

**Luciana Lima**

**Diversidade morfológica, biológica e genética, e  
relações filogenéticas de tripanossomas de  
morcegos do Brasil e Moçambique (África)**

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

**Área de concentração: Biologia  
da Relação Patógeno-Hospedeiro**

**Orientadora: Profa. Dra. Marta  
Maria Geraldine Teixeira**

**Versão Original**

**São Paulo**

**2011**

## RESUMO

Lima L. Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África). Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Apesar de conhecido, há mais de 100 anos, que os morcegos albergam uma grande variedade de tripanossomas dos subgêneros *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* e *Herpetosoma*, nosso conhecimento sobre a diversidade genética, variedade de hospedeiros e de vetores, ciclos de vida, distribuição e relações filogenéticas é restrito a poucas espécies de *Schizotrypanum*. A maioria dos tripanossomas de morcegos foi classificada exclusivamente com base em morfologia. A comparação de padrões eco-geográficos de tripanossomas e de morcegos permite avaliar possíveis cenários que expliquem a diversidade, relações filogenéticas e distribuição atual dos tripanossomas de morcegos.

Nessa tese, a diversidade genética e padrões filogeográficos de tripanossomas de morcegos brasileiros foi avaliada pelo exame de 1.043 morcegos, de 63 espécies pertencentes a 7 famílias, da Amazônia, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica. A prevalência de morcegos infectados por tripanossomas foi de 12,9% por hemocultura, resultando em 77 culturas. A maioria das culturas foi morfológica- e molecularmente identificada como *Schizotrypanum* spp. As análises filogenéticas dos genes SSUrRNA, gGAPDH e Cytb revelaram três clados, *T. dionisii*, *T. c. marinkellei* e *T. cruzi*, que juntos formam o clado *Schizotrypanum*. *T. dionisii* (32,4%) foi encontrado em morcegos pertencentes a 4 famílias, em todos os biomas; *T. c. marinkellei* (49,3%) apenas em filostomídeos da Amazônia e Pantanal. *T. cruzi* (18,2%) principalmente em morcegos vespertilionídeos e filostomídeos do Pantanal/Cerrado e da Mata Atlântica, com poucos isolados da Amazônia. Os clados de tripanossomas de morcegos foram relacionados com os vetores, história evolutiva, ecologia e filogeografia dos morcegos.

*T. cruzi* é um complexo de isolados geneticamente heterogêneo distribuídos em seis DTUs (Tcl-VI), mais relacionadas com *T. c. marinkellei* do que com *T. dionisii*. Todos os isolados de morcegos da Amazônia foram genotipados como Tcl, enquanto os das regiões Central e Sudeste revelaram um novo genótipo, que denominamos Tcbat, que não é virulento para camundongos. Tcbat foi encontrado em ambientes antrópicos, confirmando que morcegos são importantes como reservatórios e fontes de *T. cruzi* para o homem. A descoberta desse novo genótipo indica que a complexidade de *T. cruzi* é maior do que conhecemos.

Apenas *Schizotrypanum* spp. de morcegos da América do Sul e da Europa foram analisados molecularmente, espécies descritas em morcegos africanos necessitam de evidências filogenéticas. Caracterizamos 6 isolados de uma nova espécie de *T. cruzi*-like parasita de morcegos (Molossidae) de Moçambique (África), com morfologia típica de *T.*

*cruzi*-like. Esses isolados formaram um clado homogêneo no sugênero *Schizotrypanum* em inferências com SSUrRNA, gGAPDH, ITS1rDNA e SL, mais relacionado com *T. c. marinkellei* do que com *T. dionisii*, e separado por maiores distâncias de *T. cruzi*. Análises com todos esses genes mostraram que esses isolados constituem uma nova espécie, *T. erneyi*, a primeira espécie de *Schizotrypanum* de morcegos africanos molecularmente caracterizada. Os tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* e os morcegos estão intimamente unidos, sendo um exemplo impressionante de relação parasita-hospedeiro e longa história evolutiva compartilhada. A existência de *T. erneyi* na África lança nova luz sobre a diversidade, dispersão e evolução de *Schizotrypanum*, fornecendo novas pistas sobre a origem de *T. cruzi*, que pode ter divergido de um tripanossoma exclusivo de morcego ou vice-versa.

*T. rangeli* é um parasita não patogênico do homem, animais domésticos e silvestres nas Américas Central e do Sul. Essa espécie compartilha vetores, hospedeiros e distribuição com *T. cruzi*, porém, nunca foi comprovada em morcegos. Estudos prévios demonstraram que *T. rangeli* é composto por 4 linhagens filogenéticas (A-D). Nessa tese, caracterizamos dois isolados em morcegos brasileiros, um da linhagem A e outro de uma nova linhagem (E). Estes são os primeiros isolados de *T. rangeli* de morcegos molecularmente caracterizados.

Dentre os isolados de morcegos de Moçambique, caracterizamos morfológica-, biológica- e filogeneticamente 12 isolados de rhinolphides, com tripomastigotas sanguíneos típicos do subgênero. Entretanto, filogenias baseadas em SSUrRNA e gGAPDH posicionaram esses isolados distantes de todos os demais tripanossomas, permitindo a descrição de uma nova espécie (*T. zambesiensis*) que não foi posicionada em nenhum subgênero, corroborando a polifilia de *Megatrypanum*, que tem sido revisto e revalidado filogeneticamente.

A enzima CATL tem um papel fundamental na invasão celular, diferenciação, imunidade e patogenicidade dos tripanossomas, sendo explorada como alvo para drogas e vacinas. A análise de genes CATL de 17 isolados de *T. rangeli*, representativos da diversidade genética e distribuição geográfica, comprovaram as linhagens previamente definidas por outros genes, corroborando ciclos de transmissão independentes associados com espécies simpátricas de *Rhodnius*. Esse gene se mostrou excelente para diagnóstico e genotipagem de *T. rangeli*. Análises de repertório e genealogia dos genes codificadores dessas enzimas podem ajudar a esclarecer o papel delas nos ciclos de vida e na patologia. Em um estudo bastante abrangente, comparamos genes codificadores de cruzipaína (CATL de *T. cruzi*) de isolados *T. cruzi* representantes da diversidade biológica, genética e patológica. Esses genes são conservados intra- e inter-isolados da mesma DTU, exceto nas DTUs TcV e VI que apresentam sequências polimórficas, concordante com origem por

hibridização entre TcII e TcIII. Comparando os genes de cruzipaína e homólogos de *T. cruzi*-like e *T. rangeli*, detectamos polimorfismos espécie e linhagem-específicos. As genealogias inferidas corroboraram as relações filogenéticas entre as diferentes espécies de tripanossomas.

Novas análises, com mais isolados e diversos genes, são ainda necessárias para se obter filogenias bem resolvidas, que são importantes para inferir as hipóteses prováveis da história evolutiva dos tripanossomas de morcegos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma*, Morcegos, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum*, Filogenia, Taxonomia

## ABSTRACT

Lima L. Morphological, biological and genetic diversity, and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from Brazil and Mozambique (Africa). Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Although it has been known for more than 100 years that bats harbour a variety of trypanosomes from the subgenera *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* and *Herpetosoma*, our knowledge regarding the genetic diversity, host range, vectors, life cycles, geographical distribution and phylogenetic relationships of these trypanosomes is restricted to a few species. Because the majority of bat trypanosomes were classified exclusively based on morphology, their taxonomy remains problematic and have been phylogenetically revised. Comparison of eco-geographical patterns of trypanosomes and bats can be helpful in evaluating scenarios that could account for the diversity, relationships and current distribution of bat trypanosomes.

In this study, the genetic diversity and phylogeographical patterns of trypanosomes that infect Brazilian bats were evaluated by examining 1043 bats from 63 species of 7 families captured in Amazonia, the Pantanal, Cerrado and the Atlantic Forest. The prevalence of trypanosome-infected bats as estimated by haemoculture was 12.9%, resulting in 77 cultures. Most cultures were morphologically and molecularly identified as *Schizotrypanum* spp. Phylogenetic analyses of SSUrRNA, gGAPDH and Cyt b genes revealed three subclades, *T. dionisii*, *T. c. marinkellei* and *T. cruzi*, all clustering together forming the clade *Schizotrypanum*. *T. dionisii* (32.4%) infected bats from 4 families captured in all biomes; *T. c. marinkellei* (49.3%) was restricted to phyllostomids from Amazonia to the Pantanal. *T. cruzi* (18.2%) was found mainly in vespertilionids and phyllostomids from the Pantanal/Cerrado and the Atlantic Forest, with a few isolates from Amazonia. Therefore, bat trypanosomes were related to their vectors, and the evolutionary history, ecology and phylogeography of the hosts.

*T. cruzi* is a complex of genetically heterogeneous isolates distributed in six discrete typing units (DTUs TcI-VI), more phylogenetically related to *T. c. marinkellei* than to *T. dionisii*. Phylogenetic relationships positioned all Amazonian bat isolates into TcI while isolates from Central and Southeast regions constituted the new genotype Tcbat, which lacked virulence and yielded low parasitaemias in mice. Tcbat was found only in bats from anthropic environments, confirming bats as important reservoirs and potential source of *T. cruzi* infections to humans. Our findings corroborated that the complexity of *T. cruzi* is larger than currently known.

Only bat *Schizotrypanum* spp. from South America and Europe have been characterised, alleged species from Australia and Africa still lack phylogenetic evidence. We

characterized 6 isolates from bats (Molossidae) captured in Mozambique. Morphological and behaviour features were all typical of *T. cruzi*-like. All the isolates constituted a homogenous clade within the *Schizotrypanum* by phylogenetic analysis of SSUrRNA, gGAPDH, ITS1 rDNA and SL sequences. Comparable distances separated this new species from their closest species, *T. c. marinkellei* and *T. dionisii*, while *T. cruzi* was separated by larger distances. These findings supported these trypanosomes as a new species, *T. erneyi*, the first molecularly characterised from African bats. *Schizotrypanum* trypanosomes and bats are tightly united in a striking example of an ancient and intimate host-parasite partnership. The existence of *T. erneyi* in Africa sheds new light on the diversity and evolutionary history of *Schizotrypanum*, providing new insights into the understanding of the origin and evolution of *T. cruzi*, which speculatively could have evolved from a bat-restricted trypanosome or vice versa

*T. rangeli* is a non-pathogenic parasite of man and domestic and wild animals in Central and South America transmitted by triatomines, which share hosts and overlapped distribution with *T. cruzi*. This species has never confidently been described in bats. Previous analyses demonstrated that *T. rangeli* comprised 4 phylogenetic lineages (A-D). Here, we characterized two isolates of *T. rangeli* from Brazilian bats, one assigned to lineage A and other to the new lineage E. These isolates are the earliest *T. rangeli* from bats molecularly characterized, and the reference-isolates of the lineage E.

We also characterized morphologically, biologically and phylogenetically 12 isolates from African rhinolophid microbats from Mozambique. The isolates showed blood trypomastigotes typical of the subgenus *Megatrypanum*, which have been questioned phylogenetically. However, culture and biological features separated the new bat isolates from *Schizotrypanum*, and SSUrRNA and gGAPDH phylogenies revealed that they are distant from all trypanosomes, prompting the description of a new species that could not be positioned within any subgenus.

Cathepsin L-like (CATL) enzymes are cysteine proteases that play a vital role in the metabolism, infectivity, cell differentiation, immunity and pathogenicity of trypanosomes, and have been exploited as potential targets for drugs, vaccines and diagnoses. An understanding of CATL evolutionary relationships can assist in clarifying the role of these enzymes in the parasite life cycles and pathogenesises. Phylogenetic analysis of CATL sequences from 17 isolates representative of the genetic diversity and geographical range of *T. rangeli* supported the lineages previously established, corroborating independent cycles and divergence associated with sympatric species of *Rhodnius*. In addition, CATL proved to be excellent targets for diagnosis and genotyping of *T. rangeli*. We also compared cruzipain (major CATL from *T. cruzi*) encoding genes from *T. cruzi* isolates representative of the overall biological, genetic and pathological diversity. Conserved genes are found within and

among isolates of the same DTU, excepting TcV-VI that showed polymorphic sequences supporting hybridization origin. Analyses of cruzipain from *T. cruzi* DTUs and homologues from *T. cruzi*-like disclosed species- and lineage-specific polymorphisms valuable to understand host-parasite interactions and crucial for evaluation of cruzipain as target for diagnostic, drugs and vaccine approaches. Genealogies of cruzipain encoding genes agree with the diversity and phylogenetic relationships of trypanosome species and *T. cruzi* DTUs.

Further analyses aiming better-resolved phylogenies and reliable molecular-clock model to estimate divergence times are required to infer the most likely hypothesis for the evolutionary history of bat trypanosomes.

**Keywords:** *Trypanosoma*, **Bats**, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum*, **Phylogeny**, **Taxonomy**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O gênero *Trypanosoma*: história evolutiva

O gênero *Trypanosoma* pertence à Família Trypanosomatidae que compreende protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, atualmente classe Kinetoplastea. Os cinetoplastídeos juntamente com os euglenóides e os diplomonídeos formam o filo Euglenozoa. Análises filogenéticas abrangentes do filo Euglenozoa apóiam a hipótese de que os cinetoplastídeos são mais relacionados com os diplomonídeos, e que os tripanossomatídeos formam um grupo monofilético que evoluiu de bodonídeos de vida livre (Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Hughes e Piontkivska, 2003; Simpson et al., 2006; Roger e Simpson, 2009). A monofilia do filo Euglenozoa está bem estabelecida, porém, as análises filogenéticas ainda têm sido insuficientes para resolver a filogenia do filo, assim como sua relação com os demais filios de protozoários (Keeling et al., 2005; Moreira et al., 2007; Yoon et al., 2008; Hampl et al., 2009; Roger e Simpson, 2009).

A classe Kinetoplastea, que tradicionalmente compreende as subordens Trypanosomatina e Bodonina, se caracteriza pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria constituída por moléculas de DNA circulares concatenadas (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). Um sistema de classificação recente propôs a separação da classe Kinetoplastea em duas subordens: Prokinetoplastina, que contém ectoparasitas de peixes e endossimbiontes de protozoários amebóides e Metakinetoplastina que consiste em 4 grupos principais, três cladros de bodonídeos (Neobodonida, Parabodonida e Eubodonida) e o clado dos tripanossomatídeos (Trypanosomatida) (Moreira et al., 2004). Os tripanossomatídeos formam um grupo monofilético que corresponde à família Trypanosomatidae. Esses organismos são parasitas obrigatórios de invertebrados, plantas e de, virtualmente, todas as ordens de vertebrados (Vickerman, 1976; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008).

A família Trypanosomatidae apresenta uma grande diversidade de hospedeiros, desde plantas a animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens, com ampla distribuição nos diferentes continentes. Essa família compreende parasitas monoxênicos, que apresentam apenas um hospedeiro vertebrado, ou heteroxênicos, quando participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros, sendo um invertebrado e um vertebrado (Wallace, 1966, 1979; Vickerman, 1994; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008).

De acordo com parâmetros morfológicos, hospedeiro de origem e ciclo de vida, os tripanossomatídeos estão atualmente distribuídos em 12 gêneros. Oito gêneros compreendem protozoários monoxênicos de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Angomonas*). Quatro



gêneros albergam espécies heteroxênicas em cujos ciclos há uma alternância entre hospedeiros invertebrados (artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre insetos fitófagos e plantas (*Phytomonas*) (Wallace, 1966, 1979; Wallace et al., 1983; Hoare, 1972; Vickerman, 1976; Camargo, 1998; Merzlyak et al., 2001; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011).

Hipóteses fundamentadas em reconstruções filogenéticas tentam explicar a origem dos tripanossomatídeos e dos ciclos heteroxênicos de *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*. Esses estudos propõem diferentes histórias evolutivas, dependendo dos táxons e grupos externos utilizados, dos genes e dos métodos de inferências filogenéticas. As espécies de *Trypanosoma* do clado aquático, parasitas de peixes e anuros, não foram os primeiros tripanossomatídeos a divergir dos ancestrais de vida livre, contrariando a hipótese de que o ancestral teria sido um parasita de peixe transmitido por sanguessugas e relacionado com bodonídeos parasitas de peixes, como *Cryptobia* ou *Trypanoplasma* (Hamilton et al., 2004, 2007; Simpson et al., 2006).

Análises filogenéticas recentes de um grande número de espécies dos diferentes grupos de tripanossomatídeos têm gerado filogenias bem resolvidas que permitiram levantar a seguinte hipótese: Um bodonídeo de vida livre pode ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao habitat intestinal originando os tripanossomatídeos monoxênicos. Com a aquisição da hematofagia, insetos passaram a inocular esses parasitas em vertebrados e alguns se adaptaram ao parasitismo passando, então, a circular entre insetos hematófagos e vertebrados terrestres. Essa hipótese sugere que as espécies heteroxênicas se originaram das monoxênicas, mais relacionadas com os bodonídeos (Stevens et al., 2001; Lukes et al., 2002; Hamilton et al., 2004, 2007; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008).

Insetos hematófagos existentes há milhões de anos, como as moscas tsétsé e os flebotomíneos, podem ter participado desse processo dando origem, respectivamente, aos tripanossomas dos clados *T. brucei* e aos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* (Stevens et al., 1999a, 2001; Poinar e Poinar 2004, 2008). A hipótese mais recente sugere que o gênero *Trypanosoma* evoluiu de um tripanossomatídeo (provavelmente ancestral de *Blastocrithidia triatomiae*) parasita de hemípteros (Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2004, 2007; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). Essas hipóteses poderão ser reforçadas, ou novas hipóteses poderão surgir, com a inclusão de novas espécies nos estudos filogenéticos assim como com análises combinadas de diversos genes e análises filogenômicas de tripanossomatídeos e outros membros do filo Euglenozoa.

## 1.2 Filogenia e taxonomia do gênero *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* infectam diversas espécies de vertebrados de todas as classes, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Apenas *T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*, na África, e *T. cruzi* e *T. rangeli*, nas Américas Central e do Sul, infectam o homem e são considerados patogênicos, com exceção de *T. rangeli*. Estes tripanossomas não estão restritos a infecções humanas e se mantêm na natureza no ciclo silvestre, infectando diversas ordens de mamíferos (antropozoonoses). A maioria das espécies de tripanossomas circula apenas no ciclo silvestre (zoonoses) e não é patogênica para seus hospedeiros (Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2007).

Durante os ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados hematófagos, os tripanossomas apresentam várias formas presentes em diferentes combinações no sangue e/ou tecidos dos hospedeiros. As formas tripomastigotas são encontradas nos hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneos) e invertebrados (tripomastigotas metacíclicos). As demais formas são espécies-dependentes, ocorrendo nos vertebrados (amastigotas intracelulares) e invertebrados (promastigotas e epimastigotas). Estas formas são definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante (Hoare, 1972; Wallace, 1979; Vickerman, 1994).

A maioria das espécies de tripanossomas se desenvolve ciclicamente nesses hospedeiros e é transmitida por artrópodes hematófagos incluindo moscas, hemípteros (triatomíneos e cimicídeos), mosquitos, pulgas e carrapatos. Algumas espécies são transmitidas por sanguessugas, entre elas os parasitas de peixes, anfíbios e répteis aquáticos. Sanguessugas terrestres também podem transmitir tripanossomas (Hoare, 1972; Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2005a, 2007).

A morfologia foi o primeiro parâmetro taxonômico dos tripanossomatídeos. Para as espécies heteroxênicas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, além da morfologia eram acrescentadas informações sobre ciclos biológicos e patogenia. O local de desenvolvimento e diferenciação das formas infectantes nos invertebrados determina a via de transmissão dos tripanossomas, que pode ser com as fezes (transmissão contaminativa) ou com saliva (transmissão inoculativa). De acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor, as espécies parasitas de mamíferos do gênero *Trypanosoma* foram divididas nas Secções Salivaria e Stercoraria (Hoare, 1964, 1972) (Figura 1).

Gênero Trypanosoma	
Secção Stercoraria (transmissão contaminativa)	Secção Salivaria (transmissão inoculativa)
Subgêneros (espécie-referência)	Subgêneros (espécie-referência)
<i>Megatrypanum</i> ( <i>T. theileri</i> )	<i>Duttonella</i> ( <i>T. vivax</i> )
<i>Schizotrypanum</i> ( <i>T. cruzi</i> )	<i>Nannomonas</i> ( <i>T. congolense</i> )
<i>Herpetosoma</i> ( <i>T. lewisi</i> )	<i>Trypanozoon</i> ( <i>T. brucei</i> )
	<i>Pycnomonas</i> ( <i>T. suis</i> )

Figura 1. Diagrama de classificação das espécies de tripanossomas de mamíferos. (Hoare, 1972)

A Secção Salivaria compreende apenas tripanossomas de origem africana que se desenvolvem ciclicamente exclusivamente em moscas tsétsé (*Glossina*). Esse desenvolvimento pode ocorrer no tubo digestivo e glândulas salivares (*T. brucei*), apenas no tubo digestivo (*T. congolense*) ou no caso de *T. vivax* ser restrito à probóscide. *T. evansi* e *T. equiperdum* são apenas mecanicamente transmitidos, respectivamente, por insetos hematófagos ou pelo coito. Esta Secção compreende os subgêneros *Duttonella*, *Trypanozoon*, *Pycnomonas* e *Nannomonas*, que abrangem todos os tripanossomas africanos geralmente patogênicos para seus hospedeiros (Hoare, 1972; Stevens et al., 2001; Hamilton et al., 2007; Stevens, 2008). *T. vivax* (*Duttonella*), *T. evansi* e *T. equiperdum* (*Trypanozoon*) se adaptaram à transmissão mecânica e, por esta razão, são as únicas espécies deste grupo que ocorrem fora do continente Africano, inclusive na Ásia e nas Américas Central e do Sul (Hoare, 1972; Ventura et al., 2001; Cortez et al., 2006; Lai et al., 2008; Lun et al., 2010).

Na Secção Stercoraria, que compreende os subgêneros *Schizotrypanum* (espécie-tipo *T. cruzi*), *Herpetosoma* (*T. lewisi*) e *Megatrypanum* (*T. theileri*) (Hoare, 1972), estão classificadas as espécies que se desenvolvem exclusivamente no tubo digestivo do inseto vetor, sendo transmitidas pela contaminação com formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas com as fezes dos vetores. Os tripanossomas desta Secção apresentam ampla distribuição geográfica.

Para as descrições de espécies de tripanossomas, os parâmetros tradicionais são morfologia e morfometria. Hoare (1972), na última revisão taxonômica do gênero *Trypanosoma*, criou subgêneros, identificou inúmeras sinonímias e propôs parâmetros para a identificação de espécies parasitas de mamíferos com base na morfologia das formas do sangue. Porém, as formas encontradas no sangue de diversas espécies, geralmente, não apresentam características que permitam identificar espécies ou mesmo subgêneros de tripanossomas. Esses organismos apresentam grande pleomorfismo e formas diferentes podem corresponder a espécies diferentes ou a estágios de diferenciação de uma mesma

espécie. Além da morfologia, os vetores, a origem geográfica e o hospedeiro de origem são outros parâmetros taxonômicos utilizados. Esses parâmetros partem do pressuposto de que cada espécie de hospedeiro alberga uma só espécie, e que a separação geográfica originou espécies diferentes de tripanossomas. Porém, apesar de associações entre algumas espécies e seus hospedeiros vertebrados e vetores, são raras as espécies restritas a um só hospedeiro. A distribuição da maioria das espécies não é conhecida, ainda assim, espécies cosmopolitas, assim como espécies restritas às Américas ou à África são bem conhecidas. Portanto, esses parâmetros foram totalmente invalidados (Stevens et al., 1999a,b, 2001; Maia da Silva et al., 2004a, 2010; Rodrigues et al., 2006, 2008; Hamilton et al., 2004, 2007, 2009; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al., 2008, 2009).

A taxonomia molecular tem facilitado enormemente a análise da diversidade dos tripanosomatídeos. Atualmente, a adoção de parâmetros taxonômicos moleculares é obrigatória para os tripanosomatídeos em geral. Entretanto, ainda é difícil classificar os tripanosomatídeos em gêneros e espécies devido à falta de parâmetros confiáveis e de fácil utilização. Uma grande limitação tem sido a necessidade de aumentar o número de espécies e isolados analisados. O conhecimento abrangente da diversidade de espécies é uma condição indispensável para que sejam inferidas relações filogenéticas consistentes que, por sua vez, serão a base da nova taxonomia desses organismos. Um dos principais problemas nas revisões taxonômicas desses organismos tem sido a falta de critérios objetivos, estabelecidos com base em estudos filogenéticos e aceitos pelos pesquisadores da área.

Atualmente, análises filogenéticas são obrigatórias para o posicionamento taxonômico dos tripanosomatídeos. A criação de gêneros e descrição de uma nova espécie de tripanosomatídeo deve partir de uma hipótese gerada por análises filogenéticas. Os estudos filogenéticos vêm permitindo identificar novas espécies e sinonímias, e definir grupos que podem corresponder a novos gêneros (Stevens et al. 1999a,b, 2001; Maia da Silva et al. 2004a,b; Hamilton et al., 2004, 2005a,b, 2007, 2009; Rodrigues et al. 2006, 2008; Ferreira et al. 2007, 2008; Viola et al., 2008, 2009a,b; Teixeira et al., 2011).

As análises filogenéticas têm questionado a validade da maioria dos gêneros e subgêneros de tripanossomas definidos por parâmetros taxonômicos fenotípicos. Todos os estudos indicam gêneros e subgêneros artificiais, além de uma enorme sinonímia de espécies. Quase todos os gêneros são polifiléticos, exceto *Trypanosoma* (apesar de controvérsias recentes), *Leishmania* (apesar do relacionamento conflitante com *Endotrypanum*) e *Phytomonas* (Maslov et al. 1996; Hollar e Maslov 1997; Lukes et al. 1997; Stevens et al. 2001; Hamilton et al., 2004, 2005a, 2007; Simpson et al. 2006; Stevens, 2008).

Alguns estudos filogenéticos sugeriram que o gênero *Trypanosoma* era polifilético (Maslov et al., 1996; Hughes e Piontkivska, 2003; Piontkivska e Hughes 2005), porém, estudos posteriores com um número muito maior de taxa e novos “outgroups” demonstraram a monofilia desse gênero (Haag et al., 1998; Stevens et al., 1999a,b, 2001; Wright et al., 1999; Hamilton et al., 2004, 2007; Ferreira et al., 2007; Viola et al., 2009a,b). Recentemente, um estudo multigênico com mais de 50 genes corroborou, mais uma vez, com a monofilia dos tripanossomas (Leonard et al., 2011).

De acordo com as topologias das árvores filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH (Hamilton et al., 2004, 2007; Simpson et al., 2006) foram definidos diversos clados que têm se mantido estáveis em todas as análises. Até o momento, foram estabelecidos pelo menos 9 clados principais: 1) clado aquático com tripanossomas de peixes e anuros; 2) clado de tripanossomas de crocodilianos; 3) clado *T. theileri* associado com ruminantes; 4) clado de tripanossomas de lagartos e cobras; 5) clado *T. brucei*, tripanossomas de mamíferos de origem africana transmitidos por tsé-tsé; 6) clado de tripanossomas de aves; 7) clado *T. lewisi* de tripanossomas, principalmente, de roedores; 8) clado *T. rangeli*; 9) clado *Schizotrypanum* (*T. cruzi* e *T. cruzi*-like) (Stevens et al., 1999a,b, 2001; Rodrigues et al., 2006, 2008; Hamilton et al., 2004, 2005a,b, 2007, 2008; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al., 2008, 2009a,b) (Figura 2)

Apenas a ordem de divergência dos três clados principais, aquático, *T. brucei* e *T. cruzi/T. rangeli*, está bem estabelecida. Alguns desses clados compreendem subgêneros que estão sendo revalidados. Entretanto, diversos clados não correspondem a nenhum subgênero proposto, e diversas espécies não foram posicionadas em nenhum desses clados. Portanto, além da revisão das espécies, novos subgêneros deverão ser criados para acomodar a diversidade de tripanossomas que tem sido descoberta com os estudos filogenéticos de um grande número de tripanossomas de hospedeiros e regiões geográficas distintas. A maioria dos tripanossomas de mamíferos tem sido posicionada nas árvores filogenéticas junto com as espécies da Secção Stercoraria.

Nos últimos anos, diversas novas espécies, linhagens e genótipos de tripanossomas de mamíferos têm sido descritos em ruminantes (Adams et al., 2008, 2010; Rodrigues et al., 2006; Gibson et al., 2010), roedores (Sato et al., 2007; Jittapalapong et al., 2008; Maia da Silva et al., 2010; Guan et al., 2011) e marsupiais Australianos (McInnes et al., 2009, 2011; Averis et al., 2009). Desde a última revisão dos tripanossomas de mamíferos, apenas uma nova espécie de tripanossoma de morcego foi descrita, *T. desterrensis* em Santa Catarina, Brasil (Grisard et al., 2003). Entretanto, os morcegos são conhecidos há mais de 110 anos como hospedeiros de dezenas de espécies de tripanossomas classificadas em diversos subgêneros (Hoare, 1972; Molyneux, 1991).

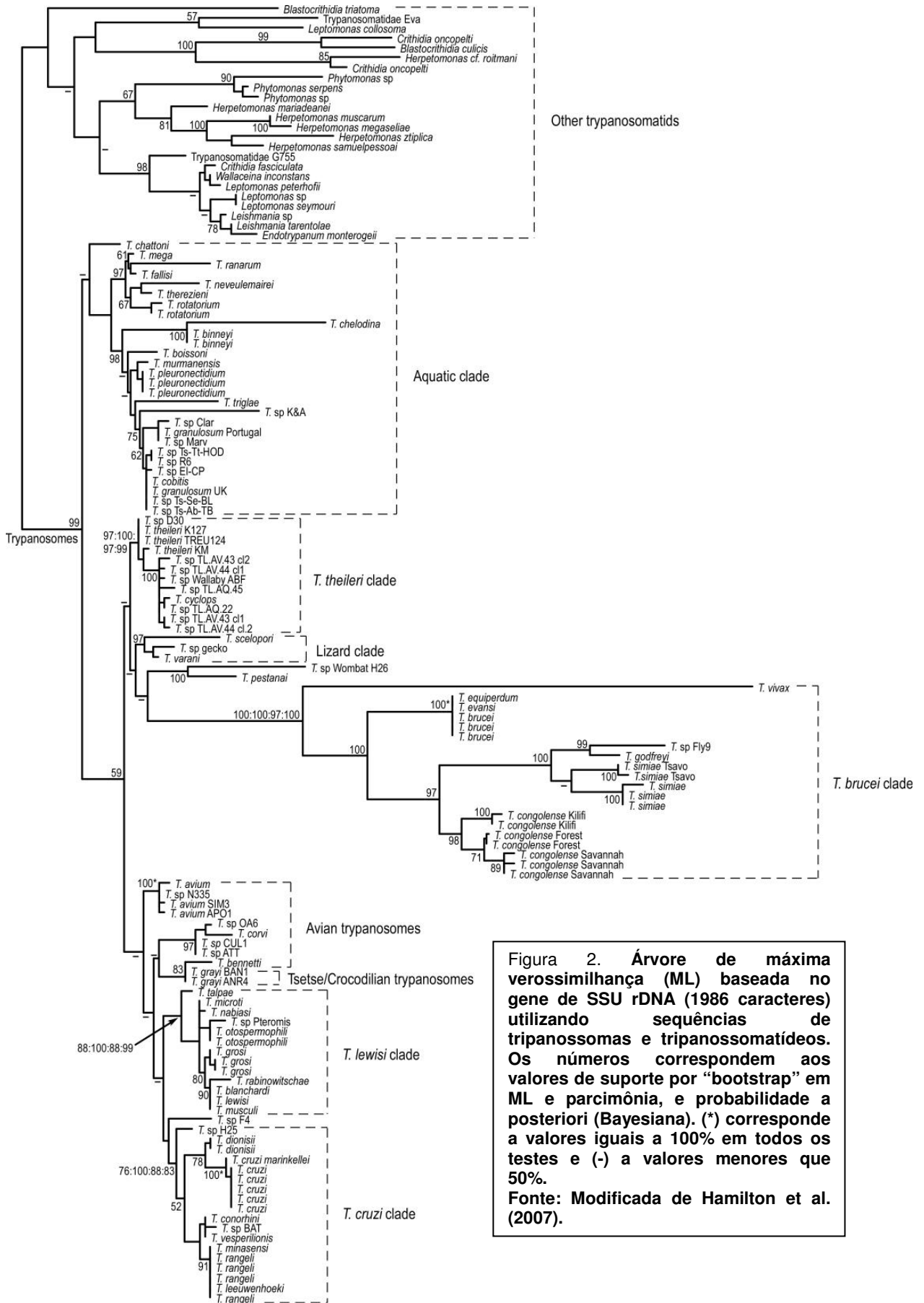


Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança (ML) baseada no gene de SSU rDNA (1986 caracteres) utilizando seqüências de tripanossomas e tripanosomatídeos. Os números correspondem aos valores de suporte por "bootstrap" em ML e parcimônia, e probabilidade a posteriori (Bayesiana). (\*) corresponde a valores iguais a 100% em todos os testes e (-) a valores menores que 50%.  
 Fonte: Modificada de Hamilton et al. (2007).

### 1.3 Tripanossomas de morcegos

Pouco se sabe sobre o desenvolvimento de tripanossomas nos morcegos e em seus vetores naturais. Morcegos de diferentes famílias, espécies e hábitos alimentares têm sido encontrados infectados na África, Europa, Ásia, Austrália e Américas por tripanossomas da Secção Stercoraria (subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*) e Salivaria (*Trypanozoon*). Uma espécie de tripanossoma pode infectar mais de uma espécie de morcego, assim como são comuns morcegos com infecções mistas com mais de uma espécie de tripanossoma. Embora a ocorrência de tripanossomas em morcegos seja muito frequente, a maioria das espécies descritas não foi cultivada e os relatos são baseados apenas em dados morfológicos e nos hospedeiros de origem. As infecções mais frequentes são causadas por espécies dos subgêneros *Megatrypanum* e *Schizotrypanum* e os quirópteros insetívoros são os mais frequentemente infectados (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991).

O número de tripanossomas isolados de morcegos caracterizados molecularmente é muito pequeno. Estudos filogenéticos sobre tripanossomas de morcegos são escassos e apenas *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, *T. sp bat* (isolado na África) e *T. cruzi marinkellei* foram incluídos em árvores filogenéticas. As espécies deste subgênero validadas em filogenias moleculares são: *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii*. Essas espécies formam um clado que corresponde ao subgênero *Schizotrypanum* (Stevens et al., 1999a, 2001; Hamilton et al., 2007). O posicionamento filogenético de *T. vespertilionis* sugere que esta espécie não pertence a este subgênero, ou que o isolado analisado foi classificado erroneamente (Stevens et al., 1999b, 2001). Os tripanossomas mais relacionados com *T. cruzi* formam um clado que compreende *T. rangeli*, *T. vespertilionis* (Europa), *T. conorhini* (Brasil) e os tripanossomas africanos *T. sp HochNdi1* (macaco), *T. sp NanDoum1* (carnívoro) e *T. sp bat* (morcego). Um tripanossoma isolado de canguru da Austrália (*T. sp H25*) foi posicionado como “outgroup” de todas essas espécies (Stevens et al., 1999b, 2001; Hamilton et al., 2007).

A ausência de parâmetros taxonômicos confiáveis, o pequeno número de espécies incluídas em estudos filogenéticos impede o conhecimento da diversidade e da história evolutiva dos tripanossomas em geral.

#### 1.3.1 Subgênero *Schizotrypanum*

O subgênero *Schizotrypanum* compreende tripanossomas que infectam o homem e outros mamíferos. Com exceção de *T. cruzi*, as demais espécies desse subgênero são restritas aos quirópteros. Enquanto *T. dionisii* e *T. vespertilionis* foram descritos no Novo e

no Velho Mundo, *T. cruzi* é restrito a América Latina e *T. c. marinkellei* ocorre apenas nas Américas Central e do Sul (Hoare, 1972; Molyneux, 1991). Outras espécies deste subgênero foram descritas na América do Norte (*T. hedricki* e *T. myoti*), América Central (*T. phyllostomae*) e Austrália (*T. pteropi* e *T. hipposideri*) (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976).

Os ciclos biológicos dos tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* são basicamente iguais, diferindo necessariamente nas espécies de hospedeiros mamíferos e vetores (Figura 3).

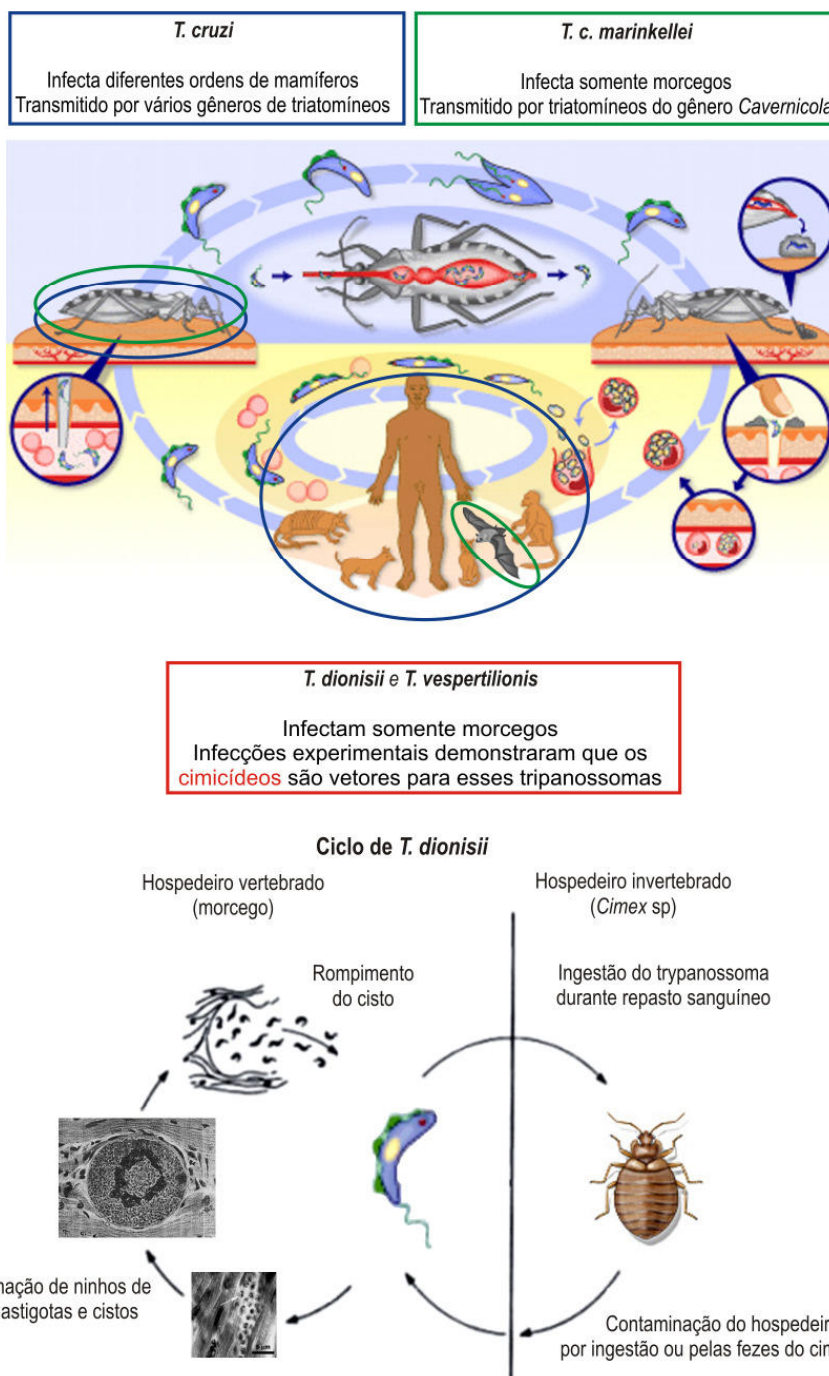


Figura 3. Representação do ciclo biológico de *T. cruzi* e de duas espécies exclusivas de morcegos: *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*. Fonte: Modificado de Molyneux, 1991 e <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>.



Os representantes do subgênero *Schizotrypanum* formam um grupo homogêneo, sendo as formas encontradas no sangue dos mamíferos praticamente indistinguíveis morfológicamente, todas muito semelhantes a *T. cruzi* (Figura 4). Por este motivo, todas as espécies desse subgênero são denominadas *T. cruzi*-like (Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991).

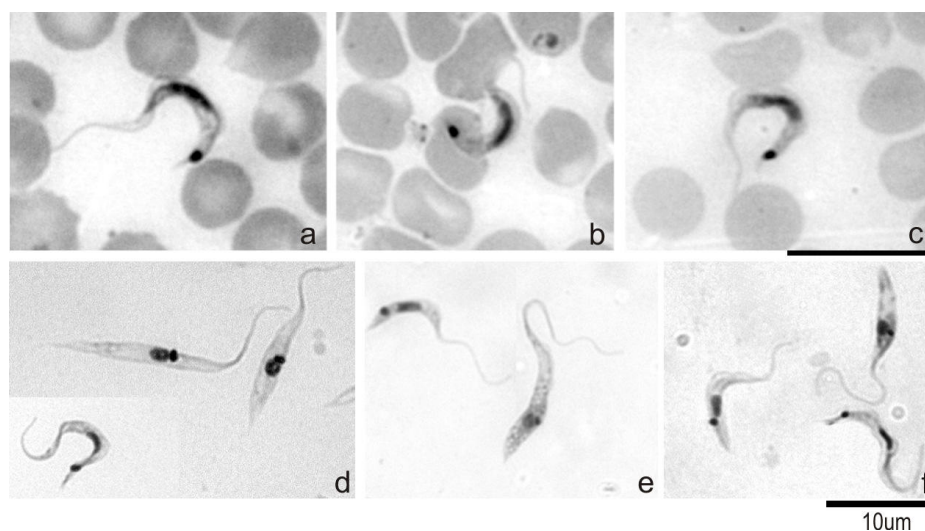


Figura 4. Morfologia por microscopia óptica, das espécies de tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*-like): (a,b,c) formas tripomastigotas encontradas no sangue de morcegos naturalmente infectados; (d,e,f) formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos em meio cultura (LIT). Ambos corados com Giemsa. Espécies: (a,d) *T. cruzi*; (b,e) *T. c. marinkellei* e (c,f) *T. dionisii*.

As espécies de *Schizotrypanum* são as únicas descritas até o momento que infectam células de mamíferos e se multiplicam no interior destas como amastigotas. A capacidade de infectar camundongos pode ser utilizada para separar *T. cruzi* das demais espécies desse subgênero, que são todas espécies exclusivas de morcegos. O desenvolvimento desses tripanossomas em vetores (triatomíneos e cimicídeos) pode ser utilizado para distinguir espécies (Hoare, 1972; Baker, 1985; Molyneux, 1991).

Análises de zimodemas foram utilizadas na identificação de espécies de *Schizotrypanum* (Miles et al., 1978, 1981a,b; Baker e Miles, 1979; Tibayrenc, 2003; Telleria et al., 2004). Glicoconjugados de superfície (aglutinação com lectinas), GIPLs (glicoinositol fosfolipídeos), perfís de polipeptídeos e reatividade com anticorpos monoclonais distinguiram tripanossomas de morcegos (Taylor et al., 1982; Schotellius et al., 1983; Petry et al., 1986, 1987; Barreto-Bergter et al., 1996; Branquinha et al., 1999).

*Trypanosoma cruzi* compreende populações bastante heterogêneas que diferem em características morfológicas, biológicas, patológicas, clínicas, imunológicas, bioquímicas e moleculares (Miles et al., 2009). Essa espécie apresenta uma estrutura populacional

complexa, com isolados distribuídos em seis grupos infragenéricos (DTUs - discrete typing units) denominados TcI-TcVI (Zingales et al., 2009). Os isolados pertencentes às DTUs TcI, III e IV predominam no ciclo silvestre, enquanto isolados das DTUs II, V e VI estão associados principalmente com o ciclo doméstico e peridoméstico de transmissão (Gaunt e Miles, 2000; Yeo et al., 2005; Westenberger et al., 2005; 2006; Llewellyn et al., 2009a,b; Marcili et al., 2009a,b; Lewis et al., 2009; Miles et al., 2009).

A maioria dos isolados de *T. cruzi* que foram caracterizados por diversos marcadores moleculares foi obtida de casos humanos de Doença de Chagas, de triatomíneos de áreas endêmicas e de animais do peridomicílio, especialmente de gambás (*D. marsupialis*). O ciclo silvestre do *T. cruzi* ainda é pouco estudado e apenas recentemente passou a ser alvo de estudos moleculares abrangendo diversas espécies de mamíferos, inclusive morcegos e vetores silvestres, com resultados que mostram uma grande complexidade (Miles et al., 1983; Lisboa et al., 2004, 2006, 2008, 2009; Herrera et al., 2008, 2009; Valente et al., 2009).

Tem sido sugerido que a história evolutiva do *T. cruzi* está historicamente associada com a de seus hospedeiros naturais e seus respectivos ecótopos e triatomíneos associados. Diversos eventos, aparentemente, participam dessas histórias evolutivas: associações de linhagens com ordens/espécies de mamíferos e de triatomíneos preferenciais, especiação simpátrica (nichos ecológicos) e alopátrica, transferência de isolados entre mamíferos que compartilham ecótopos mediado por vetores etc. Evidências filogenéticas e biogeográficas indicam que as linhagens TcI e TcIV circulam entre primatas na Amazônia e são transmitidas por triatomíneos do gênero *Rhodnius*. A associação das linhagens com hospedeiros e nichos ecológicos revelou uma sobreposição dos ciclos naturais de transmissão de TcI e TcIV no ecótopo arbóreo (Gaunt e Miles, 2000; Maia da Silva et al., 2008; Marcili et al., 2009a; Llewellyn et al., 2009a; Miles et al., 2009).

Estudos de isolados de *T. cruzi* da linhagem TcIII de mamíferos e de triatomíneos silvestres capturados do Norte a Sul do Brasil tem confirmado a ampla distribuição geográfica de TcIII, assim como a associação com ecótopos terrestres. Tatús, didelfídeos, roedores terrestres e cães domésticos foram encontrados infectados por TcIII, e triatomíneos terrestres dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma* foram confirmados como vetores (Gaunt e Miles, 2000; Yeo et al., 2005; Martins et al., 2008; Marcili et al., 2009b; Llewellyn et al., 2009b).

Apesar do estudo de um número muito limitado de isolados de animais silvestres, os resultados dos estudos sobre isolados de *T. cruzi* dos ciclos silvestres corroboram a complexidade de *T. cruzi* (Yeo et al., 2005; Lewis et al., 2009; Llewellyn et al., 2009a; Miles et al., 2009). Todos os estudos apontam para a necessidade da utilização de análises filogenéticas, além da genotipagem, para compreender a história evolutiva de *T. cruzi* em associação com seus hospedeiros mamíferos e vetores, em diferentes ecótopos. Devido à

falta de estudos moleculares de isolados de *T. cruzi* de mamíferos e vetores de diferentes espécies, de origens geográficas distintas, a diversidade e as relações filogenéticas intraespecíficas de *T. cruzi* apenas começa a ser entendida.

Infecções causadas por *T. cruzi* em morcegos foram descritas por diversos pesquisadores (Dias, 1936; Funayama et al., 1970 a,b; Funayama, 1973; Barreto et al., 1974). Porém, a diversidade biológica e genética desses tripanossomas ainda é pouco conhecida (Steindel et al., 1998; Grisard et al., 2003; Barnabé et al., 2003; Lisboa et al., 2008). Triatomíneos que vivem em buracos de árvores e cavernas, telhados de folhas de palmeiras, tocas de animais silvestres, palmeiras, forros de residências e outros abrigos de morcegos podem ser vetores de *T. cruzi* entre os morcegos. A maioria dos morcegos infectados é insetívoro, devendo a infecção ocorrer principalmente por via oral com a ingestão dos vetores infectados (Marinkelle, 1976).

De todos os tripanossomas conhecidos até o momento, *T. c. marinkellei* é o mais filogeneticamente relacionado com *T. cruzi*. Apesar da semelhança morfológica e do compartilhamento de morcegos hospedeiros, esses tripanossomas diferem em vários aspectos, todos ainda muito pouco estudados. *T. c. marinkellei*, aparentemente, se restringe a morcegos da família Phyllostomidae e é transmitido apenas por triatomíneos do gênero *Cavernicola* (Marinkelle, 1982a). Entretanto, in vitro, *T. c. marinkellei* infecta e se desenvolve em células de diversos mamíferos semelhante a *T. cruzi*. *T. c. marinkellei* foi confirmado como uma espécie distinta por características biológicas, bioquímicas, imunológicas e moleculares (Baker et al., 1978; Mainkelle, 1982a; Ebert, 1983; Schotellius et al., 1983; Tibayrenc e Le Ray, 1984; Petry et al., 1986; Steindel et al., 1998; Barnabé et al., 2003; Telleria et al., 2010).

São poucos os isolados dessa espécie analisados, existem dúvidas sobre o ciclo de vida e não se conhece os mecanismos envolvidos na restrição de *T. c. marinkellei* aos morcegos nem aos triatomíneos do gênero *Cavernicola*. A grande proximidade de *T. c. marinkellei* com *T. cruzi* foi recentemente corroborada por estudos proteômicos que não permitiram distinguir essas duas espécies (Telleria et al., 2010). Apesar de compartilharem muitos antígenos, camundongos imunizados com *T. c. marinkellei*, ou outro *T. cruzi*-like, não foram protegidos de infecção por *T. cruzi* (Marinkelle; 1982a,b; Nascentes et al., 2008, 2010).

*Trypanosoma dionisii* é a espécie do subgênero *Schizotrypanum* mais distante filogeneticamente de *T. cruzi*. Formas amastigotas, similares as de *T. cruzi*, foram encontradas no músculo esquelético de morcegos infectados com essa espécie (Gardner e Molyneux, 1988 ). Entretanto, diferente das demais espécies de *Schizotrypanum*, além de “ninhos” de amastigotas nos músculos cardíaco, estriado e do estômago, *T. dionisii* produz “pseudocistos” contendo formas epimastigotas no coração, diafragma, músculos do esterno,

mucosa intestinal e ovário dos morcegos. O desenvolvimento de *T. dionisii* em cultura é semelhante ao de *T. cruzi*. Este parasita, cuja capacidade de invadir células não fagocíticas é inibida por tratamento dessas com citocalasina e pela imobilização dos parasitas por aquecimento, invade estas células sem serem interiorizados por pseudópodes, provavelmente, utilizando a mesma estratégia de *T. cruzi* (Baker et al., 1972; Glauert et al., 1982; Baker, 1985; Molyneux, 1991; Oliveira et al., 2009).

Como as demais espécies de *Schizotrypanum*, exceto *T. cruzi*, *T. dionisii* não infecta o homem, e alguns mecanismos de morte deste parasita foram propostos: morte extracelular de parasitas revestidos por anticorpos, citotoxicidade mediada por linfócitos e mediada por complemento. Foi demonstrado que *T. dionisii* é interiorizado e destruído no interior de fagossomas, sendo os neutrófilos mais eficientes que monócitos, que ocorre na presença ou não de anticorpos específicos (Mkwananzi et al., 1976; Thorne et al., 1979, 1981, Glauert et al., 1982; Molyneux, 1991).

Na Europa e no Canadá, *Cimex pipistrelli* é o vetor natural de *T. dionisii* e de *T. vespertilionis* e o desenvolvimento no vetor é semelhante ao de *T. cruzi* em triatomíneos (Bower e Woo, 1982; Gardner e Molyneux, 1988).

### 1.3.2 Subgênero *Herpetosoma*

As espécies de tripanossomas tradicionalmente classificadas no subgênero *Herpetosoma* com base na morfologia de formas do sangue (Figura 5) não são patogênicas para seus hospedeiros mamíferos. Essas espécies podem ser divididas em dois grupos: *T. lewisi* (parasitas principalmente de roedores) e *T. rangeli* (Hoare, 1972; D'Alessandro e Saraiva, 1999). Com base em filogenias moleculares, esse subgênero foi revisto uma vez que se mostrou polifilético em todas as análises inferidas (Stevens et al., 1999a,b; Maia da Silva et al., 2004b; 2007; Hamilton et al., 2004, 2007). Análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH indicaram que *T. rangeli* é mais relacionado com *T. cruzi* do que com os tripanossomas africanos, apesar de ser transmitido de forma inoculativa como os membros do clado *T. brucei* (Salivaria) (Stevens et al., 1999a,b, 2001; Maia da Silva et al., 2004a,b, 2007). Todos esses estudos validam nesse subgênero apenas o grupo *T. lewisi*, excluindo *T. rangeli* que deverá ser revalidado no subgênero *Tejeraia* proposto há muitos anos para esse grupo (Añez, 1984; Maia da Silva et al., 2004b).

*T. rangeli* ocorre da América Central ao sul da América do Sul, compartilhando com *T. cruzi* a distribuição geográfica e a capacidade de infectar mamíferos de praticamente todas as ordens. Essa espécie parasita principalmente primatas, inclusive o homem, roedores, marsupiais e edentados (D'Alessandro e Saraiva, 1999; Guhl e Vallejo, 2003; Maia da Silva et al., 2007). As infecções humanas causadas por *T. rangeli* são comuns na

América Central, Colômbia e Venezuela, onde acarretam sérios problemas para o diagnóstico de *T. cruzi* (Guhl e Vallejo, 2003). No Brasil, *T. rangeli* foi descrito em diferentes mamíferos e triatomíneos (gênero *Rhodnius*), principalmente na Amazônia, onde foram descritos os únicos casos humanos brasileiros (Miles et al., 1983; Coura et al., 1996; Maia da Silva et al., 2004a,b, 2007).

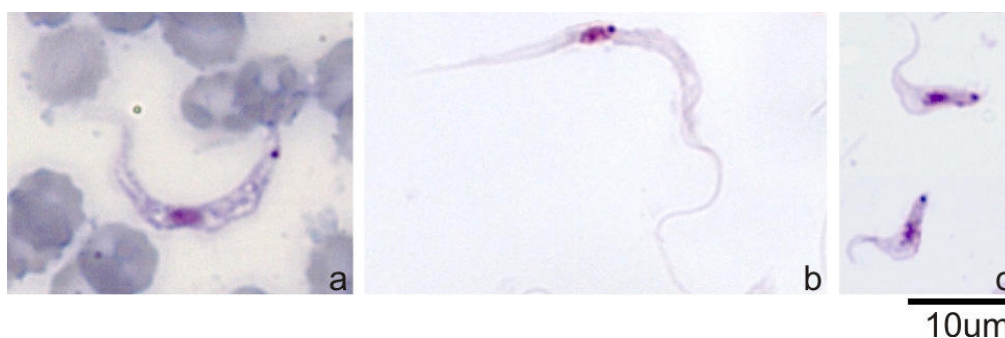


Figura 5. Morfologia, por microscopia óptica, de *T.rangeli*-like. (a) Forma tripomastigota no sangue de um morcego naturalmente infectado; (b,c) formas epimastigota e tripomastigotas metacíclicos em cultura. Coloração por Giemsa.

Diferente de *T. cruzi*, *T. rangeli* não é patogênico para mamíferos, mas sim para o inseto vetor, acarretando dificuldades no repasto sanguíneo e na ecdise, muitas vezes sendo letal para triatomíneos com grande número de parasitas. *T. cruzi* tem todo seu desenvolvimento restrito ao tubo digestivo, enquanto *T. rangeli* multiplica-se no tubo digestivo e completa seu desenvolvimento (metaciclogênese) nas glândulas salivares do inseto vetor; sua transmissão se dá por inoculação durante o repasto sanguíneo de triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Añez, 1984; Guhl e Vallejo, 2003). No ciclo silvestre, a infecção por via oral pode ser um mecanismo muito importante, que deve ocorrer com a ingestão de triatomíneos por diversos animais silvestres (Maia da Silva et al., 2008).

Estudos moleculares comparativos de isolados de diferentes hospedeiros mamíferos e espécies de *Rhodnius*, de regiões geográficas demonstraram que *T. rangeli* é um taxon complexo formado por diferentes linhagens. Trabalhos baseados em padrões de RAPD e análises filogenéticas do gene ribossômico (SSU e ITS) e de SL de isolados de *T. rangeli* de diferentes hospedeiros e regiões geográficas dividiram essa espécie em 4 linhagens (A-D) (Maia da Silva et al., 2004a, b, 2007). Estudos baseados no gene de mini-exon e em padrões de minicírculos de kDNA revelaram apenas duas linhagens (Grisard et al., 1999; Vallejo et al., 2003, 2009; Urrea et al., 2005).

A congruência filogeográfica das linhagens de *T. rangeli* com os complexos das espécies de *Rhodnius* corroborou a hipótese de uma extensa associação entre as linhagens de *T. rangeli* e espécies de *Rhodnius*, sugerindo uma longa história compartilhada do parasita com seu vetor. A segregação dos isolados de *T. rangeli* de vetores de distintos

complexos, independente do hospedeiro mamífero, sugere que a evolução das linhagens de *T. rangeli* está relacionada a ciclos de transmissão independentes, provavelmente ligados a ecótopos específicos de seus vetores (Maia da Silva et al., 2007).

De acordo com todos os marcadores analisados, a linhagem A é constituída por isolados da Venezuela, Colômbia, Honduras, Guatemala e Brasil (região oriental e ocidental da Amazônia). Esta linhagem foi associada ao complexo *R. prolixus* (*R. robustus* e *R. neglectus*), e encontrada em humanos, cães, macacos e gambás. A linhagem B, que contém isolados humanos e de macacos da Amazônia brasileira, está relacionada com o complexo *R. brethesi*. A linhagem C, compreende isolados de *R. pallenscens* da Colômbia e Panamá e isolados humanos de diversos países da América Central. O isolado SC-58, de um roedor da região Sul do Brasil é o único representante da linhagem D, cujo vetor é desconhecido. Portanto, *T. rangeli* é um complexo de linhagens distintas bastante relacionadas com os complexos de espécies da tribo *Rhodinii* que, por sua vez, apresentam uma acentuada estrutura geográfica (Maia da Silva et al., 2004b, 2007; Vallejo et al., 2009).

A primeira descrição de *Herpetosoma* em morcegos foi na Colômbia: *T. rangeli*-like em *Artibeus lituratus* e *Glossophaga soricina*. Entretanto, o xenodiagnóstico de morcegos infectados com esse tripanossoma com *Rhodnius prolixus* e *Cavernicola pilosa* revelou a presença de formas epimastigotas somente na ampola retal dos triatomíneos (Marinkelle, 1966). Recentemente, estudos moleculares de parasitas em morcegos do Brasil (Lisboa et al., 2008) e Panamá (Cottontail et al., 2009) revelaram a presença de *T. rangeli* em infecções mistas com *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* (Cottontail et al., 2009).

Infecções experimentais com *Rhodnius prolixus* previamente infectados com um isolado de *T. rangeli* e que, posteriormente, se alimentaram em morcegos confirmaram que as formas infectantes encontradas nas glândulas salivares do triatomíneo eram infectantes para morcegos: *Carollia perpicillata* se mostrou mais suscetível a infecção por esse tripanossoma do que *Glossophaga soricina* (Thomas et al., 2007).

Existem apenas alguns relatos não confirmados de formas *T. lewisi*-like descritas em morcegos (Marinkelle, 1966; Molyneux, 1991). Outras espécies classificadas no subgênero *Herpetosoma* foram descritas em morcegos: *T. longiflagellum* em *Thaphozous nudiventris* no Iraque (Marinkelle, 1977); *T. lineatum* em *Vampyrops lineatum* na Venezuela (Hoare, 1972) e *T. aunawa*, descrito em *Miniopterus tristis* da Nova Guiné (Ewers, 1974). Essas descrições são baseadas na morfologia das formas tripomastigotas sanguíneas e pouco se sabe sobre os possíveis vetores para esse tripanossomas. Ewers (1974) encontrou sanguessugas terrestres (*Philaemon*) infectadas por tripanossomas na mesma caverna de onde foi capturado o morcego infectado com *T. aunawa*. Porém, não foi possível concluir se os tripanossomas encontrados nas sanguessugas eram os mesmos do morcego.

### 1.3.3 Subgênero *Megatrypanum*

O subgênero *Megatrypanum* foi definido por Hoare (1972) apenas com base em parâmetros morfológicos. De acordo com essa classificação tradicional, esse subgênero se caracteriza pela grande diversidade de espécies de tripanossomas e de hospedeiros mamíferos e vetores. Estes tripanossomas infectam mamíferos domésticos e silvestres, de praticamente todas as ordens, especialmente ruminantes, morcegos, carnívoros, roedores e marsupias. A espécie-tipo é *T. theileri*, encontrada em bovinos no mundo todo. As espécies classificadas nesse subgênero foram agrupadas com base exclusivamente na presença das maiores formas tripomastigotas observadas no sangue de mamíferos. Devido a aparente restrição pela espécie-hospedeira, as espécies desse subgênero são nomeadas de acordo com o hospedeiro de origem. Nenhuma espécie desse grupo foi encontrada no homem (Hoare, 1972).

As espécies do subgênero *Megatrypanum* não são patogênicas para seus hospedeiros, que apresentam baixas parasitemias e infecções crônicas. *T. theileri* se multiplica na corrente sanguínea sob formas epimastigotas que se diferenciam em tripomastigotas e seus vetores são principalmente tabanídeos (Wells, 1976; Rodrigues et al., 2003).

As análises filogenéticas realizadas utilizando sequências de SSU rRNA mostraram que este é um taxon artificial (Stevens et al., 1999a,b, 2001). Esse táxon foi recentemente revisado pelo nosso grupo e passou a compreender exclusivamente tripanossomas de animais silvestres e domésticos da ordem Artiodactyla que se posicionam em um clado muito homogêneo junto com *T. theileri* (Rodrigues et al., 2003, 2006, 2010a). Com o estudo de isolados de bovinos de diversas regiões do Brasil demonstramos a existência de duas grandes linhagens e diversos genótipos associados com a origem geográfica e espécie do hospedeiro, definidas com sequências de SSU rRNA, ITS rDNA e dos genes SL e Catepsina L (Rodrigues et al., 2006, 2010a,b). Todas as espécies posicionadas nesse subgênero isoladas de hospedeiros das ordens Rodentia, Marsupialia, Chiroptera, Edentata e Primata devem ser taxonomicamente revistas (Stevens et al., 1999b, 2001; Maia da Silva et al., 2004b; Rodrigues et al., 2006; Hamilton et al., 2005b, 2007, 2009).

Até o momento, apenas uma espécie de tripanossoma de morcego (*T. sp bat*) classificada morfolologicamente no subgênero *Megatrypanum* foi posicionada na árvore filogenética do gênero *Trypanosoma*, o que mostrou que essa espécie não pode ser classificada em nenhum dos subgêneros tradicionalmente estabelecidos (Stevens et al., 1999b). Análises filogenéticas baseadas em sequências dos genes SSU rRNA e gGAPDH mostraram que o subgênero *Megatrypanum* é artificial e que apenas as espécies parasitas

de ruminantes (Artiodactyla) devem ser mantidas neste táxon (Stevens et al, 1999a; Rodrigues et al., 2006).

A maioria dos tripanossomas descritos em morcegos pertence ao subgênero *Megatrypanum*. Tripanossomas classificados neste subgênero têm sido descritos em morcegos na África, Europa, Ásia e Américas Central e do Sul. Porém, as informações sobre esses tripanossomas se restringem ao encontro de grandes formas tripomastigotas no sangue do hospedeiro (Figura 6). Embora a parasitemia das infecções causadas por essas espécies possa ser relativamente alta, comparada às espécies de *Schizotrypanum*, esses tripanossomas dificilmente são isolados em cultura. Consequentemente, a classificação das espécies de tripanossomas neste subgênero foi baseada apenas em critérios morfológicos e hospedeiro de origem, portanto, precisa ser analisada com marcadores moleculares.

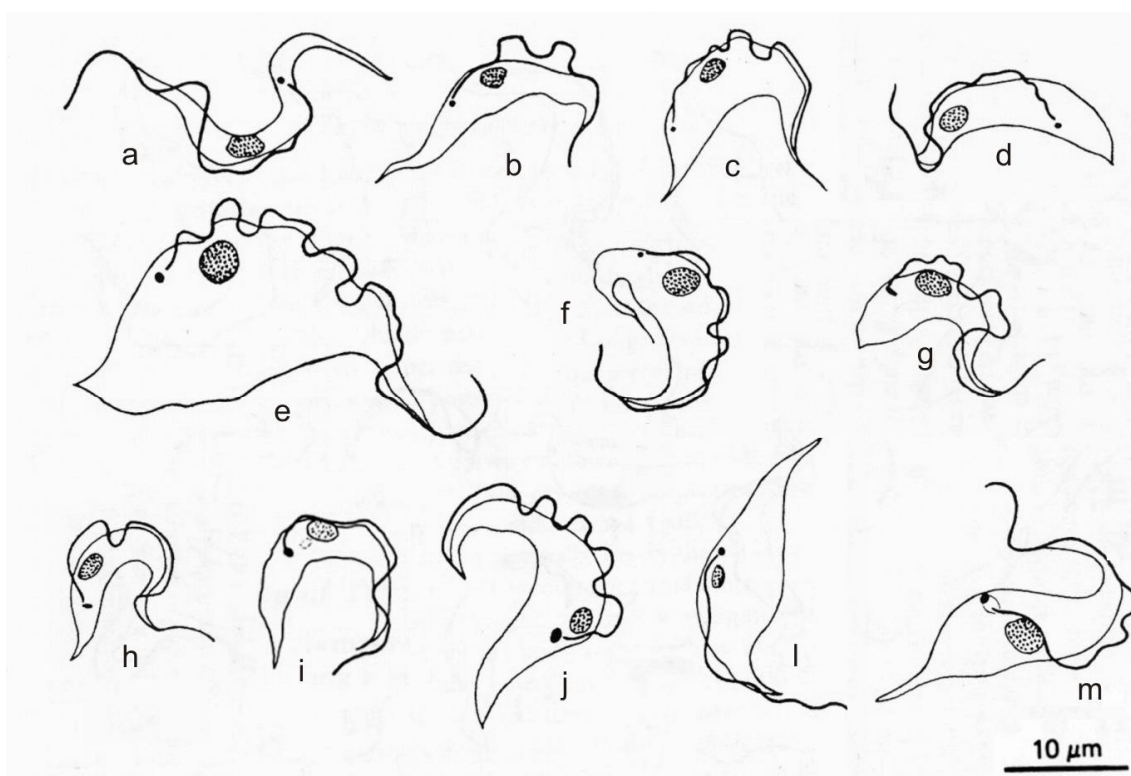


Figura 6. Espécies de tripanossomas do Subgênero *Megatrypanum*, encontradas no sangue dos morcegos. (a) *Trypanosoma megadermae* de *Lavia frons*; (b,c) *T. heybergi* de *Nycteris hispida*; (d) *T. heybergi*-like de um morcego frugívoro; (e) *T. heybergi* de *Nycteris capensis*; (f) *T. thomasi* de *Nycteris macrotis*; (g,h) *T. pessoai* de *Desmodus rotundus*; (i) *T. incertum* de *Pipistrellus pipistrellus*; (j) *T. mpapuense* de *Nycteris aethiopica*; (l) *T. morinorum* de *Asellia tridens*; (m) *T. leleupi* de *Hipposideros caffer*. Fonte: Modificado de Hoare, 1972 e Gardner e Molyneux, 1988.

Nas Américas foram descritas as seguintes espécies: *T. pessoai* em *Desmodus rotundus* e *Carollia perspicillata* no Brasil e em outros dois morcegos do gênero *Artibeus* na Costa Rica; *T. leonidasdeanei* em *Saccopteryx bilineata* (Costa Rica); *T. pifanoi* em *Artibeus lituratus* e *Phyllostomus hastatus* (Colômbia) e *T. megadermae*-like em *Myotis nigricans* e



*Glossophaga soricina* na Venezuela e no Brasil, respectivamente (Deane e Sugay, 1963; Esquivel et al., 1967; Zeledon e Rosabal, 1969; Marinkelle e Duarte, 1968; Dias e Pifano, 1941; Dias, 1942).

Na Ásia foram descritas quatro espécies de tripanossomas: *T. scotophili* em *Scotophilus heati* na China (Liao, 1982); *T. megadermae* em *Rhinolophus hipposideros* no Irã (Edrissian et al., 1976); *T. magnusi* encontrado em *Pipistrellus kuhli* e *Taphozus nudiventri* do Iraque (Shamsuddin e Mohammed, 1978) e *T. rhinopoma* em *Rhinopoma harwickei* na Índia (Bandyopadhyay et al., 1980).

Apenas uma espécie, *T. incertum* foi descrita em *Pipistrellus pipistrellus* na Europa (Gardner e Molyneux, 1988). Por outro lado, o continente africano possui a maior parte das descrições de tripanossomas deste subgênero: *T. megadermae* em *Lavia frons* do Sudão (Wenyon, 1909); *T. mpapuense* em *Nycteris aethiopica* da Tanzânia (Reichenow, 1940); *T. lizae* em *Hipposideros cyclops* do Gabão (Miltgen e Landau, 1979); *T. morinorum* (Senegal e Congo) e *T. leleupi* (Congo e Burundi) são descritos em morcegos do gênero *Hipposideros* (Rodhain, 1951; Hoare, 1972); *T. heybergi* encontrado em morcegos do gênero *Nycteris* no Congo, Quênia e Liberia (Rodhain, 1923; Heisch e Garnham, 1953; Bray, 1964) e descrito também em *Pipistrellus kuhli* e *Rhinolophus spp* do norte da África e na Zâmbia, respectivamente (Sergent e Sergent, 1905; Keymer, 1971) e *T. thomasi* descrito em *Nycteris macrotis* no Congo (Lips e Rodhain, 1956).

Apenas duas espécies foram descritas, na África, em morcegos da subordem Megachiroptera: *T. megachiropterum* descrito em *Pteropus tonganus* de Toga e *Trypanosoma sp bat* (*T. sp bat*) em *Rousettus aegyptiacus* do Gabão (Marinkelle, 1979; Stevens et al., 1999b).

Os vetores responsáveis pela transmissão das espécies de *Megatrypanum* entre os morcegos e os ciclos de vida nos seus vetores ainda não foram totalmente esclarecidos (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976). Alguns trabalhos descrevem os cimicídeos como vetores, uma vez que foi demonstrado que *T. incertum* se desenvolve em *C. lectularius* e *C. pipistrelli* experimentalmente infectados e que a transmissão desse tripanossoma ocorre através da contaminação com as fezes dos cimicídeos (Gardner e Molyneux, 1988).

Em 1963, Berge e colaboradores encontraram diferentes formas de *T. leleupi* no estômago (tripomastigotas sanguíneos) e no intestino (formas metacíclicas) do cimicídeo *Stricticimex brevispinosus*. Anciaux de Faveaux (1965) encontrou formas epimastigotas desse mesmo tripanossoma em cimicídeo do gênero *Afrocimex*. Além desses cimicídeos específicos de morcegos, ácaros aderidos em um morcego infectado com *T. heybergi*, apresentaram flagelados no intestino. Esta mesma espécie de tripanossoma também foi encontrada no intestino de ácaros do gênero *Ornithonyssus*. Entretanto, carrapatos, ácaros

e moscas (Streblidae) coletadas de um morcego infectado com *T. heybergi*-like não apresentaram tripanossomas (Rodhain, 1923; Heisch e Garnham, 1953).

*T. incertum* não se desenvolveu em triatomíneos (Gardner e Molyneux, 1988). Tentativas de xenodiagnóstico com *T. pifanoi* e *T. pessoai* não obtiveram sucesso com triatomíneos como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. phyllosoma* e *T. pallidipennis* (Marinkelle e Duarte, 1968; Deane e Sugay, 1963). Apenas *T. leonidasdeanei* apresentou temporariamente algumas formas epimastigotes em triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Zeledon e Rosabal, 1969). Flebotomíneos foram incriminados como vetores de *T. pessoai* e *T. leonidasdeanei* (Deane et al., 1978; Zeledon e Rosabal, 1969).

#### 1.3.4 Subgênero *Trypanozoon*

O subgênero *Trypanozoon* compreende espécies patogênicas para o homem (*T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*) e para animais de importância econômica (*T. b. brucei*, *T. evansi* e *T. equiperdum*). Apenas *T. evansi* e *T. equiperdum*, que podem ser mecanicamente transmitidos, ocorrem fora da África. Morcegos não foram encontrados naturalmente infectados por *T. brucei*. Experimentalmente, *T. brucei* induziu infecções muito mais crônicas em morcegos insetívoros (*Tadarida condylura*) do que em camundongos. Já em morcegos frugívoros, como *Epomophorus anurus*, essas infecções são agudas, matando os morcegos em aproximadamente três dias (Woo e Hawkins, 1975).

*T. evansi* é muito comum no Pantanal do Brasil onde infecta cavalos e animais silvestres como capivaras e quatis (Ventura et al., 2001; Herrera et al., 2004, 2008). *Desmodus rotundus*, morcego hematófago comum nesta região, além de um importante reservatório desta infecção, pode ser também transmissor do parasita durante o seu repasto sanguíneo (Hoare, 1965, 1972). Um levantamento realizado em morcegos do Pantanal brasileiro detectou *T. evansi* em morcegos frugívoros e insetívoros apenas por PCR, indicando que a parasitemia é muito baixa nestes animais (Herrera et al, 2004).

#### 1.4 Ordem Chiroptera

A ordem Chiroptera possui 18 famílias, 200 gêneros e cerca de 1.100 espécies, aproximadamente um quarto de toda a diversidade de mamíferos do mundo (Simmons, 2005). Se considerássemos as espécies já extintas, acrescentaríamos mais seis famílias, aumentando o número de gêneros para 250 (McKenna e Bell, 1997). Essa ordem apresenta uma distribuição mundial, ausente somente nas regiões polares e algumas ilhas oceânicas isoladas. Embora sejam encontrados em regiões de clima temperado, grande parte das espécies de morcegos habitam regiões tropicais e subtropicais. Estes animais têm vida

longa e vivem em colônias que variam muito de tamanho, de poucos indivíduos a milhares, dependendo da espécie e raramente são solitários (Nowak, 1991).

De acordo com caracteres morfológicos, a ordem Chiroptera foi tradicionalmente, com base em características morfológicas, dividida em duas subordens: Megachiroptera (morcegos sem sistema de ecolocalização) e Microchiroptera (apresentam ecolocalização). A subordem Megachiroptera é representada apenas pela família Pteropodidae, cujas espécies são frugívoras e utilizam visão e o olfato para localizar seu alimento. Esses morcegos são encontrados apenas no Velho Mundo, geralmente vivendo em grandes colônias em árvores, na África, Ásia e Oceania (Simmons e Geisler, 1998).

A subordem Microchiroptera está distribuída no Novo e Velho Mundo, com centenas de espécies de 17 famílias organizadas em 4 superfamílias: Rhinolophoidea (Rhinolophidae, Rhinopomatidae, Megadermatidae e Craseonycteridae); Emballonuroidea (Emballonuridae e Nycteridae); Noctilionoidea (Phyllostomidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Thyropteridae, Furipteridae, Mystacinidae e Myzopodidae) e Vespertilionoidea (Vespertilionidae, Molossidae e Natalidae) (Jones et al., 2002; Teeling et al., 2005). Os morcegos dessa subordem são preferencialmente insetívoros, porém existem espécies que se alimentam de frutas, néctar, pólen, brotos de plantas, pequenos vertebrados (peixes, sapos, lagartos), morcegos e sangue. Existem apenas três espécies de morcegos hematófagos no mundo (*Desmodus rotundus*, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*), todas da família Phyllostomidae que é restrita das Américas Central e do Sul. Seus abrigos incluem cavernas, cavidades em rochas e árvores, pontes, folhagens, telhados, etc. (Kunz, 1982; Lewis, 1995).

Durante muito tempo existiram muitas controvérsias sobre a monofilia da ordem Chiroptera. Um estudo baseado em caracteres morfológicos visuais sugeriu que megaquirópteros eram mais relacionados com primatas (lêmures) do que com os microquirópteros (Pettigrew, 1986). Contudo, estudos moleculares rejeitaram esta hipótese e apoiaram a monofilia da ordem Chiroptera (Simmons e Geisler, 1998; Jones et al., 2002; Teeling et al., 2000, 2002, 2005).

A classificação atual da ordem Chiroptera, baseada em inferências filogenéticas, não validou a separação dos morcegos em Micro- e Megachiroptera. Estudos paleontológicos e filogenéticos baseados em sequências de genes nucleares e mitocondriais demonstraram que a subordem Microchiroptera não é monofilética, pois alguns morcegos com capacidade de ecolocalização são mais relacionados com morcegos da subordem Megachiroptera (Teeling et al., 2002, 2005; Van Den Bussche e Hofer, 2004). Com a confirmação desse relacionamento por diversos estudos, foram criadas duas novas subordens: Yinpterochiroptera e Yangochiroptera. A subordem Yinpterochiroptera é composta pelos morcegos da família Pteropodidae (Megachiroptera) e Rhinolophoidea, Megadermatidae e Rhinopomatidae (Microchiroptera). A subordem Yangochiroptera é compreendida por todas

as outras famílias de morcegos da antiga subordem Microchiroptera (Teeling et al., 2005; Teeling, 2009) (Figura 7).

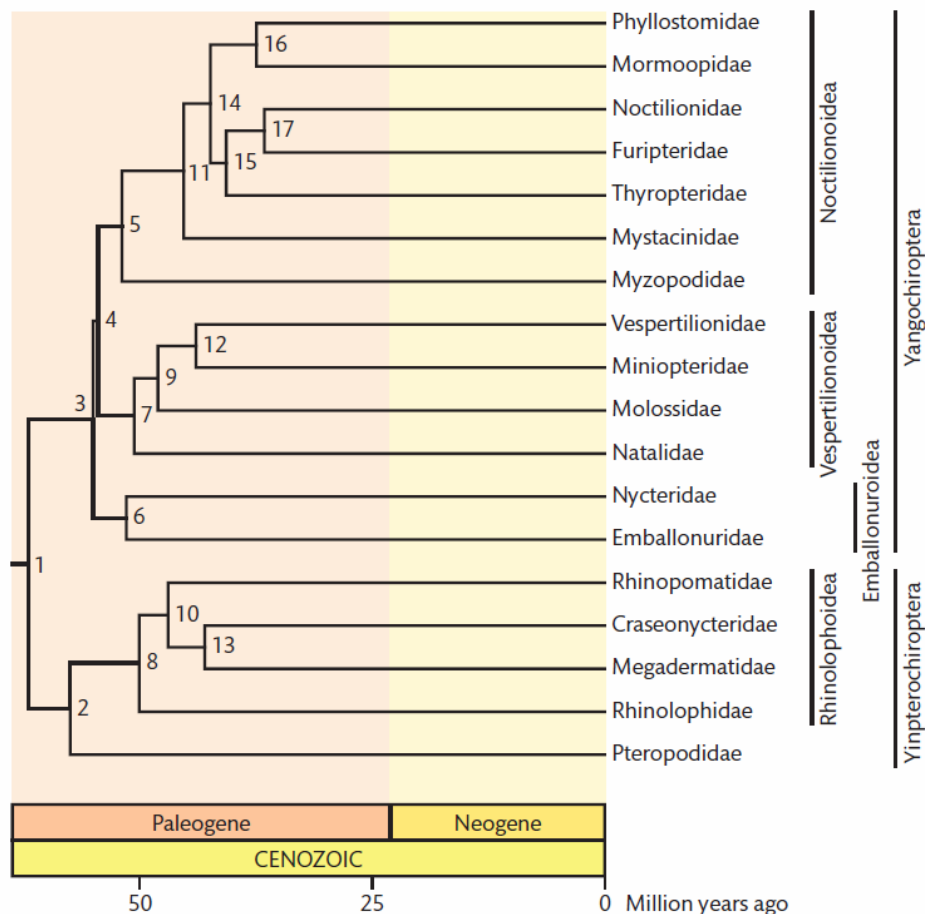


Figura 7. Árvore evolutiva dos morcegos (Chiroptera). Fonte: Teeling, 2009

Diversos estudos tentam esclarecer a origem dos morcegos, com evidências de que surgiram na América do Norte ou na África no Cretáceo (~65mya) (Teeling, 2009). Análises filogenéticas e biogeográficas sugerem a África como o centro de origem e grande dispersão dos morcegos no Eoceno (~45mya). Existem evidências de que a rota principal foi da Eurásia para as Américas, via Beríngia, no Mioceno (~20mya) (Simmons, 2005; Eick et al., 2005). Endemismos são muito comuns em Chiroptera, sugerindo que a separação dos continentes criou uma barreira importante no movimento dos morcegos, sendo raras as famílias existentes nas Américas e no Velho Mundo (Stadelmann et al., 2007; Teeling, 2009)

Existem poucas famílias e gêneros com distribuição no Velho e Novo Mundos, como Emballonuridae, Vespertilionidae e Molossidae. Acredita-se que morcegos do gênero *Myotis* (Vespertilionidae), que são distribuídos em todos os continentes, foram um dos últimos a colonizar o Novo Mundo quando ainda podiam atravessar o estreito de Beringer (~12mya) (Stadelmann et al., 2007). É muito difícil sugerir hipóteses evolutivas para esses mamíferos

uma vez que, raramente são encontrados fósseis antigos. (Eisenberg e Redford,1999; Teeling et al., 2005). Os registros fósseis mais antigos e preservados (*Icaronycteris index* e *Onychonycteris finneyi*) são da América do Norte (Green river em Wyoming) e foram datados no Eoceno (~52mya).

### 1.5 Genes utilizados para filogenia e taxonomia de tripanossomas

A ausência de critérios taxonômicos confiáveis têm levado a inúmeros erros de classificação dos tripanossomatídeos em geral. Embora exista hoje um consenso que os critérios devem ter como base a filogenia molecular, essa conduta tem sido pouco adotada ou utilizada de forma incorreta. Desde as primeiras análises filogenéticas baseadas em sequências de genes ribossômicos (Sogin et al., 1986; Fernandes et al., 1993), o uso de sequências gênicas tem sido valioso na reconstrução da história evolutiva desses organismos.

Marcadores moleculares têm sido utilizados por diversos grupos, porém, muitas vezes os resultados não são facilmente comparáveis. Entretanto, esse é um requisito indispensável na utilização de marcadores moleculares em taxonomia. A análise de um número limitado de espécies, concentrado em poucos grupos de tripanossomas impediu, até recentemente, inferências de árvores filogenéticas bem resolvidas. Atualmente, diversos genes, sequências e marcadores vêm sendo utilizados para análises de polimorfismo genético e inferências filogenéticas, sendo os mais utilizados os genes ribossômico (SSU rRNA), gGAPDH, "spliced leader", genes mitocondriais e, mais recentemente, genes codificadores de Catepsina L-like.

#### 1.5.1 Gene ribossômico

Sequências do gene ribossômico têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre espécies do filo Euglenozoa. Os tripanossomatídeos possuem uma dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. Os genes de RNA ribossômico (rRNA) consistem de unidades de repetição compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) e são intercalados por um espaçador intergênico (IGS), que se repete em "tandem" mais de 100 vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição conhecida como pré-rRNA. Após várias etapas de processamento o pré-rRNA dá origem a três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior), que nestes organismos é constituída por dois fragmentos de alto peso molecular, 24S $\alpha$  e 24S $\beta$  e quatro subunidades de rRNAs de baixo peso molecular (S1, S2, S4 e S6). As subunidades SSU e LSU são

constituídas por sequências altamente conservadas e intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (ITS 1 e 2, espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) que são flanqueados pelo espaçador intergênico (IGS), que apresenta sequências altamente variáveis (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990) (Figura 8).

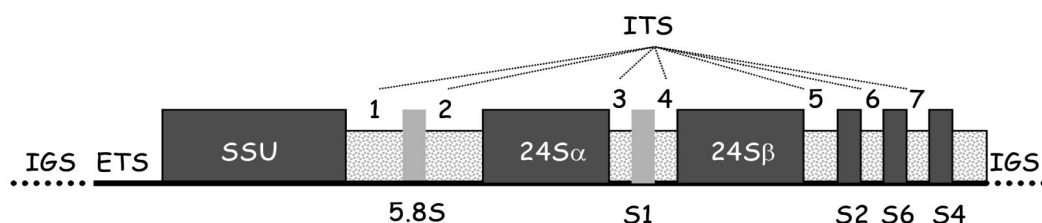


Figura 8. Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNA precursores de tripanossomatídeos.

Esses genes são utilizados para inferências de relacionamentos filogenéticos porque ocorrem e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos, e apresentam domínios com diferentes graus de conservação (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990). A presença de diversas regiões, transcritas ou não, que exibem diferentes graus de conservação, faz desses genes excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies, linhagens e genótipos (Souto et al., 1996; Zingales et al., 1998; Brisse et al., 2001; Stevens et al., 2001; Maia da Silva et al., 2004b; Hamilton et al., 2004, 2007; Rodrigues et al., 2006; Cortez et al., 2006; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al., 2008, 2009a,b).

As sequências do gene SSU rRNA são as mais utilizadas devido a características importantes, tais como: a) o pequeno tamanho que permite fácil obtenção por amplificação por PCR; b) a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos altamente confiáveis, com oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández et al., 1990). Além disso, existem dezenas de sequências de SSU rRNA de diferentes espécies e isolados do gênero *Trypanosoma* depositadas em bancos, permitindo identificar novas espécies e inferir com facilidade o relacionamento de novas espécies, linhagens e isolados.

Os espaçadores IGS e ITS são muito mais variáveis que as regiões SSU e LSU. As sequências do ITS rDNA contêm três regiões: ITS1, 5.8S (que é altamente conservado) e ITS2. As sequências de ITS1 e ITS2 diferem inter e intra-especificamente, sendo excelentes para análises de organismos filogeneticamente próximos assim como alvos para diagnóstico. Análises do tamanho e de sítios de restrição de ITS rDNA, especialmente ITS1, diferenciaram linhagens de *T. cruzi* (Fernandes et al., 1999; Mendonça et al., 2002; Cuervo

et al., 2002; Santos et al., 2002), *T. rangeli* (Maia da Silva et al., 2004b) e *T. theileri* (Rodrigues et al., 2006), além de espécies de tripanossomas Africanos (Desquesnes et al., 2001; Njiru et al., 2005; Rodrigues et al., 2008) e tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2007).

### 1.5.2 Gene codificador da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH)

As espécies da família Trypanosomatidae apresentam uma organela denominada glicossoma que contém enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e glicerol (via glicolítica), sendo essa compartimentalização de enzimas da via glicolítica diferente de outros eucariotos cujas enzimas são citosólicas. A glicose é a principal fonte de energia utilizada pelos estágios dos tripanossomas no sangue dos mamíferos (Hannaert et al., 1992). Nos tripanossomas, foram encontrados dois genes que codificam a enzima glicossômica (gGAPDH), semelhante a dos eucariotos em geral, e um gene que codifica uma enzima citosólica (cGAPDH), mais relacionada com genes bacterianos. (Michels et al. 1986; Kendall et al. 1990). Divergências nas sequências desses genes permitiram o desenho de primers para a amplificação específica de gGAPDH (Hamilton et al., 2005a,b; 2007). (Figura 9)

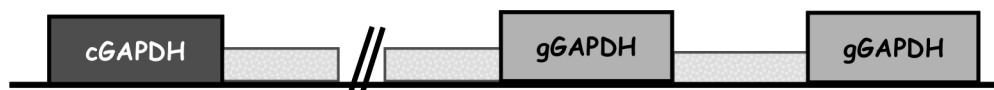


Figura 9. Representação esquemática dos genes de GAPDH.

Os genes de gGAPDH apresentam duas cópias praticamente idênticas e como são codificadores de proteínas estão sujeitos a diferentes pressões seletivas e apresentam taxas de evolução diferentes comparadas as dos genes ribossômicos. Esses genes são excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis de sequências de organismos geneticamente distantes. Outra vantagem é a compatibilidade entre os genes gGAPDH e SSU rRNA para análises com sequências concatenadas (Hamilton et al., 2004, 2005a,b, 2007; Stevens, 2008).

Estudos filogenéticos de um grande número de espécies de tripanossomatídeos com sequências de gGAPDH e SSU rRNA geraram topologias congruentes e as análises independentes e combinadas desses genes têm sido recomendadas na descrição de gêneros, subgêneros e espécies de tripanossomatídeos (Hamilton et al., 2004, 2005a, 2009; Viola et al., 2009b; Maslov et al., 2010; Teixeira et al., 2011).

### 1.5.3. Gene "spliced leader" ou de mini-exon

A maioria dos genes dos cinetoplastídeos não apresentam introns e seus transcritos são RNAs policistrônicos sendo, em geral, o mecanismo pós-transcricional de "transplicing" responsável pela maturação dos mRNAs unitários. Esse processamento resulta na adição, na extremidade 5' dos mRNAs maduros, da sequência de 39 nucleotídeos denominada "spliced leader" RNA (SLRNA) ou "mini-exon derived RNA" (Agabian, 1990; Campbell e Sturm, 2000; Campbell et al., 2003; Liang et al., 2003; Mayer e Floeter-Winter, 2005; Hury et al., 2009).

Devido à presença de mais de 200 cópias do gene SL, repetidas em tandem no genoma dos tripanossomatídeos, e de regiões com diferentes graus de conservação, esses genes têm sido utilizados com finalidades taxonômicas e diagnósticas. Cada unidade de repetição do gene SL pode ser dividida basicamente em três partes: um exon altamente conservado de 39 nucleotídeos, um intron de 50-100 nucleotídeos moderadamente conservado, e uma região intergênica que varia de tamanho e de sequência entre espécies e linhagens de tripanossomatídeos e linhagens de tripanossomas (Figura 10).

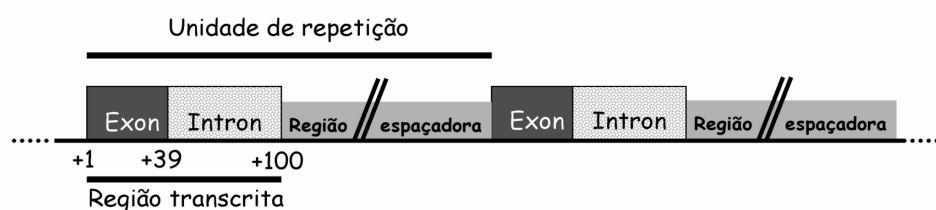


Figura 10. Representação esquemática da unidade de repetição do gene "Spliced leader"

Algumas espécies de tripanossomatídeos apresentam o rRNA 5S, que é composto por sequências altamente conservadas, inserido na região intergênica do gene SL (Gibson et al., 2000).

A comparação de sequências do gene SL na identificação de diferentes gêneros da família Trypanosomatidae revelou regiões com diferentes graus de conservação entre gêneros e espécies. Essa variabilidade tem sido favorável na identificação de marcadores úteis para espécies de praticamente todos os gêneros de tripanossomatídeos: *Leishmania* (Fernandes et al., 1994; Serin et al., 2007; Sukmee et al., 2008); *Endotrypanum* (Fernandes et al., 1993); *Phytomonas* (Serrano et al., 1999; Teixeira et al., 2000; Godoi et al., 2002); *Crithidia* (Fernandes et al., 1997; Yurchenko et al., 2009); tripanossomas africanos (Sturm et al., 1998; Ventura et al., 2001); *T. theileri* (Rodrigues et al., 2010a); linhagens de *T. rangeli* (Grisard et al., 1999; Maia da Silva et al., 2007) e linhagens e genótipos de *T. cruzi* (Souto et



al., 1996; Fernandes et al., 1998, 2001; Brisse et al., 2001, O'Connor et al., 2007; Herrera et al., 2007; Falla et al., 2009). Entretanto, o gene SL apresenta limitações que devem ser consideradas quando são utilizados: a) o polimorfismo das regiões espaçadoras que impede que mesmo isolados de uma mesma espécie (exemplo *T. cruzi*) e espécies muito relacionadas sejam alinhadas (Gibson et al., 2000); b) o polimorfismo de cópias de um mesmo isolado/espécies, que exige análises de diversas sequências e pode gerar resultados difíceis de interpretar e que não representam as relações entre os organismos estudados (Tomasini et al., 2011).

#### 1.5.4. Genes mitocondriais

Os genes mitocôndrias dos tripanossomatídeos estão organizados nas moléculas de DNA circular denominadas maxicírculos de kDNA, que fazem parte da rede enovelada de DNA (maxi- e minicírculos) que constituem o kDNA (DNA do cinetoplasto). A ausência de recombinação faz com que os genes mitocondriais sejam excelentes marcadores para estudos populacionais. As taxas de divergência dos genes mitocôndriais divergem bastante, mas em, em geral, são maiores do que as de gene nucleares de cópia única (cerca de 10 vezes superior). Alguns genes acumulam mais mutações, como os genes codificadores das subunidades da NADH desidrogenase e citocromo oxidase c (CO), enquanto os genes de citocromo b (Cyt b) são mais conservados (Meyer, 1993).

Sequências de Cyt b e COII têm sido as mais analisadas para estudos de tripanossomatídeos, principalmente *T. cruzi*, agrupando os isolados em clados congruentes com os gerados por sequências ribossômicas (Machado e Ayala, 2001; Brisse et al., 2003; Westenberger et al., 2006; Freitas et al., 2006; Baptista et al., 2006; D'Avila et al., 2009, Pena et al., 2009). Um estudo baseado no gene Cyt b permitiu separar *T. rangeli* das espécies do subgênero *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*), confirmando a monofilia de *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* e segregou os isolados de *T. c. marinkellei* em dois grupos (Barnabé et al., 2003).

Os maxicírculos de *T. cruzi* possuem cerca de 22 kb e 20 genes presentes em uma única cópia por maxicírculo (Figura 11) (Westenberger et al., 2006).

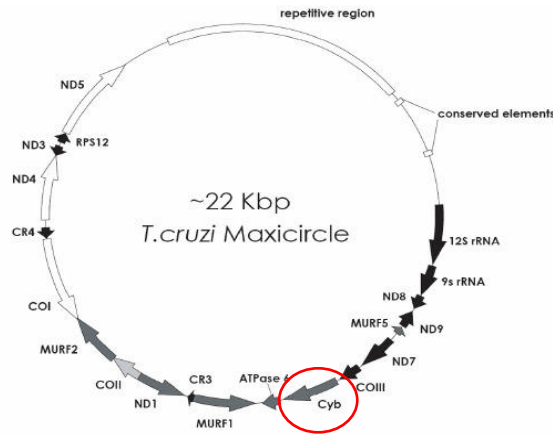


Figura 11. Representação esquemática do maxicírculo de kDNA com o gene de citocromo b (Cyb) em destaque.

### 1.5.5 Genes codificadores de enzimas Catepsina L- like

Durante o ciclo de vida dos tripanossomas diversas proteases são expressas e reguladas ao longo do desenvolvimento nos hospedeiros vertebrados e vetores, sendo as cisteíno-proteases Catepsina L-like (CATL-like), denominadas cruzipaínas em *T. cruzi*, as mais estudadas (Tomas et al., 1997; Aparício et al., 2004; Duschak et al., 2006; Mckerrow et al., 2006, 2009; Caffrey e Steverding, 2009).

Os genes codificadores de cruzipaína (~1404pb) fazem parte de uma família multigênica e estão organizados em repetições em tandem geradas por sucessivas duplicações gênicas. As unidades de repetição contêm uma região intergênica de ~500bp e regiões codificadoras constituídas por pré- e pró-domínios, domínio central e extensão C-terminal. A porção C-terminal, que sofre auto-hidrólise e não é encontrada na enzima madura, somente foi encontrada nos tripanossomatídeos (Cazzulo, 2001). (Figura 12).



Figura 12. Representação do gene da Catepsina L – like em tripanossomas.

Genes codificadores de CATL e CATB (genes de cópia única) têm sido utilizados em análises filogenéticas de parasitas. A maioria dos estudos tem sido baseados em sequências de CATB de helmintos, os estudos filogenéticos de genes codificadores de catepsinas, e proteases em geral, são mais escassos em protozoários (Robinson et al.,

2008; Dacks et al., 2008). Alguns estudos analisaram genes codificadores de catepsinas de espécies de *Leishmania* (Sakanari et al., 1997; Kuru et al., 2007). Genes homólogos ao gene codificador da cruzipaina foram caracterizados nos tripanossomas de mamíferos: *T. brucei*, *T.b. rhodesiense*, *T. congolense*, *T. rangeli* e *T. theileri*, e no tripanossoma de peixe *T. carassii*. Estudos recentes revelaram variantes de congopaina, a principal CATL-like de *T. congolense* (Mendoza-Palomares et al., 2008; Pillay et al., 2010) e polimorfismo de CATL entre genótipos de *T. vivax* (Cortez et al., 2009) e de *T. theileri* (Rodrigues et al., 2010b; Garcia et al., 2011).

Genes de bodonídeos, *Cryptobia salmositica* e *Trypanoplasma borreli*, também foram analisados filogeneticamente (Jesudhasan et al., 2007; Ruzsczyk et al., 2008a,b; Cortez et al., 2009; Rodrigues et al., 2010b).

Apesar de múltiplas cópias, as filogenias inferidas têm gerado clados que refletem a filogenia das espécies de tripanossomas inferidas com base em seqüências de SSU rRNA e gGAPDH, sugerindo que esses genes evoluem em concerto e, assim, são bons marcadores para estudos evolutivos (Jackson, 2007).

A presença de múltiplas cópias de genes de CATL-like nos genomas dos tripanossomas, a facilidade de amplificação por PCR, e o polimorfismo entre genes de diferentes espécies fazem desses genes alvos interessantes para o desenvolvimento de métodos diagnósticos espécie-específicos (Tanaka, 1997; Cortez et al., 2009; Rodrigues et al., 2010b)

## 4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos durante o trabalho desenvolvido para essa tese estão resumidamente apresentados e discutidos abaixo. Optamos por apresentar apenas resultados já publicados, ou em fase de publicação, que constituem os artigos e manuscritos anexados no final da tese e listados abaixo.

### 4.1. Tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* de morcegos brasileiros e africanos (Moçambique)

4.1.1 Padrões filogeográficos, ecológicos e biológicos demonstrados por genes nucleares (ssrRNA e gGAPDH) e mitocondriais (Cyt b) de tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* parasitas de morcegos brasileiros

#### **Anexo 1. 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**

Manzeli Cavazzana Jr., Arlei Marcili, Luciana Lima, Flávia Maia da Silva, Ângela C.V. Junqueira, Heloisa H. Veludo, Laerte B. Viola, Marta Campaner, Vânia L.B. Nunes, Fernando Paiva, José R. Coura, Erney P. Camargo, Marta M.G. Teixeira.

*International Journal for Parasitology*, 2010; 40(3):345-55.

A ordem Chiroptera é composta por diversas famílias de morcegos com diferentes hábitos alimentares e ecótopos encontrados em todos os continentes, exceto na Antártida. Esses mamíferos albergam tripanossomas das Secções Stercoraria (subgêneros *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* e *Herpetosoma*) e Salivaria (*Trypanozoon*). Uma espécie de tripanossoma pode infectar mais de uma espécie de morcego, assim como são comuns morcegos com infecções mistas com duas ou mais espécies, inclusive espécies de diferentes subgêneros. Os morcegos insetívoros são os mais frequentemente infectados e as espécies mais prevalentes pertencem aos subgêneros *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*.

A diversidade genética e os padrões filogeográficos e biogeográficos das espécies de tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum*, que infectam morcegos brasileiros foram avaliados com o exame de amostras de sangue de 1043 morcegos, 63 espécies de sete famílias, capturados em quatro biomas brasileiros: Amazônia, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica. A prevalência dos tripanossomas que infectam morcegos foi estimada por hemocultura (12,9%) e resultou em 77 culturas. A maioria das culturas foi morfológicamente caracterizada como *T. cruzi*-like e identificadas por marcadores moleculares como *T. cruzi* (14), *T. c. marinkellei* (37) e *T. dionisii*-like (25). Análises filogenéticas baseadas na região

V7-V8 do gene SSU rRNA, gGAPDH e citocromo b demonstraram que os isolados obtidos formam um grupo monofilético que compreende apenas espécies do subgênero *Schizotrypanum*. Os isolados desse subgênero foram segregados em três clados correspondentes as três espécies de tripanossomas identificadas nos morcegos.

As diferentes espécies de tripanossomas puderam ser associadas com distintos padrões biogeográficos e filogeográficos. Morcegos de hábitos alimentares e ecótopos distintos foram encontrados infectados pela mesma espécie de tripanossoma. *T. dionisii*-like (32.4%) foi encontrado em 12 espécies pertencentes a quatro famílias de morcegos capturadas em todos os biomas estudados, de Norte a Sul do Brasil e ficaram agrupados com dois isolados de *T. dionisii* da Europa, apesar de separados por uma pequena distância genética. *T. c. marinkellei* (49.3%) foi encontrado apenas em morcegos da família Phyllostomidae, que apresentam diferentes hábitos alimentares, todos capturados da Amazônia ao Pantanal. Em menor prevalência (18.2%), os isolados de *T. cruzi* são provenientes de morcegos da família Vespertilionidae e Phyllostomidae capturados no Pantanal/Cerrado, Mata Atlântica e com poucos isolados da Amazônia.

**4.1.2** Identificação de um novo genótipo de *Trypanosoma cruzi* associado à morcegos e caracterizado através de análises filogenéticas dos genes SSU rRNA, citocromo b, Histona H2B e genotipagem baseada em ITS1 rDNA

**Anexo 2. 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**

Marcili A., Lima L., Cavazzana M. Jr., Junqueira A.C.V., Veludo H.H., Maia da Silva F., Campaner M., Paiva F., Nunes V.L.B., Teixeira M.M.G.

*Parasitology*, 2009; 136(6):641-55.

*T. cruzi* é a única espécie do subgênero *Schizotrypanum* capaz de infectar espécies de praticamente todas as ordens de mamíferos, inclusive o homem, as demais espécies pertencentes a este subgênero parasitam exclusivamente morcegos. O ciclo silvestre do *T. cruzi* ainda é pouco estudado e apenas recentemente passou a ser alvo de estudos abrangendo diversas espécies de mamíferos e vetores silvestres. Pouco se sabe sobre a diversidade biológica e genética, e as consequências das infecções causadas por *T. cruzi* em morcegos. Neste trabalho foram caracterizados 15 isolados de *T. cruzi* de morcegos capturados nas regiões Norte, Central e Sudeste do Brasil. Relações filogenéticas entre os isolados de *T. cruzi* inferidas com sequências dos genes SSU rRNA, citocromo b e Histona

H2B posicionaram todos os isolados da Amazônia na linhagem *T. cruzi* I (TcI). Entretanto, isolados das outras regiões, genotipados como *T. cruzi* II com a utilização de marcadores tradicionais baseados nos genes ribossômico e de mini-exon, não foram agrupados com nenhuma linhagem de *T. cruzi*, e se posicionaram como um novo genótipo diferente de todos os estabelecidos até o momento para *T. cruzi*. Esses isolados formaram um novo genótipo que foi provisoriamente denominado TCbat até que sejam estabelecidos os critérios para descrição de novas linhagens (DTUs). Análises filogenéticas confirmaram que TCbat está posicionado no clado que contém todos os isolados de *T. cruzi*, que se apresenta sempre separado das espécies altamente relacionadas filogeneticamente e exclusivas de morcegos do subgênero *Schizotrypanum*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*.

Nesse trabalho, foi padronizado um método de genotipagem baseado no polimorfismo de gene ITS1 rDNA capaz de distinguir TCbat dos outros genótipos de *T. cruzi*, assim como de outras espécies do subgênero *Schizotrypanum*. Em infecções experimentais em camundongos, TCbat apresentou baixas parasitemia e virulência. Os isolados do genótipo TCbat apresentaram características morfológicas e comportamento em triatomíneos distintos dos demais genótipos de *T. cruzi*. TCbat compreende somente isolados de morcegos capturados em ambientes antrópicos das regiões Central e Sudeste do Brasil. Os resultados desse trabalho comprovam que a complexidade de *T. cruzi* é maior do que a que conhecemos e confirmam que os morcegos são importantes reservatórios e uma potencial fonte de infecção por *T. cruzi* para o homem.

## **4.2. *Trypanosoma rangeli* em morcegos brasileiros**

4.2.1 *Trypanosoma rangeli* em morcegos da região central do Brasil: genotipagem e análises filogenéticas baseadas em sequências do gene de mini-exon revelaram uma nova linhagem

### **Anexo 4. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences**

Maia da Silva F., Marcili A., Lima L., Cavazzana M., Ortiz P.A., Campaner M., Takeda G.F., Paiva F., Nunes V.L., Camargo E.P., Teixeira M.M.G.

*Acta Tropica* 2009; 109(3):199-207.

*Trypanosoma rangeli* é uma espécie de tripanossoma americano infectante para diversas ordens de mamíferos, inclusive o homem. Porém, apesar de alguns relatos, essa

espécie nunca foi comprovada em morcegos, embora morcegos de diferentes espécies sejam comumente encontrados parasitados por várias espécies de tripanossomas. Neste trabalho foram caracterizados tripanossomas de morcegos capturados na região central do Brasil (Mato Grosso do Sul), classificados como *T. rangeli*, *T. dionisii*, *T. cruzi marinkellei* e *T. cruzi*. Apenas dois isolados; Tra643 de *Platyrrhinus lineatus* e Tra1719 de *Artibeus planirostris* foram identificados como *T. rangeli* por parâmetros morfológicos, biológicos e moleculares, e confirmados nessa espécie por análises filogenéticas com diversas espécies de tripanossomas.

Análises filogenéticas baseadas em sequências do gene ribossômico (SSU rDNA) agruparam os dois isolados de morcegos no mesmo clado de isolados de *T. rangeli* de outros mamíferos silvestres, humanos e triatomíneos. Esses isolados de *T. rangeli* formaram um clado separado dos demais tripanossomas de morcegos (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*) capturados na mesma região. Genotipagem baseada no polimorfismo de tamanho e de sequência do gene de mini-exon demonstrou que o isolado Tra1719 pertence à linhagem A de *T. rangeli*. Por outro lado, Tra643 não se posicionou em nenhuma das linhagens (A-D) previamente descritas para *T. rangeli*, portanto, pertence a um novo genótipo que nós denominamos linhagem E. Os dois isolados de *T. rangeli* deste estudo são os primeiros isolados de morcegos do Brasil Central caracterizados molecularmente. Os vetores de *T. rangeli* nessa região são desconhecidos. Entretanto nesse estudo, foram coletados na região de onde foram capturados os morcegos, triatomíneos da espécie *Rhodnius stali* que se revelaram infectados com *T. rangeli* e *T. cruzi*. Estes dados contribuem para o melhor entendimento dos isolados de *T. rangeli* e compreensão da alta complexidade que as populações dessa espécie apresentam e que podem ser melhor esclarecidas com a busca de novos isolados de hospedeiros mamíferos e espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius* de diferentes origens geográficas.

#### **4.4. Genes codificadores de enzimas CatpesinaL-like: caracterização, genealogia e utilização como marcadores taxonômicos e filogenéticos**

4.4.1. Genes de proteases como catepsina L-like em isolados de *Trypanosoma rangeli*: marcadores para diagnóstico, genotipagem e inferências filogenéticas

#### **Anexo 6. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: Markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships**

P.A. Ortiz, F. Maia da Silva, A.P. Cortez, L. Lima, M. Campaner, E.M.F. Pral, S.C. Alfieri, M.M.G. Teixeira

*Acta Tropica*, 2009; 112(3):249-59.

Nesse trabalho, foram sequenciados genes que codificam enzimas cisteíno-proteases do tipo catepsina L-like (CATL-like) de isolados de *T. rangeli* do homem, de mamíferos silvestres e diversas espécies de triatomídeos do gênero *Rhodnius*. Foram comparadas sequências de isolados da América Central e do Sul.

Análises filogenéticas de sequências codificadoras do domínio catalítico de CATL de *T. rangeli* e genes homólogos de outros tripanossomas, espécies de *Leishmania* e bodonídeos posicionaram as sequências de *T. rangeli* (rangeliapaína) mais próximas da cruzipaína, CATL majoritária de *T. cruzi*.

Análises filogenéticas com sequências do domínio catalítico de CATL de 17 isolados representantes da diversidade filogenética e distribuição de *T. rangeli*, confirmaram as 5 linhagens (A-E) previamente definidas com os genes de mini-exon e ribossômico. A comparação da atividade proteolítica de isolados de *T. rangeli* em gel de gelatina, revelou diferentes perfis de bandas de cisteíno-proteases entre as linhagens de *T. rangeli* e entre isolados de uma mesma linhagem.

Sequências de CATL se mostraram excelentes como alvos para o diagnóstico e genotipagem de *T. rangeli* por PCR. Os dados de genes que codificam CATL-like concordam com os resultados de estudos anteriores com marcadores de kDNA, e os genes de mini-exon e ribossômicos. Os resultados corroboram a evolução clonal, ciclos de transmissão independentes e a divergência das linhagens de *T. rangeli* associados às espécies simpátricas de *Rhodnius*.

A topologia da árvore filogenética baseada em sequências do gene CATL apresentou total congruência com as topologias das árvores geradas pelos genes de SSU rDNA e gGAPDH para os tripanossomatídeos analisados. Portanto, esse trabalho demonstrou que esses genes podem ser utilizados como alvos para diagnóstico, taxonomia e estudos filogenéticos de espécies de tripanossomas, inclusive na genotipagem de isolados de uma mesma espécie.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Adams ER, Hamilton PB, Rodrigues AC, Malele II, Delespaux V, Teixeira MM, Gibson W. New *Trypanosoma (Duttonella) vivax* genotypes from tsetse flies in East Africa. *Parasitol.* 2010;137(4):641-50.
- Adams ER, Hamilton PB, Malele II, Gibson WC. The identification, diversity and prevalence of trypanosomes in field caught tsetse in Tanzania using ITS-1 primers and fluorescent fragment length barcoding. *Infect Genet Evol.* 2008;8(4):439-44.
- Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell.* 1990;61(7):1157-60.
- Anciaux de Faveaux M. Les parasites des chiroptères. Rôle épidémiologique chez les animaux et l'homme au Katanga. *Annal Parasitol Hum Comp.* 1965;40:21-37.
- Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII--Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79(2):249-55.
- Aparicio IM, Scharfstein J, Lima AP. A new cruzipain dependent pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requiring trypomastigote membranes. *Infect Immun.* 2004;72:5892-902.
- Averis S, Thompson RC, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Smith A. The diversity, distribution and host-parasite associations of trypanosomes in Western Australian wildlife. *Parasitol.* 2009;136(11):1269-79.
- Baker JR, Miles MA. *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* breve, new subspecies from Chiroptera. *Syst Parasitol.* 1979;1:61-5.
- Baker JR, Green SM, Chaloner LA, Gaborak M. Intracellular growth in vitro of *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* of bats and preliminary work on cell-mediated immunity using this system. *Trans. R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66:340-1.
- Baker JR, Liston AJ. *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii*: effect of various agents on attachment and entry to macrophages in vitro and on morphogenesis. *J Gen Microbiol.* 1978;104(1):79-89.
- Baker JR. Bat trypanosome models for *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1985;1:111-3.
- Bandyopadhyay S, Ray R, Dasgupta B. A new species of *Trypanosoma* from an Indian insectivorous bat, *Rhinopoma hardwickei* Gray. *Acta Protozool.* 1980;21:189-195.
- Baptista CS, Vêncio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, Pereira CA, Galvão LM, Gontijo ED, Chiari E, Sturm NR, Zingales B. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;150(2):236-48.
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol.* 2003;2(3):201-8.
- Barreto MP, Ribeiro RD, Filho FF. Wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LVII=Natural infection of *Phyllostomus hastatus hastatus* (Tallas, 1767) by *T. cruzi*. *Rev Bras Biol.* 1974;34(4):615-22.

---

<sup>1</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Barretto MP. Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*". XXI: observations on the association between reservoirs and vectors, with special reference to the northeast region of the state of São Paulo. *Rev Bras Biol.* 1968;28:481-94.
- Barreto-Bergter E, Branquinha MH, Pohlentz G, Vermelho AB. Monohexosylceramides of *Trypanosoma dionisii*. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43:486-8.
- Bower SM, Woo PT. Immunological comparison of four *Trypanosoma* spp. (sub-genus *Schizotrypanum*) from bats. *Parasitol.* 1982;85:111-4.
- Bower S, Woo PTK. An *in vitro* comparison of *Trypanosoma* spp. (subgenus *Schizotrypanum*) from bats. *Syst Parasit.* 1981;3:217-235.
- Branquinha MH, Vermelho AB, Almeida IC, Mehlert A, Ferguson MA. Structural studies on the polar glycoinositol phospholipids of *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* from bats. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;102:179-89.
- Bray RS. A check-list of the parasitic Protozoa of West Africa, with some notes on their classification. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique, Noire, Serie A.* 1964;26:278-315.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2003;2(3):173-83.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001;31:1218-26.
- Busse I, Preisfeld A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53:617-24.
- Busse I, Preisfeld A. Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene.* 2002;284:83-91.
- Camargo EP. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasit.* 1998;42:29-112.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964;6:93-100.
- Caffrey CR, Steverding D. Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;167(1):12-9.
- Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol Today.* 2000;16(2):78-82.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* 2003;5(13):1231-40.
- Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.* 2001;7:1143-56.
- Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, Paiva F, Teixeira MM. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes.* 2009;23(1):44-51.

Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Anez N, et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitol.* 2006;133(Pt 2):159-69.

Cottontail VM, Wellinghausen N, Kalko EK. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panamá. *Parasitol.* 2009;136(10):1133-45.

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:278-9.

Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:877-80.

Cui J, Han N, Streicker D, Li G, Tang X, Shi Z, Hu Z, Zhao G, Fontanet A, Guan Y, Wang L, Jones G, Field HE, Daszak P, Zhang S. Evolutionary relationships between bat coronaviruses and their hosts. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13, 1526-1532.

D'Alessandro A, Saraiva NG. *Trypanosoma rangeli*. In: (GILLES, HM ed) "Protozoal diseases" London; Arnold. 1999:p.398-412.

D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LM. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1718-25.

Dacks JB, Kuru T, Liapounova NA, Gedamu I. Phylogenetic and primary sequence characterization of cathepsin B cysteine proteases from the oxymonad flagellate *Monocercomonoides*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2008;55(1):9-17.

Deane LM, Sargeant SC, Fernandez E. Hallazgo de *Trypanosoma (Megatrypanum) pessoai*. Deane, Sugay, 1963, em murcielagos de Venezuela. *Boletin de la Direccion de Malariologia y Saneamiento Ambiental* 1978; 18: 231-237.

Deane LM, Sugay W. *Trypanosoma pessoai* n.sp., in vampire bats *Desmodus rotundus rotundus* from the state of São Paulo, Brazil *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1963; 5:165.

Deane LM. Tripanosomídeos de mamíferos da região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1961;3:15.

Desquesnes M, Mclaughlin G, Zoungrana A, Dávila AMR. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol.* 2001;31:610-4.

Dias E, Melo GB, Costa O, Damasceno R, Azevedo M. Investigações sobre esquizotripanose de morcegos no estado do Pará. Encontro do barbeiro *Cavernicola pilosa* como transmissor. *Rev Brasil Biol.* 1942;2:103.

Dias E, Pifano F. Estudo Experimental de um *Schizotrypanum* do morcego *Hemiderma perpicillatum* da Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 1941;36:79-98.

Dias E. Revisão geral dos hemoflagelados de Chiropteros. Estudo experimental do *Schizotrypanum* de *Phyllostomus hastatus*: identidade com *Schizotrypanum cruzi*. O grupo *Vespertilionis* IX. *Reun Soc Argentina Patol region.* (Mendoza), 1935, 10.

Duschak VG, Barboza M, García GA, Lammel EM, Couto AS, Isola EL. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitol.* 2006;132(Pt 3):345-55.

Ebert F. Comparison of isoenzymes of some species of the subgenus *Schizotrypanum* from bats by isoelectrofocusing. Tropenmed Parasitol. 1983;34:93-7.

Eick GN, Jacobs DS, Matthee CA. A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). Mol Biol Evol. 2005;22:1869-86.

Eisenberg, Redford Mammals of the Neotropics, Volume 3 John Eisenberg & Kent Redford University of Chicago Press, 1999

Edrissian GH, Farhang-Azad A, Neronov VM. Trypanosomes of small mammals in Iran. J Wildl Dis. 1976;12(4):497.

Esquivel R, Zuniga JA, Alfaro M, Kotcher E. Trypanosomes of Costa Rican feral mammals. J Parasitol. 1967; 53:951-5.

Ewers WH. *Trypanosoma aunawa* sp. n. from an insectivorous bat, *Miniopterus tristis*, in New Guinea, which may be transmitted by a leech. J Parasitol. 1974;60:172-8.

Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop. 2009;110(1):15-21.

Fernandes O, Degraeve W, Campbell DA. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. Parasitology. 1993;107:219-24.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitol. 1999;118:161-6.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol. 1994;66(2):261-71.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(1):97-9.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraeve W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 1998b;58(6):807-11.

Fernandes O, Teixeira MM, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, Campbell DA. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. J Eukaryot Microbiol. 1997;44(6):535-539.

Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitol. 2007;134:1623-38.

Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MMG. A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia. J Eukaryot Microbiol. 2008;55: 427-35.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves, VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo CR, Pena SDJ. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Plos Path. 2006;2(3):e24.

Funayama GK, Barretto MP. Estudos sobre reservatório e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII. Infecção natural de morcego, *Desmodus rotundus rotundus* (Geoffroy, 1810) pelo *T. cruzi*. Rev Bras Biol. 1970a; 30:13-19.

Funayama GK, Barretto MP. Reservatório e vetores de *Trypanosoma cruzi*. XLI. Infecção natural de morcego *Tadarida laticaudata* (Geoffroy, 1805) por *T. cruzi*. Rev Bras Biol. 1970b; 30:439-45.

Funayama GK, Barreto MP. Studies of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LIV. Natural bat infection, *Epitesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) by *T. cruzi*. Rev Bras Biol. 1973;33:439-44.

Garcia H A, Kamyngkird K, Rodrigues AC, Jittapalapong S, Teixeira MMG, Desquesnes M (2011). 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. *In Press*,

Gardner RA, Molyneux DH. *Schizotrypanum* in British bats. Parasitol. 1988;97:43-50.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(4):557-65.

Gibson W, Pilkington JG, Pemberton JM. *Trypanosoma melophagium* from the sheep ked *Melophagus ovinus* on the island of St Kilda. Parasitol. 2010;137(12):1799-804.

Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcripts. Mol Biochem Parasitol. 2000;107:269-77.

Glauert AM, Baker JR, Selden LF. Mechanism of entry and development of *Trypanosoma dionisii* in non-phagocytic cells. J Cell Sci. 1982;56:371-87.

Godoi MM, Serrano MG, Teixeira MM, Camargo EP. A PCR-based survey on *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in phytophagous hemipterans of the Amazon region. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(4):275-9.

Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitol. 1999;118(4):375-82.

Grisard EC, Sturm NR, Campbell DA. A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterrensis* sp. n., isolated from South American bats. Parasitol. 2003;127:265-71.

Guan G, Niu Q, Yang J, Li Y, Gao J, Luo J, Yin H. *Trypanosoma (Herpetosoma) grosi*: first isolation from Chinese striped field mouse (*Apodemus agrarius*). Parasitol Int. 2011;60(1):101-4.

Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98:435-42.

Haag J, O'h Uigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. Mol Bioch Parasitol. 1998;91:37-49.

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. 2009;9(1):81-6.

- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2007;44(1):15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol*. 2005a;35(4):431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Cooke B, Boag B, Holz P, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol Ecology*. 2005b;14(10):3167-76
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson CW. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small ribosomal RNA. *Int J Parasitol*. 2004;34:1393-1404.
- Hampel V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AG, Roger AJ. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(10):3859-64.
- Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, Allert S, Opperdoes FR, Michels PA. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;55(1-2):115-26
- Heisch RB, Garnham PCC. Fortuitous xeno-diagnosis of bat trypanosomiasis. *Nature*. 1953; 172:248.
- Hernández R, Rios P, Valdés AM, Piñero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;41(2):207-12.
- Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, Bargues MD. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res*. 2009. pii: 897364.
- Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourão GM, Jansen AM. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(11):1133-9.
- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2007;7:535-39.
- Herrera HM, Davila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, Jansen AM. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol*. 2004; 10:263-75
- Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool*. 1964;11(2):200-7.
- Hoare CA. Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. *Acta Trop*. 1965;22:204-16.
- Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Part 2 Systematic. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972. p. 123-625.
- Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997;89(2):295-9.

Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol.* 2003;20(4):644-52.

Hury A, Goldshmidt H, Tkacz ID, Michaeli S. Trypanosome spliced-leader-associated RNA (SLA1) localization and implications for spliced-leader RNA biogenesis. *Eukaryot Cell.* 2009;8(1):56-68.

Jackson AP. Tandem gene arrays in *Trypanosoma brucei*: comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. *BMC Evol Biol* 2007;47-54.

Jesudhasan PR, Tan CW, Hontzeas N; Woo PT. A cathepsin L-like cysteine proteinase gene from the protozoan parasite, *Cryptobia salmositica*. *Parasitol. Res.* 2007;100(4):881-6.

Jittapalapong S, Inpankaew T, Sarataphan N, Herbreteau V, Hugot JP, Morand S, Stich RW. Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand. *Infect Genet Evol.* 2008;8(4):445-9.

Jones KE, Purvis A, MacLarnon A, Bininda-Emonds OR, Simmons NB. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera). *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2002;77(2):223-59.

Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution.* 2005;20(12):670-6.

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

Keymer, IF. Blood Protozoa of insectivores, bats and primates. *Journal of Zoology(London)*, 1971; 163:421-41.

Kuru T, Jirata D, Genetu A, Barr S, Mengistu Y, Aseffa A, Gedamu L. *Leishmania aethiopica*: identification and characterization of cathepsin L-like cysteine protease genes. *Exp. Parasitol.* 2007; 115(3):283-90.

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

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.* 2011 in press

Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int J Parasitol.* 2009;39(12):1305-17.

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

Liao, GY. Biology of a new trypanosome: *Trypanosoma (Megatrypanum) scotophila* sp nov from the bat, *Scotophilus heathi*. *Horsfield. In Malaria and Other Protozoal Infections* (ed. J B Jiang).1982:45-7.

Lips M, Rodhain J. Quelques hématozoaires de petits mammifères du Haut-Katanga. *Ann Parasitol.* 1956;31:481.

Lisboa CV, Mangia RH, Rubião E, de Lima NR, das Chagas Xavier SC, Picinatti A, Ferreira LF, Fernandes O, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2004;90(1):97-106.

Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski A Jr, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology.* 2006;133(Pt 5):603-11.

Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;156(3-4):314-8.

Lisboa CV, Xavier SC, Herrera HM, Jansen AM. The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: Dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Vet Parasitol.* 2009;165(1-2):19-24.

Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, Vargas J, Torrico F, Miles MA, Gaunt MW. *Trypanosoma cruzi* Ilc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009a;3(9):e510.

Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, Torrico F, Diosque P, Valente V, Valente SA, Gaunt MW. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009b May;5(5):e1000410.

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

Lukes J, Jirků M, Dolezel D, Kral'ová I, Hollar L, Maslov DA. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *J Mol Evol.* 1997 May;44(5):521-7.

Lun ZR, Lai DH, Li FJ, Lukes J, Ayala FJ. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. *Trends Parasitol.* 2010;26(9):424-7.

Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:7396-401.

Maia da Silva F, Marcili A, Ortiz PA, Epiphany S, Campaner M, Catão-Dias JL, Shaw JJ, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. *Infect Genet Evol.* 2010;10(4):522-9.

Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D'Afonseca Neto JA, Naiff MF, Franco AM, Campaner M, Valente V, Valente SA, Camargo EP, Teixeira MM, Miles MA. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop.* 2008;107(2):168-73

Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MM. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol.* 2007;16(16):3361-73.

Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Añez N. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitol.* 2004b;129(5):549-61.



Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CSA, Brigido MC, Junqueira ACV, Coura JR, Takefa GF, Shaw JJ, Teixeira MMG. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitol.* 2004a;128:283-94.

Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MM. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009a;39(5):615-23.

Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, Souza AI, da Rosa JA, Campaner M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Teixeira MM. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 2009b;9(6):1265-74.

Marinkelle CJ. *Trypanosoma (Megatrypanum) megachiropterum* sp. n. from the flying fox, *Pteropus tonganus*, Quoy, Gaimard. *J Protozool.* 1979; 26:352- 353.

Marinkelle CJ. Observation on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. *Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg.* 1966;60:109-16.

Marinkelle CJ. The Biology of the Trypanosomes of Non-Human Primates. In: Lumsden WHR, Evans DA. *Biology of the kinetoplastida.* London: Academic Press.1976. p. 218-48.

Marinkelle CJ. *Trypanosoma (Herpetosoma) longiflagellum* sp.n. from the tomb rat, *Taphozous nudiventris*, from Iraq. *J Wildl Dis.* 1977;13:262-4.

Marinkelle CJ. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. *Rev Biol Trop.* 1982a;30:107-11.

Marinkelle CJ. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *Ann Trop Med Parasitol.* 1982b Apr;76(2):125-34.

Marinkelle CJ, Duarte CA. *Trypanosoma pifanoi* n. sp. from Colombian bats. *J Protozool.* 1968;15:621-7.

Martins LP, Marcili A, Castanho RE, Therezo AL, de Oliveira JC, Suzuki RB, Teixeira MM, da Rosa JA, Sperança MA. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(3):427-34.

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

Maslov DM, 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 Parasit.* 1996;75:197-202.

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

McInnes LM, Gillett A, Ryan UM, Austen J, Campbell RS, Hanger J, Reid SA. *Trypanosoma irwini* n. sp (Sarcostigophora: Trypanosomatidae) from the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitol.* 2009;136(8):875-85.

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

- McKenna, M.C. & Bell, S.K. 1997. Classification of Mammals Above the Species Level. Columbia University Press, New York.: i-xii, 1-631.
- McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104 Suppl 1,263-269.
- McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. Annu Rev Pathol 2006;1:497-536.
- Mendonça MBA, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, Naiff RD, Barrett TV, Coura JR, Zingales B, Fernandes O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. Parasitology. 2002;124:177-84.
- Mendoza-Palomares, C.; Biteau, N.; Giroud, C.; Coustou, V.; Coetzer, T.; Authié, E.; Boulangé, A.; Baltz, T. Molecular and biochemical characterization of a cathepsin B-like protease family unique to *Trypanosoma congolense*. Eukaryot. Cell. 2008;7:684-97.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov A, Alexandrov K, Podlipaev S, Maslov D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. J Eukaryot Microbiol. 2001;48(2):161-9.
- Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: (Hochchka, HN, Mommsen, GT): Biochemistry and molecular biology of fishes. 1993. vol. 2.
- Michels PA, Poliszczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, Wierenga RK, Borst P, Opperdoes FR. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 1986;5(5):1049-56.
- Miles MA, Arias JR, Valente SA, Naiff RD, de Souza AA, Pova MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32(6):1251-9.
- Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet. 1981b;1(8234):1338-40
- Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature. 1978; 272(5656):819-21.
- Miles MA, Pova MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981a;75(5):667-74.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology. 2009;136(12):1509-28.
- Miltgen F, Landau I. *Trypanosoma (Megatrypanum) lizae* n. sp.: a trypanosome with giant forms from the Microchiroptera *Hipposideros cyclops*, in Gabon. Ann Parasitol Hum Comp. 1979; 54:163-9.
- Mkwananzi JB, Franks D, Baker JR. Cytotoxicity of antibody-coated trypanosomes by normal human lymphoid cells. Nature. 1976; 259:403-4.
- Molyneux DH. Parasitic Protozoa. 2nd ed. London: Academic Press; 1991. p. 195-223: Trypanosomes of bats.

Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1861-75.

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*. 2007;44(1):255-66.

Nascentes GA, Meira WS, Lages-Silva E, Ramírez LE. Absence of experimental cross-protection induced by a *Trypanosoma cruzi*-like strain isolated from bats. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Mar-Apr;41(2):152-7.

Nascentes GA, Meira WS, Lages-Silva E, Ramírez LE. Immunization of mice with a *Trypanosoma cruzi*-like strain isolated from a bat: predictive factors for involvement of eosinophiles in tissue damage. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(10):989-97.

Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. GeneDOC: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News*. 1997;4:14.

Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Dávila AM. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res*. 2005;95(3):186-92.

Nowak MR. *Walker's Mammals of the World*. 5th ed. The Johns Hopkins Press Ltd, London. 1991:642

O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Douzery EJ, Brenière SF. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol*. 2007;7(5):587-93.

Oliveira MP, Cortez M, Maeda FY, Fernandes MC, Haapalainen EF, Yoshida N, Mortara RA. Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: invasion, intracellular growth, and nuclear localization. *Acta Trop*. 2009;110(1):65-74.

Pena SD, Machado CR, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:108-14.

Peterson WB, Woo PTK. The development of the culture and bloodstream forms of three *Trypanosoma* ssp (Protista:Zoomastigophorea) from bats in *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Canadian of Zool* 1984;62: 1581-1587.

Petry K, Baltz T, Schottelius J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* and *T. vespertilionis* by monoclonal antibodies. *Acta Trop*. 1986;4:5-13.

Petry K, Voisin P, Baltz T. Complex lipids as common antigens to *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis* and nervous tissue (astrocytes, neurons). *Acta Trop*. 1987;44:381-6.

Pettigrew JD. Flying primates? Megabats have the advanced pathway from eye to midbrain. *Science*. 1986;231(4743):1304-6.

Pillay D, Boulangé AF, Coetzer TH (2010) Expression, purification and characterisation of two variant cysteine peptidases from *Trypanosoma congolense* with active site substitutions. *Protein Expr Purif* 74: 264-271.

Piontkivska H, Hughes AL. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;144(1):94-9.

Poinar G Jr, Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*. 2004;155(3):305-10.

Poinar G Jr. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasit Vectors*. 2008;15;1(1):22.

Reichenow E. Ostafrikanische Beobachtungen na Trypanosomiden. *Arch Protistenk*. 1940;94:267.

Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly S.M, Wong E, Xu W, Stack CM, Padula, M.; Herbert B, Dalton JP. Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Mol. Cell. Proteomics*. 2008;7:1111-23.

Rodhain J. *Trypanosoma leleupi* n. sp., parasite of *Hipposideros caffer* in Katanga. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1951;26(3):133-7.

Rodhain J. Trypanosome d'un Chéoptère insetivore *Nycteris hispida* Schreber au Congo Belge. *Bull. Soc Path Er*. 1923;16:659.

Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Dell' Porto A, Milder RV, Takeda GF, Texeira MMG. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet Parasitol*. 2003;116(3):185-207.

Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006;132:215-24.

Rodrigues AC, Neves L, Garcia HA, Viola LB, Marcili A, Da Silva FM, Sigauque I, Batista JS, Paiva F, Teixeira MM. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. *Parasitology*. 2008;135(11):1317-28.

Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Góes-Cavalcante G, Maia da Silva F, Ferreira RC, Campaner M, Paiva F, Teixeira MM. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*. 2010a;137(1):111-22.

Rodrigues AC, Garcia HA, Ortiz PA, Cortez AP, Martinkovic F, Paiva F, Batista JS, Minervino AH, Campaner M, Pral EM, Alfieri SC, Teixeira MM. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitol Int*. 2010b;59(3):318-25.

Roger AJ, Simpson AG. Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree. *Curr Biol*. 2009;19(4):R165-167.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003

Ruszczuk A, Forlenza M, Joerink M, Ribeiro CM, Jurecka P, Wiegertjes GF. *Trypanoplasma borreli* cysteine proteinase activities support a conservation of function with respect to digestion of host proteins in common carp. *Dev Comp Immunol*. 2008a;32(11):1348-61.

- Ruszczuk A, Forlenza M, Savelkoul HF, Wiegertjes GF. Molecular cloning and functional characterisation of a cathepsin L-like proteinase from the fish kinetoplastid parasite *Trypanosoma carassii*. *Fish Shellfish Immunol.* 2008b;24(2):205-14.
- 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.* 1997;85(1):63-76.
- Santos AL, Souto-Padron T, Alviano CS, Lopes AH, Soares RM, Meyer-Fernandes JR. Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpeessoai*. *Arch Biochem Biophys.* 2002;405:191-8.
- Sato H, Al-Adhami BH, Une Y, Kamiya H. *Trypanosoma (Herpetosoma) kuseli* sp. n. (Protozoa: Kinetoplastida) in Siberian flying squirrels (*Pteromys volans*). *Parasitol Res.* 2007;101(2):453-61
- Schottelius J, Uhlenbruck G. Comparative studies of *Trypanosoma cruzi* and *T.cruzi*-like stocks from different South American countries using lectins. *Z Parasitenkd.* 1983;69(6):727-36.
- Sergent ED, Sergent ET. Sur des trypanosomes des chauves souris. *C R Soc Biol.* 1905;58:53.
- Serin MS, Waki K, Chang KP, Aslan G, Direkel S, Otag F, Kayar B, Koksall F, Emekdas G. Consistence of minixon polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57(3):295-99.
- Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol.* 1999;91(3):268-79.
- Shamsuddin M, Mohammed MK. Observations on the large bat- trypanosomes of Iraq. *Bull Nat Hist Res Centre.* 1978;7:35-47.
- Simmons NB (2005) Evolution. An Eocene big bang for bats. *Science.* 28;307(5709):527-8.
- Simmons, N. B. and Geisler, J. H. 1998. Phylogenetic relationships of *Icronycteris*, *Archaeonycterix*, *Hassianycterix* and *Palaeochiropteryx* to extant bat lineages, with comments on the evolution of echolocating and foraging strategies in Microchiroptera. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 235, 1-182.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006;22(4):168-74.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phyl Evol.* 2004;30:201-12.
- Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol biol evol.* 2002;19(12):2071-83
- Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Thompson RC. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). *Parasitol.* 2008;135(11):1329-35.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1986;83(5):1383-87
- Souto RP, Fernandes O, Mecedo AM, Campbell D, Zingales B. DNA marker define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996;83:141-52.

- Stamatakis A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 22, 2688-2690.
- Stadelmann B, Lin LK, Kunz TH, Ruedi M. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Mol Phylogenet Evol*. 2007;43(1):32-48.
- Steindel M, Grisard EC, Carvalho Pinto CJ, Cordeiro FD, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. Characterization of trypanosomes from the Subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae) captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. *J. Parasitol*. 1998; 84:601-7.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;15(3):226-32
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*. 2001;48:1-56.
- Stevens JR, Teixeira MMG, Bingle LEH, Gibson WC. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Inter. J Parasitol*. 1999a;29:749-57.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 1999b;118:107-16.
- Sturm NR, Murthy VK, Garside L, Campbell DA. The mini-exon gene of *Trypanosoma (Nannomonas) simiae*: sequence variation between isolates and a distinguishing molecular marker. *Acta Trop*. 1998;71:199-206.
- Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, Kongkaew W, Bumrungsana K, Chanachai K, Apiwathanasorn C, Rujirojindakul P, Wattanasri S, Ungchusak K, Leelayoova S. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int J Parasitol*. 2008;38(6):617-22.
- Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(2):423-32.
- Swofford DL (2002). PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Tanaka T. Differential diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infection by PCR of cysteine proteinase genes. *Kansenshogaku Zasshi*.1997;71:903-9,
- Taylor ERA, Edwards YH, Smith V, Baker JR, Woo PTK, Lanham SM and Pennick NC. *Trypanosoma* species from insectivorous bats (Microchiropteras): Characterization by polypeptide profiles. *Syst Parasitol*. 1982;4:155-68.
- Teeling EC Chiroptera. In: S.B. Hedges and S. Kumar, Editors, *The Time Tree of Life*, Oxford University Press. 2009,499–503.
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'brien SJ, Murphy WJ A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Science*. 2005;307:580-584.
- Teeling EC, Madsen O, Van den Bussche RA, de Jong WW, Stanhope MJ, Springer MS. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(3):1431-6.

Teeling EC, Scally M, Kao DJ, Romagnoli ML, Springer MS, Stanhope MJ. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats. *Nature*. 2000;403(6766):188-92.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP (2011) 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*. (*In press*)

Teixeira MM, Serrano MG, Camargo EP. New data from old Trypanosomatid preparations. *Parasitol Today*. 2000;16(6):261-63.

Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demetree E, Séveno M, Barnabé C, Ayala FJ, Tibayrenc M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(47):20411-6.

Telleria J, Barnabé C, Hide M, Bañuls A, Tibayrenc M. Predominant clonal evolution leads to a close parity between gene expression profiles and subspecific phylogeny in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2004;137:133-41.

Thomas ME, Rasweiler IV JJ, D'Alessandro A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):559-65.

Tomas AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem*. 1997;244(2):596-603.

Tomasini N, Lauthier JJ, Monje Rumi MM, Ragone PG, Alberti D'Amato AA, Pérez Brandan C, Cura CI, Schijman AG, Barnabé C, Tibayrenc M, Basombrío MA, Falla A, Herrera C, Guhl F, Diosque P. Interest and limitations of Spliced Leader Intergenic Region sequences for analyzing *Trypanosoma cruzi* I phylogenetic diversity in the Argentinean Chaco. *Infect Genet Evol*. 2011;11(2):300-7.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25, 4876-4882.

Thorne KJ, Glauert AM, Svvennsen RJ, Franks D. Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionisii* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. *Parasitology*. 1979;79:367-79.

Thorne KJ, Oliver RC, Glauert AM. Eosinophil membrane changes during interaction with antibody-coated non-phagocytosable surfaces. *Biochem Soc Trans*. 1981;9:71.

Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003;28:2-12.

Tibayrenc M, Le Ray D. General classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and comparison with *T.(S.)c. marinkellei* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1984; 64(3):239-48.

Urrea DA, Carranza JC, Cuba CA, Gurgel-Gonçalves R, Guhl F, Schofield CJ, Triana O, Vallejo GA. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallenscens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect Genet Evol*. 2005;5(2):123-9.

Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian

Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(3):291-7.

Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* In Colombia. *infection, Genetics and Evolution.* 2003;3:39-45.

Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop.* 2009;110(2-3):137-47.

Van Den Bussche, R. A. and S. R. Hofer. Phylogenetic relationships among recent chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. *J Mammal.* 2004. 85:321-330.

Ventura RM, Paiva F, Silva RMS, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol.* 2001;99:37-8.

Ventura RM, Takata CS, Silva RA, Nunes VL, Takeda GF, Teixeira MM. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *J Parasitol.* 2000; 86:1289-98.

Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida.* New York: Academic Press; 1976. p. 1-34.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994 Dec;24(8):1317-31.

Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, Teixeira MM. 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.* 2009a;56(6):594-602.

Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MMG. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. *Parasitology.* 2009b;136:55-65.

Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, Duarte MR, Grego KF, Barrett TV, Camargo EP, Teixeira MMG. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology.* 2008;135:595-605.

Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966;18:124-93.

Wallace FG. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: (Lumsden WHR, Evans DA). *Biology of the Kinetoplastida.* Academic Press, New York; 1979:213-40.

Wallace FG, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *J Protozool.* 1983;30:308-13.

Wells EA. Subgenus *Megatrypanum*, In: Lumsden WHR, Evans DA. *Biology of the Kinetoplastida.* London: Academic Press; 1976. vol. 1. p. 257-284.

Wenyon CM. Report of travelling pathologis and protozoologisst. 3<sup>rd</sup>. Rept. Wellcome Trop. Res. Lab., Khartoum, 121 (for 1908) 1909



Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005 Oct;171(2):527-43.

Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol*. 2006;36(3):337-46.

Woo PT, Hawkins JD. Trypanosomes and experimental Trypanosomiasis in East African bats. *Acta Trop*. 1975;32:57-64.

Wright AD, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmosistica* and monophyly of genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Bioch Parasitol*. 1999;99:69-76.

Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol*. 2005;35(2):225-33

Yoon HS, Grant J, Tekle YI, Wu M, Chaon BC, Cole JC, Logsdon Jr JM, Patterson DJ, Bhattacharya D, Katz LA. Broadly sampled multigene trees of eukaryotes. *BCM Evolutionary Biology*. 2008;8:14

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

Zeledon R, Rosabal R. *Trypanosoma leonidasdeane* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. *Ann Trop Med Parasitol*. 1969; 63:221-8.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051-4.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell D, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol*. 1998;28:105-12.