de 1992;267(11):7411–20.

Easton DP, Kaneko Y, Subjeck JR. The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. Cell Stress Chaperones. outubro de 2000;5(4):276–90.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004;32(5):1792–7.

Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinforma Oxf Engl. 1 de outubro de 2010;26(19):2460–1.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, et al., The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. Science. 15 de julho de 2005a;309(5733):409–15.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al., Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science. 15 de julho de 2005b;309(5733):404–9.

Engman DM, Kirchhoff LV, Donelson JE. Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. Mol Cell Biol. novembro de 1989;9(11):5163–8.

Estévez AM, Simpson L. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review. Gene. 29 de novembro de 1999;240(2):247–60.

Ettari R, Previti S, Tamborini L, Cullia G, Grasso S, Zappalà M. The Inhibition of Cysteine Proteases Rhodesain and TbCatB: a Valuable Approach to Treat Human African Trypanosomiasis. Mini Rev Med Chem. 9 de maio de 2016.

Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol. 1999;61:243–82.

Fermino BR, Paiva F, Soares P, Tavares LER, Viola LB, Ferreira RC, et al., Field and experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish trypanosomes and transmitted by leeches. Int J Parasitol Parasites Wildl. dezembro de 2015;4(3):368–78.

Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, et al., The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of Crocodylus at the Miocene. Parasit Vectors. 2013;6(1):313.

Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, et al., A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in brazilian amazonia. J Eukaryot Microbiol. setembro de 2008;55(5):427–35.

Figueiredo LM, Cross GAM, Janzen CJ. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. Nat Rev Microbiol. julho de 2009;7(7):504–13.

Fitzpatrick DA, Logue ME, Butler G. Evidence of recent interkingdom horizontal gene transfer between bacteria and Candida parapsilosis. BMC Evol Biol. 2008;8:181.

Flegontov P, Votýpka J, Skalický T, Logacheva MD, Penin AA, Tanifuji G, et al., Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. Curr Biol CB. 23 de setembro de 2013;23(18):1787–93.

Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev. julho de 2007;31(4):359–77.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. março de 2010;10(2):238–45.

Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin J-C, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the Leishmania heat-shock protein 20 gene. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. agosto de 2013;18:229–37.

Fu X, Jiao W, Chang Z. Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. J Mol Evol. março de 2006;62(3):257–66.

Garcia HA, Kamyingkird 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. Vet Parasitol. 25 de agosto de 2011;180(3-4):363–7.

Garcia HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AHH, Campaner M, Nunes VLB, et al. Multilocus phylogeographical analysis of Trypanosoma (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. Int J Parasitol. novembro de 2011b;41(13–14):1385–96.

Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL. The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions. Mol Microbiol. novembro de 2007;66(4):840–57.

Germot A, Philippe H. Critical analysis of eukaryotic phylogeny: a case study based on the HSP70 family. J Eukaryot Microbiol. março de 1999;46(2):116–24.

Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, Myler P, Berriman M, Ivens A, et al., Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. abril de 2004;134(2):183–91.

Giambiagi-deMarval M, Souto-Padron T, Rondinelli E. Characterization and cellular distribution of heat-shock proteins HSP70 and HSP60 in Trypanosoma cruzi. Exp Parasitol. agosto de 1996;83(3):335–45.

Gibbs SP. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. Ann N Y Acad Sci. 1981;361:193–208.

Gilles HM. Protozoal diseases. London: New York: Arnold; Oxford University Press; 1999.

Glass DJ, Polvere RI, Van der Ploeg LH. Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in Trypanosoma brucei. Mol Cell Biol. dezembro de 1986;6(12):4657–66.

Goloubinoff P, De Los Rios P. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. Trends Biochem Sci. agosto de 2007;32(8):372–80.

Graham SV, Terry S, Barry JD. A structural and transcription pattern for variant surface glycoprotein gene expression sites used in metacyclic stage Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol. 15 de outubro de 1999;103(2):141–54.

Guhl F, Vallejo GA. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. junho de 2003;98(4):435–42.

Gupta RS, Golding GB. Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. J Mol Evol. dezembro de 1993;37(6):573–82.

Gupta RS, Golding GB, Singh B. HSP70 phylogeny and the relationship between archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. J Mol Evol. novembro de 1994;39(5):537–40.

Hamilton PB, Adams ER, Malele I, 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. Infect Genet Evol. janeiro de 2008;8(1):26–33.

Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the Trypanosoma cruzi clade in African terrestrial mammals. Infect Genet Evol. janeiro de 2009;9(1):81–6.

Hamilton PB, Cruickshank C, Stevens JR, Teixeira MMG, Mathews F. Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. Mol Phylogenet Evol. maio de 2012a;63(2):521–6.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol. julho de 2007;44(1):15–25.

Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. Int J Parasitol. novembro de 2004;34(12):1393–404.

Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). Int J Parasitol. 1 de abril de 2005;35(4):431–43.

Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of Trypanosoma cruzi: the "bat seeding" hypothesis. Trends Parasitol. abril de 2012b;28(4):136–41.

Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. J Mol Evol. dezembro de 1998;47(6):728–38.

Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora J-P, Rigden DJ, Michels PAM, et al., Plant-like traits associated with metabolism of Trypanosoma parasites. Proc Natl Acad Sci U S A. 4 de fevereiro de 2003;100(3):1067–71.

Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science. 8 de março de 2002;295(5561):1852–8.

Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. Nat Struct Mol Biol. outubro de 2005;12(10):842–6.

Hertz-Fowler C, Figueiredo LM, Quail MA, Becker M, Jackson A, Bason N, et al., Telomeric expression sites are highly conserved in Trypanosoma brucei. PloS One. 2008;3(10):e3527.

von der Heyden S, Cavalier-Smith T. Culturing and environmental DNA sequencing uncover hidden kinetoplastid biodiversity and a major marine clade within ancestrally freshwater Neobodo designis. Int J Syst Evol Microbiol. novembro de 2005;55(Pt 6):2605–21.

Hirtreiter AM, Calloni G, Forner F, Scheibe B, Puype M, Vandekerckhove J, et al., Differential substrate specificity of group I and group II chaperonins in the archaeon Methanosarcina mazei. Mol Microbiol. dezembro de 2009;74(5):1152–68.

Hirt RP, Alsmark C, Embley TM. Lateral gene transfers and the origins of the eukaryote proteome: a view from microbial parasites. Curr Opin Microbiol. fevereiro de 2015;23:155–62.

Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. J Protozool. maio de 1964;11:200–7.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford,: Blackwell Scientific Publications; 1972.

Horn D, McCulloch R. Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. Curr Opin Microbiol. dezembro de 2010;13(6):700–5.

Hrdá Š, Fousek J, Szabová J, Hampl V, Hampl V, Vlček Č. The plastid genome of Eutreptiella provides a window into the process of secondary endosymbiosis of plastid in euglenids. PloS One. 2012;7(3):e33746.

Hubel A, Krobitsch S, Horauf A, Clos J. Leishmania major Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. Mol Cell Biol. outubro de 1997;17(10):5987–95.

Huson DH, Scornavacca C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. Syst Biol. 1 de dezembro de 2012;61(6):1061–7.

Isobe T, Holmes EC, Rudenko G. The transferrin receptor genes of Trypanosoma equiperdum are less diverse in their transferrin binding site than those of the broad-host range Trypanosoma brucei. J Mol Evol. abril de 2003;56(4):377–86.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al., The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science. 15 de julho de 2005;309(5733):436–42.

Jackson AP. Tandem gene arrays in Trypanosoma brucei: comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. BMC Evol Biol. 2007;7:54.

Jackson AP. Genome evolution in trypanosomatid parasites. Parasitology. fevereiro de 2015a;142 Suppl 1:S40–56.

Jackson AP. Preface. The evolution of parasite genomes and the origins of parasitism. Parasitology. fevereiro de 2015b;142 Suppl 1:S1–5.

Jackson AP, Allison HC, Barry JD, Field MC, Hertz-Fowler C, Berriman M. A cell-surface phylome for African trypanosomes. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3):e2121.

Jackson AP, Berry A, Aslett M, Allison HC, Burton P, Vavrova-Anderson J, et al., Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 de fevereiro de 2012;109(9):3416–21.

Jackson AP, Otto TD, Aslett M, Armstrong SD, Bringaud F, Schlacht A, et al., Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. Curr Biol CB. 25 de janeiro de 2016;26(2):161–72.

Jefferson T, McShan D, Warfield J, Ogungbe IV. Screening and Identification of Inhibitors of Trypanosoma brucei Cathepsin L with Antitrypanosomal Activity. Chem Biol Drug Des. janeiro de 2016;87(1):154–8.

Jensen AT, Curtis J, Montgomery J, Handman E, Theander TG. Molecular and immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of Leishmania donovani(1). Biochim Biophys Acta. 10 de setembro de 2001;1549(1):73–87.

Kabani M. Structural and functional diversity among eukaryotic Hsp70 nucleotide exchange factors. Protein Pept Lett.

2009;16(6):623-60.

Kabani M, Martineau CN. Multiple hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: mere redundancy or functional specificity? Curr Genomics. 2008;9(5):338–248.

Karnkowska A, Bennett MS, Watza D, Kim JI, Zakryś B, Triemer RE. Phylogenetic Relationships and Morphological Character Evolution of Photosynthetic Euglenids (Excavata) Inferred from Taxon-rich Analyses of Five Genes. J Eukaryot Microbiol. junho de 2015;62(3):362–73.

Keeling PJ, Palmer JD. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. Nat Rev Genet. agosto de 2008;9(8):605–18.

Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodilian trypanosome Trypanosoma grayi. Sci Data. 2014;1:140024.

Kent ML, Elston RA, Nerad TA, Sawyer TK. An Isonema-like flagellate (Protozoa: Mastigophora) infection in larval geoduck clams, Panope abrupta. J Invertebr Pathol. novembro de 1987;50(3):221–9.

Klein CC, Alves JMP, Serrano MG, Buck GA, Vasconcelos ATR, Sagot M-F, et al., Biosynthesis of vitamins and cofactors in bacterium-harbouring trypanosomatids depends on the symbiotic association as revealed by genomic analyses. PloS One. 2013;8(11):e79786.

Korený L, Lukes J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? Int J Parasitol. fevereiro de 2010;40(2):149–56.

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

Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochim Biophys Acta. novembro de 2008;1780(11):1236–48.

Krobitsch S, Clos J. A novel role for 100 kD heat shock proteins in the parasite Leishmania donovani. Cell Stress Chaperones. setembro de 1999;4(3):191–8.

Lara E, Moreira D, Vereshchaka A, López-García P. Pan-oceanic distribution of new highly diverse clades of deep-sea diplonemids. Environ Microbiol. janeiro de 2009;11(1):47–55.

Larreta R, Soto M, Alonso C, Requena JM. Leishmania infantum: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. Exp Parasitol. outubro de 2000;96(2):108–15.

Lee MG, Atkinson BL, Giannini SH, Van der Ploeg LH. Structure and expression of the hsp 70 gene family of Leishmania major. Nucleic Acids Res. 25 de outubro de 1988;16(20):9567–85.

Lee MG, Polvere RI, Van der Ploeg LH. Evidence for segmental gene conversion between a cognate hsp 70 gene and the temperature-sensitively transcribed hsp70 genes of Trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasitol. junho de 1990;41(2):213–20

Leonard G, Soanes DM, Stevens JR. Resolving the question of trypanosome monophyly: a comparative genomics approach using whole genome data sets with low taxon sampling. Infect Genet Evol. julho de 2011;11(5):955–9.

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

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

Lima L, Ortiz PA, da Silva FM, Alves JMP, Serrano MG, Cortez AP, et al., Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in Trypanosoma cruzi, T. cruzi-like and other trypanosome species. PloS One. 2012a;7(6):e38385.

Lima L, Silva FM da, Neves L, Attias M, Takata CSA, Campaner M, et al., 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. novembro de 2012b;163(6):856–72.

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22:631–77.

Linton EW, Hittner D, Lewandowski C, Auld T, Triemer RE. A molecular study of euglenoid phylogeny using small subunit rDNA. J Eukaryot Microbiol. abril de 1999;46(2):217–23.

Lira CBB, Giardini MA, Neto JLS, Conte FF, Cano MIN. Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions. Trends Parasitol. agosto de 2007;23(8):357–62.

López-García P, Philippe H, Gail F, Moreira D. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. Proc Natl Acad Sci U S A. 21 de janeiro de 2003;100(2):697–702.

Lukeš J, Kuchta R, Scholz T, Pomajbíková K. (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. Trends Parasitol. agosto de 2014;30(8):377–85.

Lun Z-R, Lai D-H, Li F-J, Lukes J, Ayala FJ. Trypanosoma brucei: two steps to spread out from Africa. Trends Parasitol. setembro de 2010;26(9):424–7.

Lv Z, Wu Z, Zhang L, Ji P, Cai Y, Luo S, et al., Genome mining offers a new starting point for parasitology research. Parasitol Res. fevereiro de 2015;114(2):399–409.

Lynch M, Conery JS. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. Science. 10 de novembro de 2000;290(5494):1151–5.

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

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

Marche S, Roth C, Manohar SK, Dollet M, Baltz T. RNA virus-like particles in pathogenic plant trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. fevereiro de 1993;57(2):261–7.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al., A new genotype of Trypanosoma cruzi associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. maio de 2009;136(6):641–55.

Maresca B, Carratu L. The biology of the heat shock response in parasites. Parasitol Today. agosto de 1992;8(8):260–6.

Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ. Purine metabolism in Leishmania donovani and Leishmania braziliensis. Biochim Biophys Acta. 1 de dezembro de 1978;544(2):360–71.

Maslov DA, Lukes J, Jirku M, Simpson L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. Mol Biochem Parasitol. janeiro de 1996;75(2):197–205.

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

Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of Leptomonas and Blastocrithidia. J Eukaryot Microbiol. abril de 2001;48(2):161–9.

de Miguel N, Braun N, Bepperling A, Kriehuber T, Kastenmuller A, Buchner J, et al., Structural and functional diversity in the family of small heat shock proteins from the parasite Toxoplasma gondii. Biochim Biophys Acta. novembro de

2009;1793(11):1738-48.

Molyneux DH. Virus-like particles in Leishmania parasites. Nature. 7 de junho de 1974;249(457):588-9.

Molyneux DH. Trypanosomes of bats. Parasit Protozoa. Lodon: Academic Press; 1991. p. 195–223.

Montalvo-Alvarez AM, Folgueira C, Carrion J, Monzote-Fidalgo L, Canavate C, Requena JM. The Leishmania HSP20 is antigenic during natural infections, but, as DNA vaccine, it does not protect BALB/c mice against experimental L. amazonensis infection. J Biomed Biotechnol. 2008;2008:695432.

Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos-Cuentas A, García AL, et al., [Detection of Leishmania spp. based on the gene encoding HSP20]. Rev Peru Med Exp Salud Pública. dezembro de 2014;31(4):635–43.

Moreira D, von der Heyden S, Bass D, López-García P, Chao E, Cavalier-Smith T. Global eukaryote phylogeny: Combined small- and large-subunit ribosomal DNA trees support monophyly of Rhizaria, Retaria and Excavata. Mol Phylogenet Evol. julho de 2007;44(1):255–66.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F. New insights into the phylogenetic position of diplonemids: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. Int J Syst Evol Microbiol. novembro de 2001;51(Pt 6):2211–9.

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. Int J Syst Evol Microbiol. setembro de 2004;54(Pt 5):1861–75.

Morrison LJ, MacLeod A. African trypanosomiasis. Parasite Immunol. agosto de 2011;33(8):421–2.

Motta MCM, de Souza W, Thiry M. Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS Microbiol Lett. 11 de abril de 2003;221(1):17–23.

Mottram JC, Murphy WJ, Agabian N. A transcriptional analysis of the Trypanosoma brucei hsp83 gene cluster. Mol Biochem Parasitol. novembro de 1989;37(1):115–27.

Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, et al., Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 16 de março de 1999;96(6):2902–6.

Naderer T, McConville MJ. Intracellular growth and pathogenesis of Leishmania parasites. Essays Biochem. 24 de outubro de 2011;51:81–95.

Nakayima J, Nakao R, Alhassan A, Hayashida K, Namangala B, Mahama C, et al. Genetic diversity among Trypanosoma (Duttonella) vivax strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. Parasite Paris Fr. 2013;20:24.

Nisbet B. Nutrition and feeding strategies in protozoa. London: Croom Helm; 1984.

Oliveira P, Lima FM, Cruz MC, Ferreira RC, Sanchez-Flores A, Cordero EM, et al., Trypanosoma cruzi: Genome characterization of phosphatidylinositol kinase gene family (PIK and PIK-related) and identification of a novel PIK gene. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. julho de 2014;25:157–65.

Opperdoes FR, Michels PAM. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. Trends Parasitol. outubro de 2007;23(10):470–6.

Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EMF, et al., Genes of cathepsin L-like proteases in Trypanosoma rangeli isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. Acta Trop. dezembro de 2009;112(3):249–59.

Ouellette M, Drummelsmith J, El-Fadili A, Kündig C, Richard D, Roy G. Pterin transport and metabolism in Leishmania and related trypanosomatid parasites. Int J Parasitol. abril de 2002;32(4):385–98.

Paba J, Santana JM, Teixeira ARL, Fontes W, Sousa MV, Ricart CAO. Proteomic analysis of the human pathogen Trypanosoma cruzi. Proteomics. abril de 2004;4(4):1052–9.

Paparini A, Macgregor J, Irwin PJ, Warren K, Ryan UM. Novel genotypes of Trypanosoma binneyi from wild platypuses

(Ornithorhynchus anatinus) and identification of a leech as a potential vector. Exp Parasitol. outubro de 2014;145:42–50.

Pérez-Morales D, Espinoza B. The role of small heat shock proteins in parasites. Cell Stress Chaperones. setembro de 2015;20(5):767–80.

Perez-Morales D, Ostoa-Saloma P, Espinoza B. Trypanosoma cruzi SHSP16: Characterization of an alpha-crystallin small heat shock protein. Exp Parasitol. outubro de 2009;123(2):182–9.

Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp Biol Med Maywood NJ. fevereiro de 2003;228(2):111–33.

Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). Int J Syst Evol Microbiol. maio de 2001;51(Pt 3):751–8.

Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PloS One. 2010;5(3):e9490.

Pusnik M, Charrière F, Mäser P, Waller RF, Dagley MJ, Lithgow T, et al., The single mitochondrial porin of Trypanosoma brucei is the main metabolite transporter in the outer mitochondrial membrane. Mol Biol Evol. março de 2009;26(3):671–80.

Raina P, Kaur S. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in Leishmania donovani. Mol Cell Biochem [Internet]. 31 de julho de 2011; Recuperado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805355

Reina-San-Martín B, Degrave W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al., A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. Nat Med. agosto de 2000;6(8):890–7.

Requena JM, Lopez MC, Jimenez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in Trypanosoma cruzi. Nucleic Acids Res. 25 de fevereiro de 1988;16(4):1393–406.

Richter K, Buchner J. Hsp90: chaperoning signal transduction. J Cell Physiol. setembro de 2001;188(3):281–90.

Rodrigues AC, Garcia HA, Ortiz PA, Cortez AP, Martinkovic F, Paiva F, et al., Cysteine proteases of Trypanosoma (Megatrypanum) theileri: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. Parasitol Int. setembro de 2010;59(3):318–25.

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 seguences. Parasitology. fevereiro de 2006;132(Pt 2):215–24.

Rodrigues CMF, Batista JS, Lima JM, Freitas FJC, Barros IO, Garcia HA, et al. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of Trypanosoma vivax in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. Parasit Vectors. 2015;8:564.

Rudenko G. Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. Essays Biochem. 20 de setembro de 2010;48(1):201–19.

Ruszczyk A, Forlenza M, Savelkoul HFJ, Wiegertjes GF. Molecular cloning and functional characterisation of a cathepsin L-like proteinase from the fish kinetoplastid parasite Trypanosoma carassii. Fish Shellfish Immunol. fevereiro de 2008;24(2):205–14.

Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol. março de 2002;120(1):1–21.

Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J. Leishmania major: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. Exp Parasitol. janeiro de 1997;85(1):63–76.

Schell D, Borowy NK, Overath P. Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of Trypanosoma brucei. Parasitol Res. 1991;77(7):558–60.

Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD. Characterization of Two Species of

Trypanosomatidae from the Honey Bee Apis mellifera: Crithidia mellificae Langridge and McGhee, and Lotmaria passim n. gen., n. sp. J Eukaryot Microbiol. outubro de 2015;62(5):567–83.

Shapira M, Pedraza G. Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of Leishmania mexicana amazonensis. Mol Biochem Parasitol. outubro de 1990;42(2):247–55.

Sharma D, Masison DC. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. Protein Pept Lett. 2009;16(6):571–81.

Shorter J, Lindquist S. Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. EMBO J. 22 de outubro de 2008;27(20):2712–24.

Silva DCF, Silva RC, Ferreira RC, Briones MRS. Examining marginal sequence similarities between bacterial type III secretion system components and Trypanosoma cruzi surface proteins: horizontal gene transfer or convergent evolution? Front Genet. 2013;4:143.

Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. Mol Biol Evol. dezembro de 2002;19(12):2071–83.

Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. Mol Phylogenet Evol. janeiro de 2004;30(1):201–12.

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

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

Stadtman TC, Elliott P. Studies on the enzymic reduction of amino acids. II. Purification and properties of D-proline reductase and a proline racemase from Clostridium sticklandii. J Biol Chem. outubro de 1957;228(2):983–97.

Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinforma Oxf Engl. 1 de maio de 2014;30(9):1312–3.

Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. Parasite Paris Fr. setembro de 2008;15(3):226–32.

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

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi. Parasitology. janeiro de 1999;118 (Pt 1):107–16.

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

Steverding D. The transferrin receptor of Trypanosoma brucei. Parasitol Int. janeiro de 2000;48(3):191–8.

Steverding D. The significance of transferrin receptor variation in Trypanosoma brucei. Trends Parasitol. março de 2003;19(3):125–7.

Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, Thompson CE, et al., Genome of the avirulent human-infective trypanosome--Trypanosoma rangeli. PLoS Negl Trop Dis. setembro de 2014;8(9):e3176.

Stöver BC, Müller KF. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC Bioinformatics. 2010;11:7.

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

Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of Cryptosporidium parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. Appl Env Microbiol. junho de 2000;66(6):2385–91.

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). Int J Syst Evol Microbiol. fevereiro de 2007;57(Pt 2):423–32.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, et al., Phylogenetic validation of the genera Angomonas and Strigomonas of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. Protist. julho de 2011;162(3):503–24.

Teixeira MMG. Trypanosomatidae diversidade, filogênia e taxonomia. 2010.

Thompson MD, Zhang L, Hong L, Hallick RB. Two new group-II twintrons in the Euglena gracilis chloroplast are absent in basally branching Euglena species. Curr Genet. janeiro de 1997;31(1):89–95.

Thompson RJ, Bouwer HG, Portnoy DA, Frankel FR. Pathogenicity and immunogenicity of a Listeria monocytogenes strain that requires D-alanine for growth. Infect Immun. agosto de 1998;66(8):3552–61.

Tibbetts RS, Jensen JL, Olson CL, Wang FD, Engman DM. The DnaJ family of protein chaperones in Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 15 de março de 1998;91(2):319–26.

Tibbetts RS, Kim IY, Olson CL, Barthel LM, Sullivan MA, Winquist AG, et al., Molecular cloning and characterization of the 78-kilodalton glucose-regulated protein of Trypanosoma cruzi. Infect Immun. junho de 1994;62(6):2499–507.

Truc P, Büscher P, Cuny G, Gonzatti MI, Jannin J, Joshi P, et al., Atypical human infections by animal trypanosomes. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(9):e2256.

Truc P, Nzoumbou-Boko R, Desquesnes M, Semballa S, Vincendeau P. [Atypical human trypanosomoses]. Médecine Santé Trop. setembro de 2014;24(3):249–52.

Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al., The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature. 4 de abril de 2013;496(7443):57–63.

Turmel M, Gagnon M-C, O'Kelly CJ, Otis C, Lemieux C. The chloroplast genomes of the green algae Pyramimonas, Monomastix, and Pycnococcus shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. Mol Biol Evol. março de 2009;26(3):631–48.

Tutar L, Tutar Y. Heat shock proteins; an overview. Curr Pharm Biotechnol. fevereiro de 2010;11(2):216–22.

Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RHY, Aerts A, et al., Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. Science. 1 de setembro de 2006;313(5791):1261–6.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Int J Parasitol. dezembro de 1994;24(8):1317–31

Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, et al., Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: Trypanosoma serpentis n. sp. from Pseudoboa nigra and Trypanosoma cascavelli from Crotalus durissus terrificus. J Eukaryot Microbiol. novembro de 2009;56(6):594–602.

Visser WF, Verhoeven-Duif NM, de Koning TJ. Identification of a human trans-3-hydroxy-L-proline dehydratase, the first characterized member of a novel family of proline racemase-like enzymes. J Biol Chem. 22 de junho de 2012;287(26):21654–62.

Votýpka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-leremenko A, Tesařová M, Grybchuk D, et al., Kentomonas gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. Protist. dezembro de 2014;165(6):825–38.

Votýpka J, Oborník M, Volf P, Svobodová M, Lukes J. Trypanosoma avium of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. Parasitology. setembro de 2002;125(Pt 3):253–63.

Votýpka J, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, Lukeš J, et al., Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea:

Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus Blechomonas gen. n. Protist. novembro de 2013;164(6):763–81.

Walsh P, Bursać D, Law YC, Cyr D, Lithgow T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. EMBO Rep. junho de 2004;5(6):567–71.

Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. Nat Rev Cancer. outubro de 2005;5(10):761–72.

Wiesgigl M, Clos J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani. Mol Biol Cell. novembro de 2001;12(11):3307–16.

Wijayawardena BK, Minchella DJ, DeWoody JA. Hosts, parasites, and horizontal gene transfer. Trends Parasitol. julho de 2013;29(7):329–38.

Witola WH, Sarataphan N, Inoue N, Ohashi K, Onuma M. Genetic variability in ESAG6 genes among Trypanosoma evansi isolates and in comparison to other Trypanozoon members. Acta Trop. janeiro de 2005;93(1):63–73.

Xu P, Widmer G, Wang Y, Ozaki LS, Alves JM, Serrano MG, et al., The genome of Cryptosporidium hominis. Nature. 28 de outubro de 2004;431(7012):1107–12.

Yamasaki M, Tajima M, Lee KW, Jeong JR, Yamato O, Maede Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of Babesia gibsoni heat shock protein 70. Vet Parasitol. 11 de dezembro de 2002;110(1-2):123–9.

Yoshimura T, Esak N. Amino acid racemases: functions and mechanisms. J Biosci Bioeng. 2003;96(2):103-9.

Young R, Taylor JE, Kurioka A, Becker M, Louis EJ, Rudenko G. Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from Trypanosoma brucei gambiense, T. b. brucei and T. equiperdum. BMC Genomics. 2008;9:385.

Yubuki N, Edgcomb VP, Bernhard JM, Leander BS. Ultrastructure and molecular phylogeny of Calkinsia aureus: cellular identity of a novel clade of deep-sea euglenozoans with epibiotic bacteria. BMC Microbiol. 2009;9:16.

Zhang J. Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol Evol. 1 de junho de 2003;18(6):292–8.

Zylicz M, Wawrzynow A. Insights into the function of Hsp70 chaperones. IUBMB Life. maio de 2001;51(5):283-7.