

***Paola Andrea Ortiz Vargas***

**GENES DE CISTEÍNO PROTEASES DE  
*Trypanosoma* spp. DE MAMÍFEROS: POLIMORFISMO E  
RELAÇÕES FILOGENÉTICAS**

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

Área de Concentração:  
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

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

Versão original

São Paulo  
2014

## RESUMO

ORTIZ, P.A. **Genes de cisteíno-proteases de *Trypanosoma* spp. de mamíferos: polimorfismo e relações filogenéticas.** 2014. 100f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os tripanossomas constituem um grupo cosmopolita de protozoários flagelados capazes de infectar hospedeiros vertebrados de todas as classes, sendo transmitidos por diversos artrópodes hematófagos, como sanguessugas, moscas, mosquitos, hemípteros e carrapatos. Métodos de diagnóstico ou identificação de espécies, bem como técnicas de sequenciamento e análises de genes ou genomas foram aprimorados nos últimos anos e contribuíram para o descobrimento de novas espécies, linhagens e genótipos dentro do gênero *Trypanosoma* e, especialmente, dos tripanossomas de mamíferos. Este grupo de parasitas é amplamente distribuído em todos os continentes e inclui algumas espécies patogênicas para o homem, como *T. cruzi* e *T. brucei*, e para o gado, como *T. congolense*. Análises filogenéticas utilizando sequências dos genes ribossômico (*ITS* e *SSUrDNA*), *Spliced leader* (*SL*) e *gGAPDH* têm sido úteis para esclarecer grande parte da história evolutiva dos tripanossomas, suportando a organização dos tripanossomas de mamíferos em quatro clados principais: *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. theileri* e *T. lewisi*. Estudos comparativos entre diversas espécies de tripanossomas evidenciaram diferentes graus de polimorfismo genético que poderiam estar relacionados com diferentes níveis de organização (espécies, genótipos, linhagens ou DTUs) de cada clado. No entanto, marcadores moleculares tradicionais nem sempre discriminam todos os níveis de estruturação populacional, especialmente os mais discretos. Por isto, existe uma demanda crescente para o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para identificação, genotipagem e análise da estrutura populacional das centenas de espécies de tripanossomas encontradas até hoje.

Análises genômicas têm demonstrado que os tripanossomatídeos expressam cisteíno proteases (CPs) em abundância e que os genes que as codificam constituem aproximadamente 2% do conteúdo genômico total. Catepsinas L (CATL) e B (CATB) são cisteíno-proteases expressas nos tripanossomas que têm sido envolvidas em um amplo espectro de processos biológicos, tais como evasão do sistema imune do hospedeiro, degradação das proteínas do hospedeiro, diferenciação, invasão celular, patogenicidade e virulência.

Neste estudo, genes CATL foram isolados e caracterizados em diversas espécies dos Clados *T. cruzi* (*T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* e *T. dionisii*), *T. brucei* (*T. congolense*) e *T. theileri* (*Trypanosoma theileri* e espécies muito próximas, amplamente difundidas em hospedeiros bovinos). Em todos os casos, filogenias baseadas em genes CATL, SSUrRNA and *gGAPDH* foram congruentes. Sequenciamos genes CATL de 17 isolados de *T. rangeli* provenientes de humanos, mamíferos silvestres e *Rhodnius* spp. da América Central e do Sul para inferir as relações filogenéticas entre isolados de *T. rangeli* e outros tripanossomas e tripanossomatídeos. As análises posicionaram *T. rangeli* próximo de *T. cruzi* e ainda suportaram todas as linhagens de *T. rangeli* (A–D) previamente definidas a partir de genes ribossômicos e Spliced Leader, corroborando a evolução clonal, ciclos de transmissão independentes e a divergência das linhagens de *T. rangeli* associada a espécies simpátricas de *Rhodnius*. Genes CATL também se mostraram excelentes marcadores para diagnóstico e genotipagem de *T. rangeli* em diversos ensaios de PCR. Em *Trypanosoma cruzi* (agente da doença de Chagas), um complexo de isolados geneticamente diversos e filogeneticamente relacionados a espécies *T. cruzi*-like (*Trypanosoma cruzi marinkellei* e *Trypanosoma dionisii*), 80 sequências correspondentes ao domínio catalítico da cruzipaina (principal isoforma de CATL de *T. cruzi*) de 25 isolados representando todas as DTUs (Tcl-TcVI; Tcbat) e

10 sequências de genes homólogos de *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. rangeli* e *T. brucei* foram comparadas. A análise da diversidade biológica e genética de *T. cruzi* e das espécies *T. cruzi*-like evidenciou polimorfismos DTU- e espécie-específicos, corroborando os relacionamentos filogenéticos inferidos com outros genes. Em genealogias “network”, as sequências de *T. cruzi* agruparam-se firmemente, ficando mais próximas de *T. c. marinkellei* do que de *T. dionisii*, diferindo amplamente das sequências homólogas de *T. rangeli* e *T. b. brucei*. Os resultados também corroboraram a utilidade de genes *CATL* como marcadores valiosos para o desenvolvimento de drogas e vacinas e para diagnóstico e genotipagem.

Análises de genes *CATL* em tripanossomas do **Clado *T. theileri*** incluíram sequências de isolados de bois, búfalos de água, cervos e tabanídeos. Foi demonstrado que genes *CATL* de *T. theileri* estão organizados em arranjos em tandem, de ~1,7kb, posicionados em duas bandas cromossômicas diferentes que variam de 600 a 720 kb. Análises de 78 sequências de nucleotídeos correspondentes aos domínios catalíticos de 22 isolados de *T. theileri* segregaram esses isolados em pelo menos seis genótipos muito relacionados, formando o clado *T. theileri*; e também revelaram grandes divergências com outras espécies de tripanossomas. Um ensaio de PCR diagnóstico baseado nas sequências do gene *CATL* detectou todos os genótipos conhecidos de *T. theileri*. A expressão de cisteíno-proteases em isolados de *T. theileri* foi também demonstrada pela atividade proteolítica em géis de gelatina e hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-AMC. Os resultados deste trabalho foram congruentes com observações anteriores utilizando outros marcadores (ITS1 e SL) e ratificaram a utilidade de genes *CATL* para o diagnóstico, genotipagem e estudos evolutivos do Clado *T. theileri*.

Em relação às espécies do clado *T. brucei*, genes *CATL* foram analisados em *Trypanosoma congolense*, principal agente etiológico da “Nagana” na África Subsaariana, doença devastadora para as espécies de importância pecuária. *Trypanosoma congolense* é um complexo de três genótipos (Savannah, Forest e Kilifi) que diferem em virulência, patogenicidade, resistência a drogas, vetores e distribuição geográfica. Congopaina, principal isoforma de Catepsina L de *T. congolense* tem sido amplamente estudada no isolado de referência IL3000 (Savannah) e considerada importante fator patogênico e alvo para o desenvolvimento de drogas e vacinas. Neste trabalho foram comparados genes *CATL* dos três genótipos de *T. congolense* e os resultados demonstraram divergência de acordo com cada genótipo. Isolados Savannah (de laboratório e campo) exibiram um repertório de sequências *CATL* altamente polimórfico, inclusive entre clones do mesmo isolado, formando quatro grupos principais (SAV1-SAV4). Sequências que conservaram a típica tríade catalítica agruparam preferentemente em SAV1-SAV3, enquanto sequências com tríades catalíticas inusitadas agruparam em SAV4 ou fora destes grupos. Genes homólogos dos genótipos Forest e Kilifi mostraram diversidade moderada e limitada, respectivamente. Na árvore filogenética inferida a partir de genes *CATL*, isolados de *T. congolense* Savannah resolveram mais próximos do genótipo Forest do que de Kilifi, formando um grupo monofilético estreitamente relacionado com genes *CATL* de *T. simiae* e *T. godfreyi*, espécies que juntamente com *T. congolense* constituem o subgênero *Nannomonas*. Um ensaio de PCR foi desenvolvido como método de diagnóstico de *T. congolense* dos três genótipos. Nossos resultados corroboraram mais uma vez que genes *CATL* são alvos valiosos para identificação, genotipagem e análises filogenéticas de *T. congolense* e outros membros do subgênero *Nannomonas*.

Finalmente, iniciamos um estudo inédito, comparando genes *CATB* e *CATL* em todas as espécies do **Clado *T. cruzi*** (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. vespertilionis*, *T. sp. bat*, *T. sp. NanDoum1*, *T. sp. HochNdi1*, *T. sp. H25* e *T. livingstonei*). Sequências inéditas de genes *CATL* e *CATB* foram obtidas por PCR e alinhadas com sequências homólogas recuperadas de diversas bases de dados. Uma busca de genes *CATB* e análises de sintonia foram realizadas em 12 genomas de tripanossomas disponíveis. Diversas análises filogenéticas incluíram um total de 83 isolados de 17 isolados

de tripanossomas representativos de todos os genótipos de *T. cruzi* e *T. rangeli*, de outros membros do Clado *T. cruzi*, bem como tripanossomas de outros clados e tripanossomatídeos de outros gêneros. Genealogias de genes *CATB* e *CATL* foram altamente congruentes entre si e revelaram a utilidade destes genes como marcadores filogenéticos. Genes *CATB* (de cópia única) mostraram-se mais divergentes que genes *CATL* (de múltiplas cópias), resolvendo melhor as relações entre as espécies do Clado *T. cruzi*. Análises concatenadas evidenciaram relacionamentos bem resolvidos, agrupando tripanossomas da América do Sul, África e Europa próximos de *T. cruzi* e *T. rangeli*, com a formação de dois grupos separados e bem suportados, o subclado *Schizotrypanum* e o subclado *T. rangeli/T. conorhini*. Nossos resultados suportam a hipótese “*Bat seeding*” (previamente apoiada por filogenias derivadas de genes SSUrRNA e gGAPDH) para a origem de *T. cruzi* e *T. rangeli*, bem como o posicionamento desta última espécie mais próxima de *T. conorhini*, um parasita cosmopolita de ratos que por sua vez, mostrou-se muito relacionado com tripanossomas de morcegos da África e Europa e tripanossomas de primatas e carnívoros africanos. Genes *CATB* e *CATL* foram encontrados em regiões sintênicas diferentes nos genomas analisados. Genealogias de genes *CATL* e *CATB* suscitam novas perspectivas sobre a evolução de *T. cruzi* e *T. rangeli*, sugerindo que espécies dos subclados *Schizotrypanum* e *T. rangeli/T. conorhini* poderiam ter uma origem comum em tripanossomas de morcegos e ter evoluído de maneira independente para se tornar parasitas generalistas de mamíferos, incluindo o homem, nas Américas.

**Palavras-chave:** Tripanossomas de mamíferos. *Trypanosoma rangeli*. *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma theileri*. *Trypanosoma congolense*. Cisteíno-proteases. Catepsina L-like. Catepsina B-like. Polimorfismo genético. Diagnóstico molecular. Genotipagem. Filogenia.

## ABSTRACT

ORTIZ, P.A. **Cysteine protease genes of *Trypanosoma* spp. in mammals: polymorphism and phylogenetic relationships.** 2014. 100pp. Thesis (PhD in Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The genus *Trypanosoma* comprises the protozoan flagellates infecting a variety of vertebrate hosts, and transmitted by several species of hematophagous arthropods, including leeches, flies, mosquitoes, hemipterans and ticks. Diagnostic and detection methods as well as techniques for gene or genome analysis and sequencing were significantly improved in the last years, and contributed to the discovery of new species, lineages and genotypes within the genus, particularly within the group of mammalian trypanosomes. The latter, widely spread in all five continents, includes pathogenic species for humans (*T. cruzi* - *T. brucei*) and livestock (*T. congolense*). Phylogenies based on ribosomal (ITS and SSUrDNA) as well as Spliced Leader (SL) and gGAPDH gene sequences have been useful to elucidate the evolutionary history of trypanosomes, and to support the organization of mammalian trypanosomes into four major clades: ***T. cruzi***, ***T. brucei***, ***T. theileri*** and ***T. lewisi***. Comparative studies of various species showed distinct degrees of genetic polymorphism that could be related with different levels of organization (species, genotypes, strains or DTUs) within each Clade. However, traditional molecular markers not always discriminate all levels of population structure, especially the more discrete, and there is a growing demand for the development of new molecular tools for identification, genotyping and population structure analyzes of hundreds of species of trypanosomes found so far. Genomic analyses have shown that trypanosomes express cysteine proteases (CPs) in abundance, and that CPs encoding genes constitute approximately 2% of total genomic content. Cathepsins L (*CATL*) and B (*CATB*) are the cysteine proteases expressed in Trypanosomes that have been implicated in a variety of biological processes, including degradation of host proteins, evasion of the host immune response, cellular differentiation, host cell invasion, pathogenicity and virulence.

In this study, *CATL* genes were isolated and characterized in several species of the clades ***T. cruzi*** (*T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei* and *T. dionisii*), ***T. brucei*** (*T. congolense*), and ***T. theileri*** (*Trypanosoma theileri* and allied trypanosomes, widespread species in bovids). In all instances, analyzes based on *CATL*, SSUrRNA and gGAPDH genes were congruent. We have sequenced *CATL* genes from 17 isolates of *Trypanosoma rangeli* from humans, wild mammals and *Rhodnius* species of Central and South America, and phylogenetically inferred the relationships among isolates of *T. rangeli* and other trypanosomes and trypanosomatids. Analyzes positioned *T. rangeli* closest to *T. cruzi*, and additionally supported all the *T. rangeli* lineages (A–D) previously defined using ribosomal and spliced leader genes, thereby corroborating clonal evolution, independent transmission cycles and the divergence of *T. rangeli* lineages associated with sympatric species of *Rhodnius*. *CATL* sequences also proved to be excellent targets for diagnosis and genotyping of *T. rangeli* by PCR. In *Trypanosoma cruzi* (the agent of Chagas disease), which is a complex of genetically diverse isolates phylogenetically related to *T. cruzi*-like species (*Trypanosoma cruzi marinkellei* and *Trypanosoma dionisii*), 80 sequences covering the catalytic domain of cruzipain (the major *CATL* isoform of *T. cruzi*) from 25 isolates representative of all discrete typing units (DTUs TcI-TcVI; Tcbat) and 10 sequences of homologous genes from *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. rangeli* and *T. brucei* were compared. *CATL*-based analysis of the biological and genetic diversity of *T. cruzi* and closest *T. cruzi*-like species evidenced DTU and species-specific polymorphisms, corroborating the phylogenetic relationships inferred with other genes. In network genealogies, sequences from *T. cruzi*

clustered tightly together and closer to *T. c. marinkellei* than to *T. dionisii* and largely differed from homologues of *T. rangeli* and *T. b. brucei*. Our findings also corroborate cruzipain as valuable target for drugs, vaccine, diagnostic and genotyping approaches. Analysis of *CATL* genes in the ***T. theileri* Clade** included sequences of isolates from cattle, water buffalo and deer. In *T. theileri*, *CATL* genes were shown to be organized in tandem arrays of 1.7 kb located in 2 chromosomal bands of 600–720 kb. Analysis of 78 *CATL* catalytic domain sequences from 22 *T. theileri* trypanosomes disclosed 6 genotypes clustering tightly together into the *T. theileri* clade, whose sequences largely diverged from those of homologous genes of other trypanosome species. A diagnostic PCR assay targeting *CATL* sequences detected *T. theileri* of all genotypes from cattle, buffaloes and cervids and also from tabanid vectors. Expression of *T. theileri* cysteine proteases was additionally demonstrated by proteolytic activity in gelatin gels and hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC substrate. Results from this work agree with previous data using ribosomal and spliced leader genes demonstrating that *CATL* gene sequences are useful for diagnosis, population genotyping and evolutionary studies of *T. theileri* Clade.

Regarding the species of the ***T. brucei* Clade**, *CATL* genes were examined in *Trypanosoma congolense*, which is the most important agent of nagana, a wasting livestock trypanosomosis in sub-Saharan Africa. *Trypanosoma congolense* is a complex of three genotypes (Savannah, Forest and Kilifi) that differ in virulence, pathogenicity, drug resistance, vectors, and geographical distribution. Congopain, the major *CATL* activity of *T. congolense*, has been extensively investigated in the reference strain IL3000 (Savannah), and considered a pathogenic factor and target for drugs and vaccines. We compared *CATL* genes from isolates of the three subgroups of *T. congolense* and results demonstrated that the congopain genes diverged into three subclades consistent with the three genotypes. Laboratory and field Savannah isolates exhibited a highly polymorphic repertoire both inter- and intra-isolates, forming four sequence groups (SAV1-SAV4). Sequences sharing the archetypical catalytic triad clustered into SAV1–SAV3, whereas polymorphic sequences that, in general, exhibited unusual catalytic triad (variants) were assigned to SAV4 or not assigned to any group. Congopain homologous genes from Forest and Kilifi isolates showed, respectively, moderate and limited diversity. In phylogenetic tree based on *CATL* genes, Savannah was closer to Forest than to Kilifi and all *T. congolense* isolates nested into a single clade, which together with the sister clade formed by homologous genes from *Trypanosoma simiae* and *Trypanosoma godfreyi* formed a clade supporting the subgenus *Nannomonas*. A single PCR targeting congopain sequences was developed for the diagnosis of *T. congolense* isolates of the three subgroups. Our findings demonstrated that congopain genes are valuable targets for the diagnosis, genotyping, and phylogenetic and taxonomic inferences among *T. congolense* isolates and other members of the subgenus *Nannomonas*.

Finally, we started a paired study of *CATB* and *CATL* genes in all species of the ***T. cruzi* Clade** (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. vespertilionis*, *T. sp. bat*, *T. sp. NanDoum1*, *T. sp. HochNdi1*, *T. sp. H25* and *T. livingstonei*). Original sequences of *CATB* and *CATL* genes were obtained by PCR-amplification and aligned with those retrieved from genome databases. Search of *CATB* genes and synteny analyses (localizing *CATB* and *CATL* in distinct syntenic regions) were performed in 12 available trypanosome genomes. Our analyses included 83 isolates from 17 trypanosome species representing all *T. cruzi* DTUs and *T. rangeli* genotypes, as well as other species of the *T. cruzi* clade, other mammalian trypanosomes and different genera of trypanosomatids. *CATB* and *CATL* genealogies were highly congruent, supporting both genes as valuable phylogenetic markers. *CATB* gene is more divergent than the multi-copy *CATL* genes, and better resolved inter- and intra-species relationships. Concatenated sequences yielded best-resolved phylogenetic relationships, clustering trypanosomes from South America, Africa and Europe together with either *T. cruzi* or *T. rangeli*, thus forming the two well-separated subclades, *Schizotrypanum* and *T. rangeli-T. conorhini*. Our findings support the bat seeding hypothesis (previously pointed out by SSU rRNA and gGAPDH phylogenies) for the origin of *T. cruzi* and *T. rangeli*, and the

positioning of *T. rangeli* closest to *T. conorhini*, a tropicopolitan parasite of rats that clustered with trypanosomes from African and European bats, and a monkey and civet trypanosomes from Africa. *CATB* and *CATL* genealogies provide new insights into the evolution of *T. cruzi* and *T. rangeli*, suggesting the origin of *Schizotrypanum* and *T. rangeli* -*T. conorhini* species from bat trypanosomes that evolved largely independently to give rise to generalist parasites of mammals, including humans, in the Americas.

**Keywords:** Trypanosomes of mammals. *Trypanosoma rangeli*. *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma theileri*. *Trypanosoma congolense*. Cysteine-protease. Cathepsin L-like. Cathepsin B-like. Genetic polymorphism. Molecular diagnosis. Genotyping. Phylogeny.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Origem e evolução dos Cinetoplastídeos

Estudos recentes, baseados em evidências moleculares, biológicas e morfológicas, classificaram a maior parte da diversidade eucariótica em seis supergrupos: Opisthokonta, Amoebozoa, Archaeplastida, Rhizaria, Chromalveolata e **Excavata** (Hapl et al., 2009). No supergrupo **Excavata** foram posicionados diversos organismos unicelulares, alguns deles parasitas de importância global (obrigatórios ou de vida livre) anteriormente considerados eucariontes primitivos (Cavalier-Smith, 2004; Simpson, 2004a,b). Alguns **Excavata** são providos de *citóstoma*, uma estrutura especializada da membrana, sustentada por elementos do citoesqueleto e envolvida na captura e ingestão de alimentos; sua denominação deriva exatamente dessas funções. Apesar de ausente na maioria dos Excavata, o citóstoma é de grande importância para a caracterização do grupo, sendo considerada uma característica basal secundariamente perdida nos muitos táxons internos do grupo (Adl et al., 2012; Simpson, Patterson, 2001). Outra característica importante dentro de Excavata é a presença de um, dois ou numerosos flagelos (Cavalier-Smith, 2002; Simpson, 2003). Na realidade, a vasta diversidade do grupo dificulta o estabelecimento de características gerais e, de fato, é notável a ausência de caracteres morfológicos universais dentro do grupo (Cavalier-Smith, 2004; Simpson, 2004a,b).

Os Excavata por sua vez foram subdivididos em três grupos principais: Malawimonas, Metamonada e **Discoba**. Análises multigênicas evidenciaram o estreito grau de relacionamento entre os membros do grupo Discoba (Adl et al., 2012; Hapl et al., 2009) bem como sua segregação em quatro grandes grupos: Heterolobosea, Jakobida, Tsukubamonas e **Euglenozoa**.

O Filo Euglenozoa é considerado um dos maiores grupos de eucariotos unicelulares, compreendendo flagelados com grande diversidade morfológica e genética. Membros deste grupo apresentam características de importância evolutiva, ecológica, médica e veterinária uma vez que apresentam múltiplos estilos de vida, incluindo organismos de vida-livre fototróficos, osmotróficos ou fagotróficos assim como parasitas de diversas classes de vertebrados, invertebrados e plantas (Breglia et al., 2007; Busse, Preisfeld, 2002, 2003; Moreira et al., 2007; Preisfeld et al., 2001; Simpson et al., 2006).

De acordo com a última revisão taxonômica dos eucariotas, o filo Euglenozoa foi subdividido em quatro classes: Diplonemea, Euglenida, Symbiontida e **Kinetoplastea** (Adl et al., 2012). No entanto, o relacionamento entre estas classes ainda é controverso. Alguns estudos filogenéticos têm sugerido um



estreito relacionamento entre diplomonídeos e cinetoplastídeos, posicionando os euglenídeos como grupo basal. Membros da classe Symbiontida, recentemente descrita (Yubuki et al., 2009), provavelmente derivaram de euglenídeos fagotróficos (Adl et al., 2012).

O sistema de classificação atual considera a segregação dos **Kinetoplastea** em duas subclasses: Prokinetoplastina e **Metakinetoplastina**. A subclasse Prokinetoplastina reúne ectoparasitas de peixes (marinhos e de água doce) do gênero *Ichthyobodo*, assim como endossimbiontes de protozoários ameboides do gênero *Perkinsiella*. Por sua vez, a subclasse Metakinetoplastina foi segregada em quatro ordens principais, sendo três de bodonídeos (Neobodonida, Parabodonida e Eubodonida) e a ordem **Trypanosomatida**, cujos membros são todos parasitas da família **Trypanosomatidae** (Adl et al., 2012; Dyková et al., 2003; Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006).

## 1.2 Evolução da família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae reúne diversas espécies de protozoários flagelados que incluem alguns parasitas de importância médica humana e veterinária. Os organismos dessa família apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, podendo parasitar plantas, insetos e hospedeiros vertebrados de praticamente todas as ordens. Além disso, os tripanossomatídeos exibem um conjunto de peculiaridades que abrangem estruturas morfológicas, características moleculares e bioquímicas, ciclos de vida e estratégias de invasão, plasticidade ou restrição pelos hospedeiros, que fazem deste táxon um excelente modelo para estudos evolutivos (Simpson et al., 2000, 2003, 2006; Stevens, 2008; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1976, 1994).

Assim como outros cinetoplastídeos, membros da família Trypanosomatidae caracterizam-se pela presença de uma única mitocôndria que contém uma região rica em DNA (kDNA) denominada cinetoplasto, constituída por moléculas circulares de dupla-fita (minicírculos e maxicírculos) concatenadas em uma única rede. Estudos filogenéticos sugerem que a origem evolutiva da rede concatenada de kDNA ocorreu no ancestral da família Trypanosomatidae, já que os minicírculos dos bodonídeos não são concatenados (Lukes et al., 2002; Simpson et al., 2000, 2002).

Outras particularidades de interesse evolutivo observadas nos tripanossomatídeos (algumas exclusivas e outras compartilhadas com outros eucariotas e/ou procariotas) têm sido muito estudadas, destacando-se entre elas: a composição do citoesqueleto; o confinamento das enzimas glicolíticas nos glicossomas; a ancoragem de proteínas de membrana via glicosil-fosfatidil-inositol (GPI); a

endocitose/exocitose de macromoléculas via bolso flagelar; a presença de um nucleotídeo modificado denominado Base J em seu DNA nuclear; a variação antigênica; a transcrição policistrônica; os mecanismos de processamento de mRNAs por "SL-trans-splicing"; e a edição de RNA mitocondrial por massiva adição/deleção de uracilos (De Souza, 2009; Gull, 2001; Hury et al., 2009; Ralston, Hill, 2008; Ralston et al., 2009; Stuart et al., 2005).

Tradicionalmente, a taxonomia da família Trypanosomatidae tem-se baseado principalmente em parâmetros morfológicos, ciclos de vida e hospedeiros de origem. Em relação à morfologia, os tripanossomatídeos apresentam várias formas, que podem sofrer diferenciação de acordo com as diversas fases dos ciclos de vida desses parasitas nos seus hospedeiros. Desta maneira, as principais formas (definidas em função da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, da presença ou não de flagelo livre e membrana ondulante) são: amastigota, epimastigota, promastigota, tripomastigota, coanomastigota e opistomastigota.

No que concerne aos ciclos de vida e hospedeiros de origem, os tripanossomatídeos podem ser classificados em parasitas monoxênicos (que possuem apenas um hospedeiro) ou heteroxênicos (que precisam de dois hospedeiros, o definitivo e o vetor para completar o seu ciclo de vida).

Atualmente, os tripanossomatídeos são distribuídos em 14 gêneros, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento e tipos de hospedeiros envolvidos. Nove desses gêneros compreendem protozoários monoxênicos de insetos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rynchoidomonas*, *Wallaceina*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Angomonas*). Em contraste, apenas três gêneros abrigam os protozoários heteroxênicos e diversas espécies patogênicas para animais vertebrados (*Trypanosoma* e *Leishmania*) ou plantas (*Phytomonas*). Recentemente, dois novos gêneros foram acrescentados à família Trypanosomatidae: *Paratrypanosoma* (Flegontov et al., 2013) e *Blechomonas* (Votycka et al., 2013). Ambos os gêneros atualmente são considerados monoxênicos devido à falta de evidência de desenvolvimento em hospedeiros diferentes aos insetos de origem. Portanto, observações posteriores que comprovem o desenvolvimento destes parasitas em hospedeiros vertebrados, poderiam mudar esse status. Nesse sentido, algumas evidências têm suscitado a possibilidade de espécies presumivelmente monoxênicas serem transmitidas ocasionalmente para hospedeiros vertebrados. De fato, tripanossomatídeos similares a *Blechomonas pulexsimulantis*, foram observados ocasionando infecções oportunistas em pacientes HIV positivos (Pacheco et al., 1998; Votycka et al., 2013).

A história evolutiva dos tripanossomatídeos, embora muito investigada, é pouco esclarecida. Análises de genes *SSUrDNA* de muitos táxons com diferentes métodos filogenéticos têm ajudado a

resolver algumas questões como, por exemplo, a monofilia dos tripanossomatídeos e os bodonídeos como o grupo ancestral mais próximo (Callahan et al., 2002; Dolezel et al., 2000; Hughes e Piontkivska 2003a; Moreira et al., 2004).

Hipóteses fundamentadas em reconstruções filogenéticas tentam explicar a origem dos tripanossomatídeos e dos ciclos heteroxênicos de *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas*. Esses estudos propõem diferentes histórias evolutivas, dependendo dos táxons, dos genes e dos métodos filogenéticos utilizados (Hamilton et al., 2004, 2007; Maslov e Simpson, 1995; Piontkivska e Hughes, 2005; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1994;). Apesar disso, diversas hipóteses compartilham a ideia de que parasitas monoxênicos deram origem aos parasitas heteroxênicos.

Algumas teorias sugerem que os tripanossomatídeos poderiam ter parasitado inicialmente hospedeiros invertebrados e que estes, com o surgimento da hematofagia, transmitiram os parasitas para os hospedeiros vertebrados. Porém, de acordo com as filogenias, espécies heteroxênicas divergiram, independentemente, várias vezes ao longo da evolução dos tripanossomatídeos (Haag et al., 1998; Hamilton et al., 2007; Lukes et al., 2002; Stevens, 2008; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1994; Wright et al., 1999). Por outro lado, as filogenias mais robustas têm sugerido a hipótese de que um bodonídeo aquático, de vida livre e não parasita, pode ter sido ingerido por insetos, se adaptado ao habitat intestinal e posteriormente inoculado em vertebrados. Deste modo, alguns se adaptaram ao parasitismo no sangue, passando a circular entre insetos hematófagos e vertebrados terrestres. Estes dados apoiam a hipótese de que as espécies heteroxênicas se originaram das monoxênicas e que estas últimas deveriam ser as mais relacionadas com os cinetoplastídeos de vida livre (Hoare, 1972; Lake et al., 1988). Assim sendo, é muito provável que de um ancestral bodonídeo tenham divergido inicialmente os tripanossomatídeos não pertencentes ao gênero *Trypanosoma*, segregando-se em grandes grupos, e que o gênero *Trypanosoma* tenha divergido depois desses grandes grupos. A hipótese mais recente, baseada em filogenia com sequências combinadas de *SSUrDNA* e *gGAPDH*, sugere que o gênero *Trypanosoma* evoluiu de um tripanossomatídeo ancestral relacionado com *Blastocrithidia triatomiae*, um parasita de triatomíneos. Como esses insetos e seus ancestrais são hematófagos, pode assim ter ocorrido a transmissão para o sangue dos vertebrados, dando origem aos gêneros de parasitas de vertebrados, inclusive ***Trypanosoma*** (Hamilton et al., 2004, 2007; Lukes et al., 2002; Simpson et al., 2006; Stevens, 2008; Stevens et al., 2001). Outros insetos hematófagos existentes há milhões de anos, como os flebotomíneos, poderiam ter participado desse processo dando origem, por exemplo, aos tripanossomas de anfíbios e répteis e *Leishmania* (Poinar, 2004, 2008). Provavelmente, muitas outras hipóteses serão levantadas com a inclusão

de novas espécies nas filogenias, análises combinadas de muitos genes e, futuramente, com análises filogenômicas dos membros do filo Euglenozoa.

### 1.3 O gênero *Trypanosoma*

O gênero *Trypanosoma* foi originalmente proposto por Gruby (1843) para classificar um parasita hemoflagelado, *Trypanosoma sanguinis*, observado em *Rana esculenta* na Europa. Desde então, inúmeras espécies de tripanossomas têm sido descritas em um grande número de hospedeiros vertebrados, abrangendo répteis, anfíbios, peixes, aves e mamíferos (Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001). Além disso, o sucesso das espécies deste gênero como parasitas heteroxênicos pode ser evidenciado pela grande diversidade de insetos vetores (hospedeiros intermediários) que podem parasitar. Enquanto os tripanossomas de mamíferos e aves normalmente se desenvolvem em artrópodes hematófagos pertencentes a diversas ordens (Diptera, Hemiptera e Siphonaptera), os tripanossomas de anfíbios, peixes e répteis são principalmente transmitidos por sanguessugas e uma grande variedade de dípteros (flebotomíneos, ceratopogonídeos, tabanídeos e glossinídeos). Algumas espécies de tripanossomas africanos são transmitidas apenas mecanicamente porque não tem uma mitocôndria funcional, organela indispensável para o desenvolvimento de alguns estádios morfológicos nos insetos vetores (Gardiner, Musa, 1992; Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Viola et al., 2008).

Apesar das centenas de espécies de *Trypanosoma* já descritas, as mais reconhecidas e estudadas são *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma congolense*, o que provavelmente se deve ao impacto negativo que exercem como espécies patogênicas para o homem e alguns animais de importância econômica. No entanto, estas espécies parecem ser apenas algumas exceções dentro do táxon, uma vez que a maior parte das espécies conhecidas circulam dentro do equilíbrio enzoótico com seus hospedeiros vertebrados e vetores silvestres.

Durante muito tempo, os parâmetros taxonômicos adotados para a descrição de novas espécies de tripanossomas basearam-se principalmente na morfologia e nas informações sobre ciclos biológicos e patogenicidade. Dessa maneira, convivemos, até hoje, com as inconveniências e insuficiências desses critérios e em alguns casos ainda prevalecem os parâmetros taxonômicos clássicos propostos há mais de 20 anos. Na última revisão taxonômica do gênero *Trypanosoma* (Hoare, 1972), -baseada justamente nesses conceitos- foram criados vários subgêneros, identificadas inúmeras sinonímias e propostos diversos parâmetros para a identificação de novas espécies, sendo de muita utilidade no estudo das

diversas espécies de tripanossomas. Contudo, esses conceitos ainda apresentam grandes limitações, uma vez que as formas observadas no sangue de vertebrados de diversas espécies e classes geralmente não apresentam características específicas que permitam um diagnóstico adequado mesmo entre espécies de gêneros diferentes. Além disso, os tripanossomas são muito pleomórficos, sendo difícil saber se formas diferentes correspondem a espécies diferentes ou a estágios de diferenciação de uma mesma espécie. A extensa sinonímia e os constantes reposicionamentos de espécies são resultantes da grande quantidade de erros de identificação confirmados pelas análises filogenéticas.

Com o desenvolvimento de ferramentas moleculares e estudos filogenéticos cada vez mais apurados, a primeira questão a ser esclarecida foi a origem monofilética do gênero *Trypanosoma*. Desta maneira, estudos baseados principalmente nos genes *SSUrDNA* e *gGAPDH*, incluindo espécies representativas da ampla diversidade observada nestes parasitas, confirmaram que todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, peixes, anfíbios e répteis se originaram de um ancestral comum (Ferreira et al., 2007; Hamilton et al., 2004, 2005, 2007, 2009; Stevens, Gibson, 1999a,b; Stevens et al., 2001; Viola et al., 2008, 2009; Wright et al., 1999). Estudos filogenéticos (menos tradicionais) baseados em sequências codificadoras de proteínas também foram utilizados para inferir histórias evolutivas dentro do gênero *Trypanosoma*. Estes estudos incluíram análises dos genes que codificam o fator de alongação  $1\alpha$ , a tripanotona redutase, a  $\beta$ -tubulina e as HSP90 e HSP70 geraram filogenias congruentes com as tradicionais, apresentando os tripanossomas como um grupo monofilético (Alvarez et al., 1996; Hamilton et al., 2007; Hannaert et al., 1998; Hashimoto et al., 1995; Lukes et al., 2002).

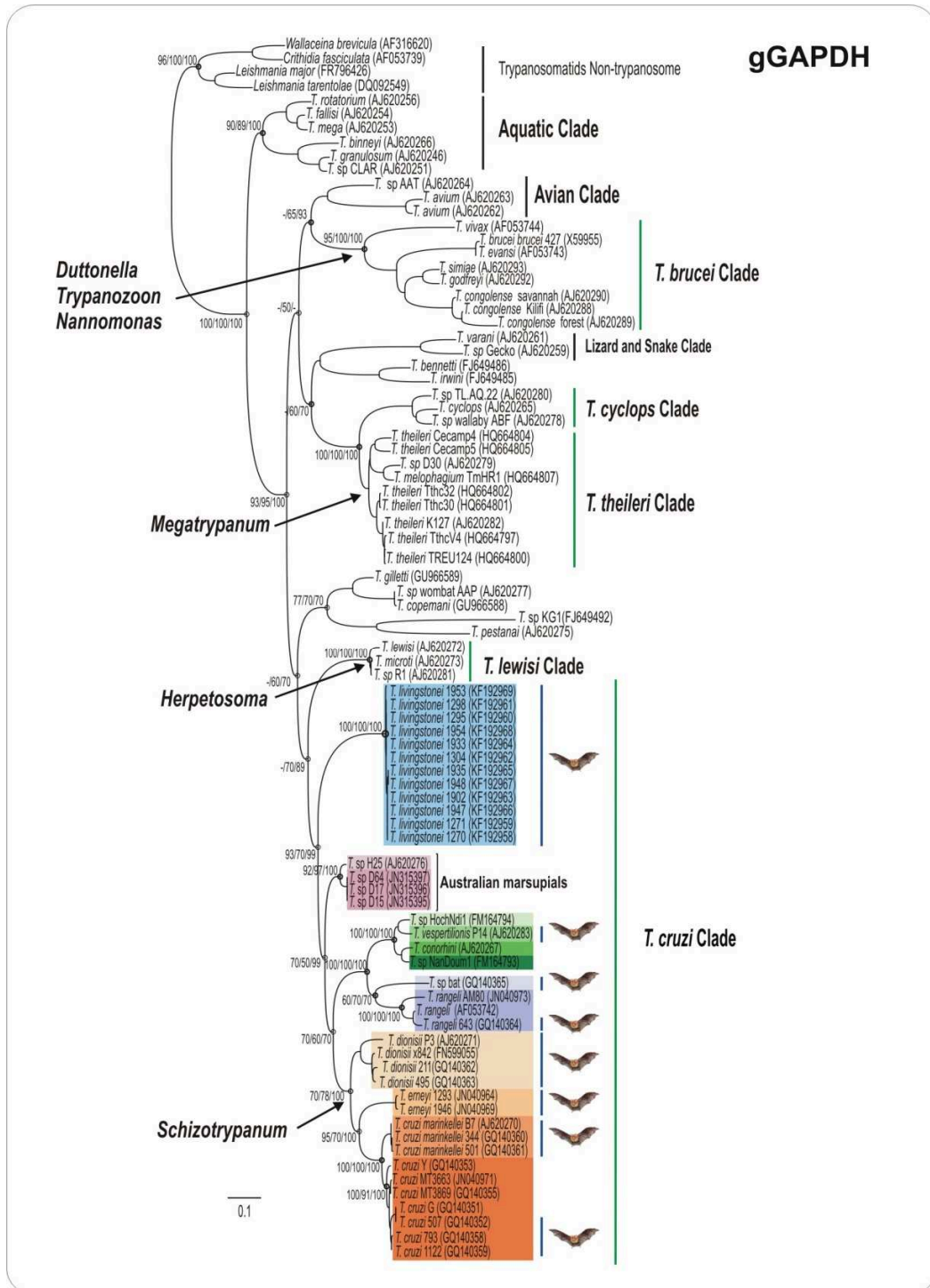
Durante o esclarecimento da monofilia dos tripanossomas, também foram evidenciados outros agrupamentos filogenéticos chave dentro do gênero que foram apoiados por diversos estudos (Hamilton et al., 2004, 2005, 2007; Stevens et al., 2001). Inferências filogenéticas bem suportadas dividiram os tripanossomas em dois grupos principais: o Clado aquático e o Clado terrestre. No primeiro clado foram posicionados os tripanossomas de peixes de água doce, anuros, quelônios e um isolado de ornitorrinco. No Clado terrestre foram posicionados todos os tripanossomas de hospedeiros vertebrados terrestres (Ferreira et al., 2007; Hamilton et al., 2007; Viola et al., 2008, 2009). Adicionalmente, uma grande diversidade foi observada neste último grupo, de tal maneira que o clado terrestre foi subdividido nos seguintes subclados: (a) O Clado dos tripanossomas de lagartos e serpentes, transmitidos principalmente por insetos flebotomíneos (Ferreira et al., 2007; Hamilton et al., 2007; Viola et al., 2008, 2009); (b) O Clado Crocodiliano, que compreende os tripanossomas isolados de aligatrorídeos e crocodilídeos (Fermino et al., 2013; Viola et al., 2008, 2009); (c) O Clado dos tripanossomas de aves, formado por parasitas de um

grande número de espécies aviárias e transmitidos por diversos artrópodes, sugerindo restrição pela espécie de ave hospedeira (Sehgal et al., 2001; Votýpka et al., 2002; Zídkova et al., 2012); e, finalmente, quatro grandes clados que reúnem a diversidade dos tripanossomas de mamíferos: (d) Clado *T. brucei*; (e) Clado *T. cruzi* (f) Clado *T. theileri* e (g) Clado *T. lewisi* (Figura 1).

#### 1.4 Os Tripanossomas de Mamíferos

Sem dúvida, dentro do gênero *Trypanosoma* alguns dos parasitas mais estudados são os tripanossomas de mamíferos, provavelmente porque nesse grupo se encontram as espécies que acometem o homem e diversas espécies animais de importância veterinária. Consequentemente, desde o descobrimento dos primeiros tripanossomas (há mais de um século) até hoje, centenas de espécies de tripanossomas já foram descobertas e descritas em mamíferos de praticamente todas as ordens e em todos os continentes. Apesar disso, o que se conhece em relação a estes parasitas é pouco diante da diversidade que eles representam, sendo ainda necessários diversos estudos biológicos, epidemiológicos, bioquímicos, moleculares, taxonômicos e evolutivos, não apenas das espécies amplamente conhecidas, mas também daquelas recentemente descobertas.

Tal como aconteceu com outros membros tripanossomatídeos, os tripanossomas de mamíferos foram classificados inicialmente de acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e com a via de transmissão das formas infectantes pelo vetor (Figura 2), sendo divididos em duas Seções: Salivaria e Stercoraria. Na Seção *Salivaria* foram reunidos os tripanossomas de origem africana que apresentavam formas em divisão no estômago, tubo digestivo ou completavam seu desenvolvimento nas glândulas salivares do inseto vetor (mosca tsé-tsé). Outra característica importante atribuída aos membros desta seção era a evidência de transmissão mecânica ou pela via inoculativa para o hospedeiro vertebrado durante a picada do vetor. Nesta seção foram agrupados os subgêneros *Trypanozoon* (espécie tipo: *Trypanosoma brucei*), *Duttonella* (*T. vivax*), *Nannomonas* (*T. congolense*) e *Pycnomonas* (*T. suis*) (Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001). Por outro lado, na Seção *Stercoraria* foram posicionadas praticamente todas as espécies que circulam no continente americano, cuja característica mais sobressaliente era o desenvolvimento quase exclusivo no tubo digestivo do invertebrado, sendo as formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) eliminadas juntamente com as fezes transmitidas pela via contaminativa, isto é, penetração nos hospedeiros vertebrados via orifícios da picada ou mucosas (Hoare, 1972).

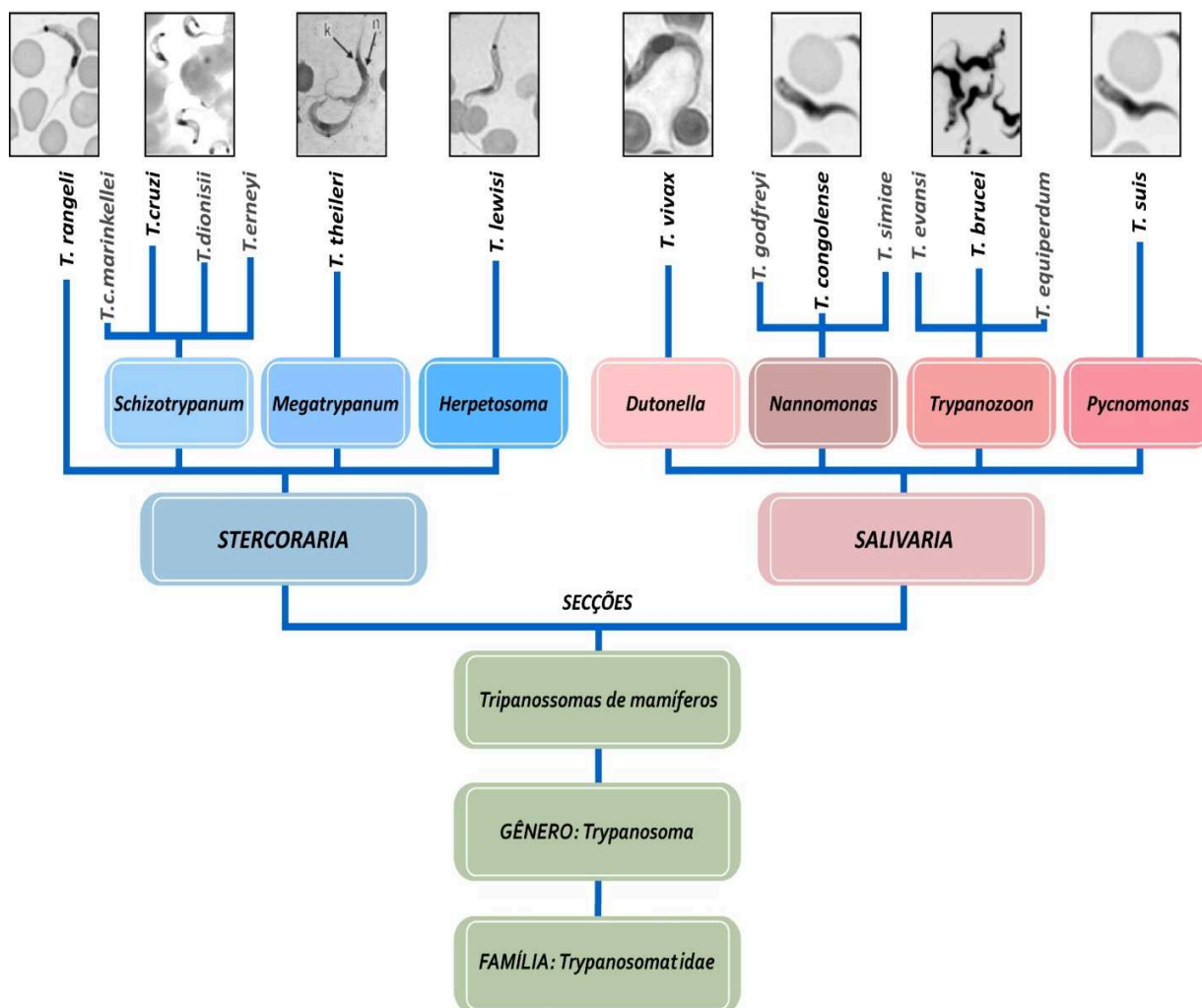
Figura 1- Árvore filogenética dos tripanossomatídeos inferida pelo método ML a partir do gene *gGAPDH*.

Na figura são representados os principais clados filogenéticos do gênero *Trypanosoma*. Os traços verdes indicam os clados dos tripanossomas de mamíferos e as setas à esquerda os subgêneros mais representativos dentro de cada um deles. Os traços azuis dentro do Clado *T. cruzi* indicam os isolados que têm sido encontrados em hospedeiros da ordem Chiroptera.

FONTE: Adaptado de Lima et al., 2013.

Na Secção *Stercoraria* foram reunidos os subgêneros *Megatrypanum* (*Trypanosoma theileri*), *Schizotrypanum* (*Trypanosoma cruzi*) e *Herpetosoma* (*Trypanosoma lewisi*) (Figura 2).

**Figura 2-** Classificação dos *Tripanossomas de Mamíferos* de acordo com o desenvolvimento no vetor e via de transmissão para o hospedeiro vertebrado.



As fotografias correspondem às espécies destacadas em negrito.

**FONTE:** Adaptado de Hoare, 1972.

Embora desprovida de valor taxonômico, esta classificação foi útil durante muito tempo, cabendo destacar que alguns dos relacionamentos intraespecíficos estabelecidos a partir dela são atualmente corroborados por estudos taxonômicos e filogenéticos. No entanto, com o aprimoramento de diversas ferramentas moleculares e a adoção de critérios de classificação cada vez mais apurados, muitos



posicionamentos taxonômicos deduzidos a partir do comportamento biológico destes parasitas já foram invalidados, outros revalidados, e novas associações têm sido estabelecidas. Assim sendo e de acordo com análises filogenéticas, baseadas principalmente nos genes *SSUrDNA* e *gGAPDH*, os tripanossomas de mamíferos são segregados em quatro grupos monofiléticos bem suportados, também conhecidos como clados que recebem seu nome segundo a espécie mais representativa dentro de cada um.

#### 1.4.1 Aspectos gerais do Clado *T. brucei*

Neste clado foram posicionados os tripanossomas originários da África que infectam o homem e diversas espécies de mamíferos de importância pecuária nesse continente (Figura 1). Algumas evidências como o grau de divergência em relação às demais espécies de tripanossomas, suportam uma história evolutiva em comum, muito provavelmente confinada a África e associada à presença de vetores naturais do gênero *Glossina* (moscas tsé-tsé). Por exemplo, estima-se que a divergência entre *T. cruzi* e *T. brucei* seja próxima a 100 milhões de anos, coincidindo com a separação da África e América do Sul.

O Clado *T. brucei* agrupa os tripanossomas africanos dos subgêneros: (i) **Trypanozoon** que reúne as espécies *T. brucei* (subespécies *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*), *T. evansi* e *T. equiperdum*; (ii) **Duttonella** ao qual pertencem *Trypanosoma vivax* (genótipos A, B e C) e *T. uniforme*; (iii) **Nannomonas** que inclui *T. congolense* (subgrupos Savannah, Forest e Killifi), *T. simiae* e *T. godfreyi*; e (iv) **Pycnomonas**, no qual foi posicionado *T. suis* (Adams et al., 2010).

Recentemente, estudos realizados na Tanzânia, sobre a diversidade de espécies de tripanossomas que podem ser transmitidos por moscas tsé-tsé, revelaram a existência de uma nova espécie estreitamente relacionada com *T. brucei* pelo que foi denominada *T. brucei-like*. Análises filogenéticas baseadas nos genes *SSUrDNA* e *gGAPDH* confirmaram o posicionamento desta nova espécie no Clado *T. brucei*. Apesar disso, a classificação em algum dos subgêneros existentes ainda não foi definida, devido a pouca informação que se tem do ciclo de vida deste parasita. Por outro lado, inferências filogenéticas sugerem distâncias genéticas suficientemente grandes entre *T. brucei* e *T. brucei-like* de tal maneira que a nova espécie poderia representar um novo subgênero (Adams et al., 2010; Hamilton et al., 2004, 2008; Stevens et al., 2001).

Com exceção de *T. equiperdum* (de transmissão sexual), todos estes parasitas são transmitidos cíclica ou mecanicamente por dípteros hematófagos para um grande número de hospedeiros vertebrados. Desta maneira espécies do subgênero *Trypanozoon* são responsáveis pela tripanossomíase humana na

África (*T. brucei*) ou agentes etiológicos da tripanossomíase equina não apenas na África, mas também no continente americano (*T. evansi* e *T. equiperdum*). Já as espécies do subgênero *Nannomonas*, (principalmente *T. congolense*), acometem diversos hospedeiros de importância econômica como ovinos, caprinos, bovinos e suínos; porém, outros animais como cães e leões são naturalmente infectados por estes parasitas. Entretanto, espécies dos subgêneros *Duttonella* e *Pycnomonas* são encontradas parasitando hospedeiros caprinos e suínos respectivamente (Adams et al., 2010).

Na África, todas as espécies do Clado *T. brucei* são abundantes tanto nas áreas de influência de *Glossina* spp., quanto nas áreas livres, onde a transmissão é atribuída a outros insetos hematófagos, principalmente da família Tabanidae. Dentre estas espécies, apenas *T. vivax*, *T. evansi* e *T. equiperdum* são encontrados fora da África e, provavelmente, foram introduzidos (pelos colonizadores europeus) nas Américas, onde se adaptaram à transmissão mecânica também por tabanídeos e outros muscídeos, como *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* (Hoare, 1972).

Evidências biológicas e moleculares coletadas até hoje, realmente suportam uma história evolutiva em comum para estas espécies e alguns estudos sugerem que toda a diversidade do clado originou-se a partir de um ancestral hemoparasita que circulava entre artiodátilos africanos, sendo transmitido entre eles e outros vertebrados por moscas tsé-tsé (Stevens e Gibson, 1999a; Adams et al., 2010; Jackson et al., 2013).

#### 1.4.2 Aspectos gerais do Clado *T. cruzi*

Inicialmente foram posicionadas neste clado apenas as espécies do subgênero *Schizotrypanum* que tem *T. cruzi* como espécie-tipo, mas reúne outras espécies conhecidas como: *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* e *T. erneyi*. Apesar da capacidade *in vitro* de invadir e se multiplicar em células de diferentes ordens de mamíferos, as espécies deste subgênero (com exceção de *T. cruzi*) estão restritas a hospedeiros da ordem Chiroptera. Entretanto, diversas espécies de hemípteros (triatomíneos e cimicídeos) atuam como vetores destes parasitas (Cavazzana et al., 2010; Hamilton et al., 2012; Hoare, 1972; Lima et al., 2012a; Marcili et al., 2009a; Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991).

Com o descobrimento de novas espécies e estudos filogenéticos cada vez mais acurados, a origem e organização do Clado *T. cruzi* se mostraram mais complexas do que se imaginava e até hoje continuam sendo objeto de diversos estudos e discussões. Além das espécies mencionadas, diversos estudos também posicionaram *T. rangeli* neste grupo, que, juntamente com *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* são

exclusivas do continente americano. De igual maneira, *T. vespertilionis*, encontrado no novo mundo, *T. livingstonei*, recentemente descoberto na costa leste da África, e *T. conorhini*, aparentemente de distribuição cosmopolita (como *T. dionisii*), também foram incluídos no Clado *T. cruzi*. Adicionalmente, quatro espécies parcialmente caracterizadas e denominadas provisoriamente como: *T. sp. H25*, originária da Austrália; *T. sp. bat*, *T. sp. NanDoum1* e *T. sp. HochNdi1*, provenientes da costa oeste da África, mostraram-se estreitamente relacionadas (Hamilton et al., 2012a,b; Lima et al., 2012a, 2013; Stevens, Gibson, 1999a; Stevens et al., 2001). De fato, análises filogenéticas baseadas em diversos marcadores moleculares suportaram o posicionamento de todas estas espécies em um agrupamento monofilético, subdividido em dois grupos principais: “**Subcluster Schizotrypanum**”, que agrupa *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. erneyi* e *T. dionisii*, e o “**Subcluster *T. rangeli/T. conorhini***”, formado por *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. vespertilionis*, *T. sp. NandDoum1*, *T. sp. HochNdi1* e *T. sp. bat*. *Trypanosoma sp. H25* e *T. livingstonei* mostraram-se basais aos demais membros do grupo (Hamilton et al., 2009, 2012b; Lima 2012b, 2013).

Devido à grande diversidade dentro do clado, diferentes teorias foram suscitadas tentando explicar a origem destas espécies. Até finais dos anos 90, a hipótese do “supercontinente” era uma das mais aceitas. Esta hipótese sugeria que as espécies do Clado *T. cruzi*, teriam emergido no novo mundo (depois da separação com a África) a partir de um parasita ancestral dos mamíferos terrestres que ocupavam a grande massa continental constituída por Austrália, Antártica e América do Sul. Desta maneira era possível explicar o estreito relacionamento entre tripanossomas americanos e australianos (Stevens, Gibson 1999a,b). No entanto, o recente descobrimento de tripanossomas africanos como novos membros do Clado *T. cruzi*, questionou a legitimidade desta hipótese.

Por outro lado, a evidência coletada na última década favoreceu a construção de uma nova teoria que logra explicar de uma maneira mais simples o relacionamento de todas as espécies do clado. Tendo em vista que muitas das espécies do Clado *T. cruzi* têm sido encontradas parasitando diversas espécies de morcegos, esta nova teoria sugere que a origem deste grupo teria lugar em morcegos do velho mundo que teriam migrado para o continente americano e junto com eles algumas espécies de tripanossomas (Figura 1). A teoria denominada “*Bat seeding*” considera que parasitas ancestrais de morcegos teriam dado origem a tripanossomas especialistas como *T. c. marinkellei*, *T. erneyi* e *T. dionisii* (que evoluíram exclusivamente na ordem quiróptera) e tripanossomas generalistas como *T. cruzi* e *T. rangeli* (que conseguiram fazer mudanças de hospedeiros várias vezes e de maneira independente durante suas histórias evolutivas) (Hamilton et al., 2012a; Lima et al., 2013). Assim, embora a origem e organização do

Clado *T. cruzi* pareçam cada vez mais claras, novos estudos ainda são necessários para entender não somente o relacionamento entre as espécies que formam este clado, como também as estruturas populacionais das espécies descritas até o momento.

### 1.4.3 Aspectos gerais do Clado *T. theileri*

Estudos filogenéticos baseados principalmente nos genes *SSUrDNA* e *gGAPDH* evidenciaram a formação de um grupo monofilético robustamente suportado contendo as espécies que correspondem apenas ao subgênero *Megatrypanum* recentemente validado (Garcia et al., 2011; Martinkovic et al., 2012; Rodrigues et al., 2006). Este clado é formado por tripanossomas amplamente distribuídos e não patogênicos de ruminantes domésticos (bovinos, bubalinos e ovinos) e silvestres (cervos, antílopes, etc), cujos vetores são moscas hematófagas das famílias *Tabanidae* e *Hippoboscidae* (Garcia et al., 2011; Rodrigues et al., 2006, 2010a,b).

*Trypanosoma theileri* é a espécie-tipo do subgênero *Megatrypanum* e junto com *T. melophagium* são as espécies mais estudadas do subgênero, nos aspectos morfológicos, biológicos e epidemiológicos (Garcia et al., 2011; Martinkovic et al., 2012; Rodrigues et al., 2006, 2010a,b). *T. theileri* possui distribuição cosmopolita, diretamente relacionada à presença dos seus hospedeiros naturais, os bovinos domésticos. Geralmente, o curso natural das infecções por *T. theileri* é críptico, geralmente crônico e assintomático, permanecendo assim durante anos sem necessidade de reinfecções, mas também não induzem resistência a infecções posteriores, que são muito comuns em ambientes naturais. Embora considerados não patogênicos, estes parasitas possuem uma patogenicidade potencial quando os hospedeiros naturais são submetidos a estresse físico ou nutricional, assim como para vacas em período de gestação ou animais com infecções concomitantes com outros hemoparasitas ou parasitas gastrointestinais. Nestes casos, as parasitemias tornam-se elevadas e as infecções podem resultar em abortos e/ou morte do recém-nascido, observando-se uma ampla dispersão dos parasitas em diversos órgãos, incluindo o sistema nervoso central (Braun et al., 2002; Mansfield, 1977; Seifi, 1995; Villa et al., 2008; Ward et al., 1984).

Espécies do subgênero *Megatrypanum* são consideradas altamente restritas aos seus hospedeiros mamíferos, uma vez que infecções experimentais e observações de campo mostraram que estes tripanossomas são infectantes apenas para hospedeiros ruminantes. Tentativas de infecções cruzadas corroboraram a restrição de algumas espécies aos seus hospedeiros mamíferos, uma vez que tentativas

de infectar ovelhas e cervos com isolados de *T. theileri* provenientes de boi não tiveram sucesso, assim como também não tiveram aquelas infectando bezerros com tripanossomas de cervídeos (Bose et al., 1987; Hoare, 1972; Kingston, Morton, 1975; Wells, 1976). Por outro lado, parasitas relacionados e morfologicamente indistinguíveis de *T. theileri* (conhecidas em conjunto como *T. theileri*-like) foram descritos em uma grande variedade de hospedeiros da ordem Ruminantia. No entanto, apenas *T. melophagium* (ovinos) e *T. theodori* (caprinos) foram validadas como espécies diferentes devido às fortes restrições pelos hospedeiros vertebrados e alta especificidade pelos vetores hipobosídeos (*Melophagus ovinus* e *Lipoptena capreoli*, respectivamente).

Outras espécies relacionadas tais como *T. tragelaphi*, *T. cephalophi* (de antílopes) e *T. mazamarum* (de veado), poderiam ser consideradas sinônimas de *T. theileri* porque apesar desta espécie ser um parasita cosmopolita de bois, a diversidade de hospedeiros do Clado *T. theileri* é muito abrangente conforme o observado em diversos estudos. Deste modo é possível encontrar *T. theileri* parasitando bois, búfalos, ovelhas, cabras e antílopes (Garcia et al., 2011; Martinkovic et al., 2012; Rodrigues et al., 2006, 2010a,b).

Como mencionado anteriormente, atualmente são considerados membros do Clado *T. theileri* apenas as espécies do subgênero *Megatrypanum* (Rodrigues et al., 2006). No entanto, diversos estudos filogenéticos têm evidenciado a formação de um clado menor muito relacionado com estas espécies (Figura 1). Este clado reúne espécies como *T. cyclops* e *Trypanosoma* spp. (encontrados em primatas da Ásia), assim como outros tripanossomas australianos isolados de marsupial (wallaby) e sanguessugas terrestres (Garcia et al., 2011; Hamilton et al., 2005, 2007, 2009; Lima et al., 2013; Martinkovic et al., 2012; Rodrigues et al., 2010b). Não obstante, a relação entre estes parasitas ainda não é muito clara, sendo ainda necessárias novas análises com a inclusão de outros isolados *T. cyclops*-like, assim como diversos estudos voltados para os vetores e hospedeiros das espécies deste grupo.

#### **1.4.4 Aspectos gerais do Clado *T. lewisi***

Neste clado foram posicionadas todas as espécies do subgênero *Herpetosoma*, o qual agrupa espécies cosmopolitas transmitidas por pulgas que parasitam, principalmente, roedores silvestres e domésticos. Estudos recentes detectaram essa espécie (infecções oportunistas) em primatas humanos e não-humanos (Hamilton et al., 2005; Howei et al., 2006; Maia da Silva et al., 2010; Sarataphan et al., 2007). Filogenias baseadas em diversos marcadores permitiram a revisão desse subgênero, que agora

compreende apenas as espécies *T. lewisi* e *T. lewisi-like*, separadas de *T. rangeli* (inicialmente posicionado neste táxon) que não pode ser incluído em nenhum subgênero já definido.

Assim como *T. lewisi*, as diversas espécies do grupo *T. lewisi-like* parasitam principalmente hospedeiros roedores, embora algumas espécies tenham sido descritas em coelhos, primatas e morcegos. Por outro lado, *T. lewisi* e *T. lewisi-like* são morfologicamente indistinguíveis e apresentam grande especificidade por seus hospedeiros vertebrados.

A maioria das espécies deste clado distribui-se amplamente em diversos continentes. Enquanto algumas espécies, como *T. lewisi*, *T. musculi* e *T. nabiasi*, são consideradas cosmopolitas, outras como *T. zapi*, *T. grossi*, *T. microti*, *T. evotomys*, *T. rabinowitschae* e *T. blanchardi* parecem estar limitadas aos continentes Asiático e Europeu (D'Alessandro, Behr, 1991; Maraghi et al., 1989; Molineux, 1969).

Os principais vetores do Clado *T. lewisi* são insetos da ordem Siphonaptera (pulgas). Por exemplo, *Nosopsyllus fasciatus* (em zonas temperadas) e *Xenopsylla cheopis* (em áreas tropicais e subtropicais) atuam como os vetores mais importantes de *T. lewisi*, mas existem outras espécies de pulgas que transmitem *T. lewisi-like* para diversas espécies de mamíferos. Adicionalmente, algumas espécies de triatomíneos poderiam ser vetores de algumas espécies encontradas nas Américas (D'Alessandro, Behr, 1991; Hoare, 1972; Molineux, 1976).

Muitos aspectos biológicos das espécies deste clado são desconhecidos, sendo as espécies mais estudadas *T. lewisi* (rato) e *T. musculi* (camundongo). Apesar dos poucos dados existentes, eles sugerem uma grande variabilidade de comportamentos no mamífero, com diferenças nas estratégias de multiplicação e infecção. Enquanto algumas espécies se dividem como formas amastigotas, podendo ser encontradas nos capilares dos tecidos (*T. evotomys*, *T. nabiasi*, *T. microti*, *T. zapi*), outras se dividem como epimastigotas e são encontradas no sangue periférico (*T. lewisi*, *T. rabinowitschae*, *T. blanchardi*, *T. musculi*, *T. primum*, *T. grossi*). Estes estágios amastigotas e epimastigotas também podem sofrer divisões binárias ou divisões múltiplas (D'Alessandro, Behr, 1991; Hoare, 1972; Molineux, 1976).

Além da insuficiência dos dados biológicos, dados moleculares são ainda mais escassos e os estudos filogenéticos estão limitados a um número muito restrito de isolados, sendo necessário ampliar as investigações e análises evolutivas em um dos clados de mamíferos menos explorados (Figura 1).

## 1.5 Genes frequentemente utilizados na identificação, caracterização e filogenia dos tripanossomas

A identificação e a caracterização dos tripanossomas fundamentaram-se inicialmente nos aspectos biológicos e morfológicos das diversas espécies. No entanto, com o desenvolvimento e utilização de uma variedade de marcadores moleculares no estudo desses organismos, inúmeros erros de classificação e/ou identificação têm sido evidenciados. Atualmente, existe um consenso na adoção de critérios moleculares para realizar caracterizações mais acuradas, apesar disso, dados biológicos, morfológicos e comportamentais ainda continuam úteis para o reconhecimento de diversas espécies de tripanossomas e um complemento valioso da taxonomia contemporânea.

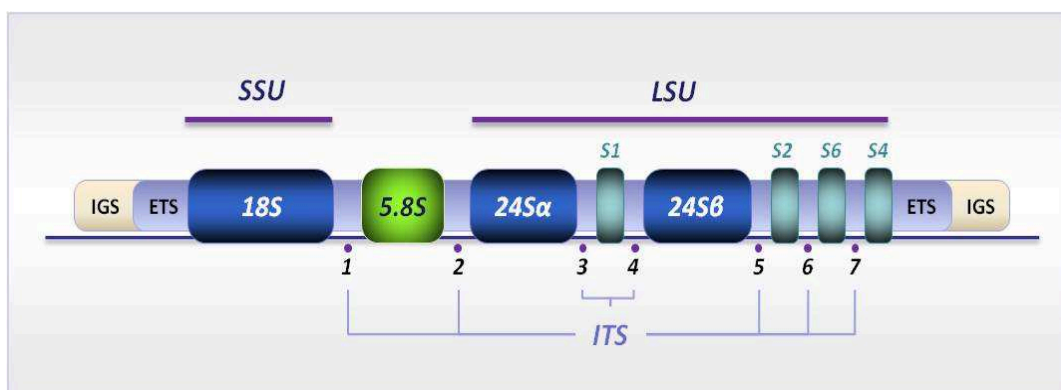
Uma grande variedade de genes, sequências e marcadores vêm sendo utilizados no diagnóstico molecular e genotipagem, bem como em inferências taxonômicas e filogenéticas dos tripanossomatídeos. Contudo, marcadores úteis, que permitam boas análises comparativas entre os táxons da família Trypanosomatidae e ao mesmo tempo compartilhados pelos diferentes grupos de pesquisa, são, numericamente, limitados. Dentre os poucos marcadores tradicionalmente utilizados com esses fins estão os genes Ribossômicos (preferentemente a região do *SSUrDNA*), *gGAPDH*, *SL* (*Spliced Leader* ou mini-exon) e alguns elementos do DNA mitocondrial (Minicírculos e os genes *Cytb* e *Cox II* dos maxicírculos).

### 1.5.1 Gene Ribossômico (*rDNA*)

Sequências do gene ribossômico têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os tripanossomatídeos, cinetoplastídeos e demais membros do filo Euglenozoa. Os tripanossomatídeos possuem uma estrutura complexa e característica, com um dos padrões mais complexos de moléculas de RNA ribossomal. O gene Ribossômico é composto por várias unidades de transcrição (cistrons ribossômicos), flanqueadas por espaçadores intergênicos (IGS) que delimitam cada unidade de repetição, já que o *rDNA* se repete em tandem mais de 100 vezes no genoma dos tripanossomatídeos (Figura 3). Cada gene Ribossômico é processado em uma única unidade de transcrição (o pré-rRNA), originando três moléculas maduras de RNA: **18S** (SSU ou subunidade menor, formada por oito regiões universalmente conservadas, U1-U8; e nove regiões altamente variáveis, V1-V9); **5.8S** e **24S** (LSU ou subunidade maior, composta por duas moléculas, 24S $\alpha$  e 24S $\beta$ , e quatro moléculas de rRNAs de baixo peso molecular, S1, S2, S4 e S6) (Figura 3). Além disso, as subunidades SSU e LSU (codificadas por sequências altamente conservadas) são intercaladas por regiões transcritas mais

polimórficas que correspondem aos espaçadores internos transcritos (ITS) e externos transcritos (ETS) do gene (Hernández et al., 1990; Sogin et al., 1986).

**Figura 3-** Representação esquemática dos genes Ribossômicos (rDNA).



Devido à presença de regiões com diferentes graus de variabilidade, os genes Ribossômicos (rDNA) são excelentes alvos para identificação de gêneros, espécies e linhagens de tripanossomas (Brisse et al., 2001; Freitas et al., 2006; Souto et al., 1996, 1999; Zingales et al., 1998, 1999). Os genes de rDNA também têm-se mostrado muito úteis para inferir relacionamentos filogenéticos porque estão presentes e são funcionalmente equivalentes em todos os organismos conhecidos (Sogin et al., 1986). Nesse sentido, diversos estudos realizados pelo nosso grupo têm validado sequências correspondentes à região V7-V8 do *SSUrDNA* como *DNA barcoding* dos cinetoplastídeos e seu uso na reconstrução das histórias evolutivas destes organismos (Cortez et al., 2006; Ferreira et al., 2007, 2008; Maia da Silva et al., 2004b; Rodrigues et al., 2006; Viola et al., 2008, 2009a,b).

Várias características do *SSUrDNA* têm contribuído para a utilização bem sucedida deste marcador, tais como o tamanho e, conseqüentemente, a facilidade de amplificação por PCR e sequenciamento, assim como a presença de domínios com diferentes graus de polimorfismo e conservação. Além disso, o gene *SSUrDNA* é o que tem o maior número de sequências, de diferentes espécies de tripanossomatídeos, disponíveis em bancos de dados, o que permite comparações simples e abrangentes entre organismos conhecidos ou recentemente descobertos. Por outro lado, sequências correspondentes aos *ITS* e *IGS* têm-se mostrado mais polimórficas e informativas que as subunidades *SSU* ou *LSU*, sendo muito úteis para estabelecer diferenças entre organismos muito relacionados. O *ITSrDNA* é composto por três regiões, *ITS1*, 5.8S (altamente conservado) e *ITS2*. As sequências dos



espaçadores internos *ITS1* e *ITS2* apresentam elevados níveis de divergência em relação às regiões *SSU* e *LSU*, sendo excelentes alvos para análises de tripanossomatídeos muito relacionados e permitem distinguir espécies do mesmo subgênero bem como linhagens, isolados e genótipos de uma mesma espécie.

Análises do *ITSrDNA* revelaram variabilidade inter e intraespecífica em *Leishmania* e *Endotrypanum* (Cupolillo et al., 2000; Kuhls et al., 2005); *T. cruzi* (Cuervo et al., 2002; Fernandes et al., 1999; Marcili et al., 2009b; Mendonça et al., 2002); *T. rangeli* (Maia da Silva et al., 2004b; 2009); diversas espécies de tripanossomas africanos (Desquesnes et al., 2001; Njiru et al., 2005; Rodrigues et al., 2008); genótipos de *T. theileri* (Rodrigues et al., 2006, 2010a); tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2007; 2008); e tripanossomas de serpentes (Viola et al., 2008; 2009a).

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

Diferentemente de outros eucariotos (cujas enzimas envolvidas na glicólise são encontradas no citosol), espécies da família Trypanosomatidae têm confinado as enzimas da via glicolítica em organelas especializadas chamadas glicossomas. A enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH) é uma delas e têm se mostrado essencial aos cinetoplastídeos (Hannaert et al., 1992). Nos genomas de *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* foram encontrados dois genes que codificam a enzima glicossômica (gGAPDH) - semelhantes aos dos demais eucariotos - e um gene que codifica a enzima citosólica (cGAPDH), este último mais relacionado a genes bacterianos (Kendall et al., 1990; Michels et al., 1986) (Figura 4). Diferenças entre as sequências desses genes foram úteis para o desenho de primers específicos que permitem amplificar apenas os genes gGAPDH. As duas cópias de gGAPDH presentes no genoma são praticamente idênticas, o que torna confiável a comparação e a análise de sequências homólogas entre as diversas espécies de tripanossomatídeos (Hamilton et al., 2005a, b, 2007).

**Figura 4-** Representação esquemática dos genes *cGAPDH* e *gGAPDH*.



Por codificarem proteínas, genes *gGAPDH* estão submetidos a pressões seletivas diferentes e menores taxas de evolução quando comparados com genes não codificadores. Assim, estes genes são muito conservados dentro de cada espécie, revelando-se excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos. Alinhamentos muito confiáveis de organismos geneticamente muito distantes têm sido construídos com sequências de genes *gGAPDH*. Estes não apresentam regiões de alinhamento ambíguo, de forma que sequências completas são utilizadas, o que evita a “seleção” de determinadas regiões, tal como ocorre nas filogenias construídas a partir dos genes Ribossômicos (*SSUrDNA*). Outra vantagem do gene *gGAPDH* é sua utilização em análises concatenadas, por exemplo com genes *SSUrDNA*. Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado que análises independentes ou combinadas de ambos os genes podem ser extremamente úteis na descrição de gêneros, subgêneros e espécies da família Trypanosomatidae (Hamilton et al., 2004, 2005a, 2009; Maslov et al., 2010; Stevens, 2008; Teixeira et al., 2011; Viola et al., 2009b).

### 1.5.3 Gene *SL* (Spliced Leader ou Mini-exon)

Em geral, os genes dos cinetoplastídeos não apresentam introns. Seus transcritos são longos RNAs policistrônicos, normalmente submetidos a um mecanismo pós-transcricional chamado "*trans-splicing*" que dá origem às moléculas maduras dos mRNAs unitários. No processamento desses mRNAs, as extremidades 5' de cada mRNA maduro ganham uma sequência de 39 nucleotídeos denominada "*Spliced Leader*" que, na verdade, corresponde ao éxon do gene *SL*, pelo que também é conhecido como Mini-exon (Agabian, 1990; Campbell et al., 2000, 2003; Hury et al., 2009; Liang et al., 2003; Mayer, Floeter-Winter, 2005).

Nos tripanossomatídeos, cada unidade de repetição do gene *SL* é formada por três regiões: o Éxon de 39 nucleotídeos com sequência altamente conservada; um Intron cuja sequência é moderadamente conservada, podendo variar entre 50-150 nucleotídeos; e uma região espaçadora ou intergênica (*SL-IR*) com variações de tamanho e de sequência entre as diversas espécies de tripanossomatídeos (Figura 5).

Devido à presença de múltiplas cópias no genoma, o gene *SL* tem sido utilizado como marcador genético para diagnóstico, identificação e caracterização de espécies da família Trypanosomatidae. Assim, diversos grupos têm evidenciado a utilidade destes marcadores em estudos taxonômicos e análises do polimorfismo genético entre organismos muito relacionados. Desta maneira, a comparação de sequências

do gene *SL* permitiu identificar espécies dos gêneros *Crithidia* (Fernandes et al., 1997; Yurchenko et al., 2008), *Endotrypanum* (Fernandes et al., 1993), *Leishmania* (Fernandes et al., 1994; Paiva et al., 2006; Serin et al., 2007; Sukmee et al., 2008), *Phytomonas* (Godoi et al., 2002; Nunes et al., 1995; Serrano et al., 1999; Teixeira et al., 1996), *Leptomonas* e *Herpetomonas* (Podlipaev et al., 2004; Westenberger et al., 2004; Yurchenko et al., 2006). O gene *SL* também foi utilizado no estudo do polimorfismo genético entre isolados de *Trypanosoma vivax* (Ventura et al., 2001), *T. rangeli* (Maia da Silva et al., 2007; Steindel et al., 1998), *T. theileri* (Rodrigues et al., 2010a) e *T. cruzi* (Brisse et al., 2001; Falla et al., 2009; Fernandes et al., 1999, 2001; Herrera et al., 2007; O'Connor et al., 2007; Souto et al., 1996).

**Figura 5-** Representação esquemática do gene *SL* (Spliced Leader).



Contudo, a utilização do gene *SL* resvala, pelo menos, em duas limitações. Em primeiro lugar, as cópias do gene de um mesmo isolado podem ser polimórficas (principalmente na região intergênica), o que dificulta a construção de alinhamentos confiáveis. Isto pode demandar a análise de um número maior de clones para chegar-se a sequências consenso e, na prática, há muitas dificuldades, desde a amplificação até o sequenciamento do gene. Em segundo lugar, tal como ocorre com as sequências do *ITSrDNA*, o polimorfismo inerente aos genes *SL* pode restringir o estudo a determinados grupos ou espécies muito próximas (Gibson et al., 2000; Rodrigues et al., 2010a; Stevens et al., 1999a).

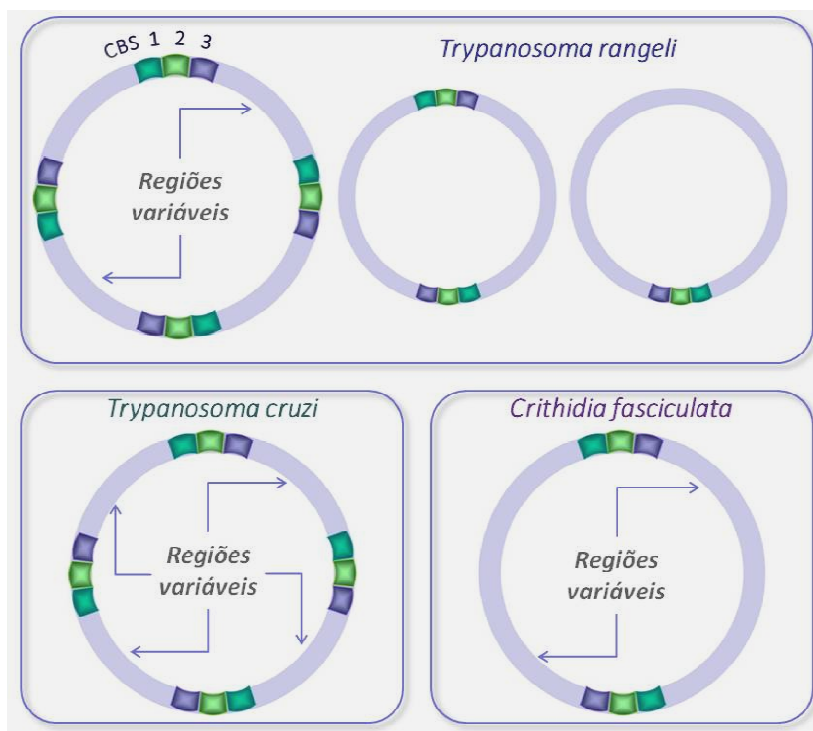
#### 1.5.4 DNA do cinetoplasto (kDNA)

O DNA do cinetoplasto ou kDNA (equivalente ao DNA mitocondrial nos demais eucariotos) representa ~20-25% do DNA celular total nos cinetoplastídeos. O cinetoplasto é uma estrutura

especializada (da única mitocôndria presente nesses organismos), na qual são condensados dois tipos de moléculas circulares de DNA, os minicírculos e os maxicírculos (Guhl, Vallejo, 2003; Myler, 1993; Stuart, 1983). Nos tripanossomatídeos, essas moléculas formam uma rede concatenada, sendo, aparentemente, típica do táxon. De fato, reconstruções filogenéticas sugerem que a origem da rede concatenada de kDNA ocorreu no ancestral da família Trypanosomatidae (Liu, Englund, 2007; Roy et al., 2007; Simpson et al., 2003).

Cada cinetoplasto pode albergar de 5.000-10.000 minicírculos que podem ser muito heterogêneos, apresentando variações nos tamanhos (0.5-1.5kb) e nas sequências, exceto por três blocos de regiões conservadas (CSB1-3), cujo número de cópias pode variar (1-4) de acordo com cada espécie de tripanossomatídeo (Figura 6). Devido ao grande número de cópias e ao polimorfismo entre espécies e/ou isolados, minicírculos de kDNA são excelentes alvos para diagnóstico por PCR e têm sido alvo de métodos altamente sensíveis para a identificação de *T. cruzi* e *T. rangeli*. (Guhl et al., 2002; Junqueira et al., 1996, 2005; Vallejo et al., 1999, 2002, 2003; Wincker et al., 1994). As funções dos minicírculos são pouco conhecidas, sabendo-se, no entanto, que produzem RNAs guias (gRNAs), envolvidos na edição dos transcritos dos maxicírculos (Simpson et al., 1987; Stuart et al., 1997; Stuart, Panigrahi, 2002).

**Figura 6-** Representação esquemática dos minicírculos de kDNA de alguns tripanossomatídeos



Já os maxicírculos são encontrados em menor quantidade (40-50) e podem variar entre 20 e 40kb. Estas moléculas são equivalentes ao DNA mitocondrial e codificam RNAs ribossomais e algumas proteínas necessárias na produção de energia. A ausência de recombinação e altas taxas de evolução fazem com que o DNA mitocondrial seja um excelente marcador para taxonomia e estudos populacionais. A taxa de evolução dos genes mitocondriais (~10 vezes superior a de um gene de cópia única nuclear) nem sempre é homogênea; alguns genes acumulam mais mutações, como os genes nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (*NADH*) e Citocromo C oxidase (*Cox II*), enquanto outros, como citocromo b (*Cyt b*), são mais conservados (Meyer, 1993).

Seqüências de *Cyt b* e *Cox II* têm sido as mais analisadas em tripanossomatídeos, principalmente em *T. cruzi* (Baptista et al., 2006; Brisse et al., 2003; D'Avila et al., 2009; Freitas et al., 2006; Machado, Ayala, 2001; Marcili et al., 2009a,b; Pena et al., 2009; Westenberger et al., 2006), mas também em outras espécies do subgênero *Schizotrypanum* (Barnabé et al., 2003; Cavazzana et al., 2010; Marcili et al., 2009b) e do gênero *Leishmania* (Lukes et al., 2007) agrupando os isolados em clados congruentes com os gerados por seqüências ribossômicas. Todos estes estudos revelaram a existência de seqüências espécie-específicas ou típicas de linhagens (dentro de uma mesma espécie), tendo potencial como marcadores taxonômicos e diagnósticos.

## 1.6 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, hidrolisam ligações peptídicas de macromoléculas proteicas, degradando-as ou produzindo peptídeos menores. São geralmente sintetizadas como precursores inativos (proformas) e posteriormente processadas, originando as formas maduras enzimaticamente ativas. Proteases têm sido identificadas em diversos sistemas biológicos, incluindo procariotos, eucariotos e vírus, e constituem um dos grupos mais complexos e heterogêneos de enzimas. Com o avanço dos projetos de sequenciamento de genomas, estima-se que proteases constituem aproximadamente 2% dos genes expressos, com algumas nuances entre organismos diferentes. Com relação à massa molecular, proteases variam desde monômeros de 10 kDa até complexos multiméricos de várias centenas de kDa (Mottram et al., 2003; Rudenskaya, Pupov, 2008; Sajid, McKerrow, 2002; Vermelho et al., 2007).

Devido à grande diversidade, proteases são classificadas com base em dois critérios principais: tipo de reação catalisada e os mecanismos catalíticos envolvidos. De acordo com o tipo de reação,

proteases podem atuar como **exopeptidases**, quando clivam ligações peptídicas próximas às regiões N-terminal ou C-terminal (aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente), e **endopeptidases** (ou proteinases), quando clivam preferentemente ligações peptídicas da região interna da cadeia polipeptídica (Barret, 1994; Barrett, McDonald, 1985,1986; Rao et al., 1998). Com base no mecanismo catalítico, cinco classes principais de proteases são definidas de acordo com o aminoácido reativo do sítio catalítico: **Serino-proteases, Aspártico-proteases, Metallo-proteases, Treonino-proteases e Cisteíno-proteases.**

### 1.7 Cisteíno-proteases de protozoários parasitas

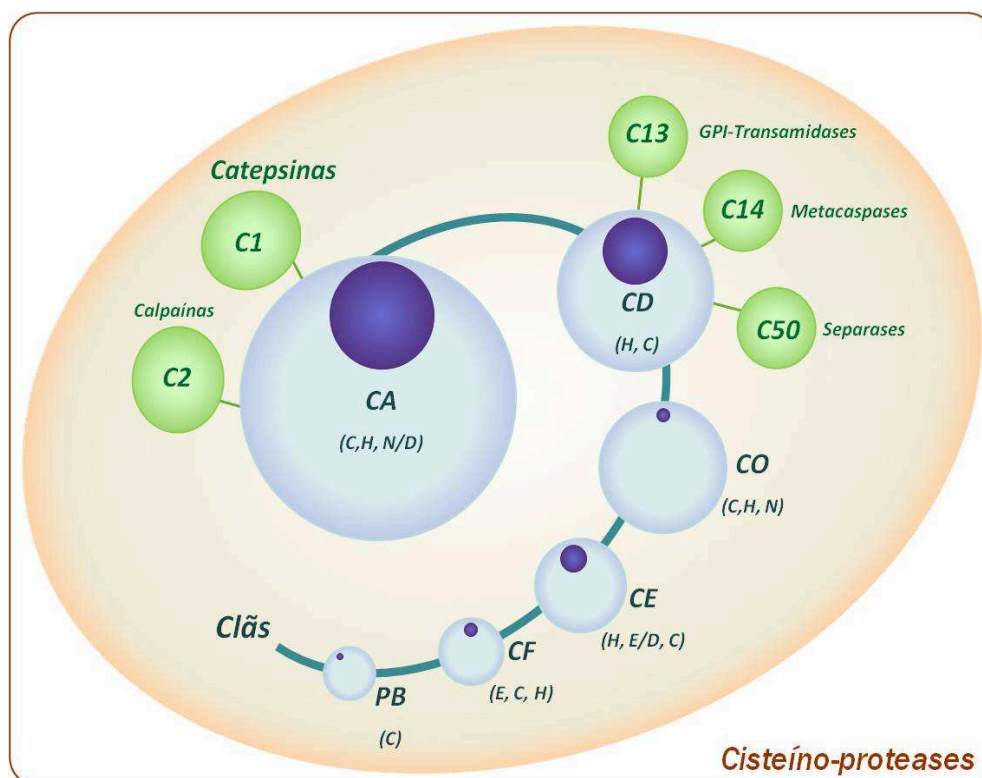
Diversos estudos têm demonstrado que cisteíno-proteases (CPs) exercem numerosas funções nos ciclos de vida dos protozoários, que abrangem atividades metabólicas e regulatórias. Desempenham papel-chave na degradação de proteínas e evasão da resposta imune do hospedeiro, e também participam da replicação, diferenciação, encistamento e desencistamento de vários parasitas, bem como na invasão celular e patogenicidade (Klemba, Goldberg, 2002; McKerrow et al., 2006; Rudenskaya, Pupov, 2008; Sajid, McKerrow, 2002). Cisteíno-proteases têm-se mostrado determinantes nos processos patogênicos de diversas doenças parasitárias causadas por protozoários, incluindo malária, leishmaniose, tripanossomíases, amebíases, toxoplasmose, giardíase, criptosporidiose, teileriose e tricomoníase (Klemba, Goldberg, 2002; McKerrow et al., 2006; Rudenskaya, Pupov, 2008; Sajid, McKerrow, 2002).

De acordo com similaridades evolutivas, estruturais e disposição dos resíduos de aminoácidos da tríade catalítica (ordem na sequência), as CPs são divididas em subgrupos denominados Clãs e estes, por sua vez, em famílias (Figura 7). Aproximadamente 12 Clãs foram descritos para classificar estas enzimas, sendo que os **Clãs CD e CA** reúnem a maior parte das CPs conhecidas. Contudo, cisteíno-proteases de Clãs minoritários têm sido reportadas em protozoários parasitas (CO, CE, CF, PB, e PC) e em vírus (CC e CB) (Mottram et al., 2003; Rudenskaya e Pupov, 2008; Sajid, McKerrow, 2002).

O **Clã CD** está representado por um número menor de proteases do que o **Clã CA** e contém proteases que são muito diferentes, tanto nas sequências dos aminoácidos quanto nas estruturas terciárias, substratos hidrolisados e funções. As proteases do **Clã CD** apresentam somente dois resíduos catalíticos: Histidina e Cisteína (H-C) (Figura 7). Neste Clã, ganham destaque algumas famílias como **C13, C50 e C14**. Na família **C13** foram classificadas as GPI-transamidases, enzimas que catalisam a união de proteínas de superfície celular às ancoras de GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) sendo particularmente

abundantes em protozoários parasitas. GPI-transamidases foram identificadas em *P. falciparum* (Delorenzi et al., 2002), *L. mexicana* (Hilley et al., 2000) e *T. brucei* (Kang et al., 2002; Lillico et al., 2003).

**Figura 7-** Representação dos principais Clãs e Famílias de Cisteíno-proteases nos protozoários



Círculos azuis representam os Clãs que reúnem a maior parte das CPs encontradas nos protozoários. Áreas em azul claro simbolizam a população de enzimas de cada Clã. Áreas em azul escuro representam –proporcionalmente– as seqüências de CPs depositadas no principal banco de dados de proteases: MEROPS. Resíduos catalíticos das enzimas de cada Clã são indicados entre parênteses. Círculos verdes correspondem às famílias representativas dos Clãs majoritários.

**FONTE:** Adaptado de Atkinson et al., 2009; Mottram et al., 2003.

Mutantes de *T. brucei* deficientes em GPI-transamidases são desprovidos de prociclina (principal proteína de superfície) e incapazes de estabelecer infecção no intestino dos vetores, confirmando a importância destas enzimas nas interações parasita-hospedeiro (Mottram et al., 2003). Outra família importante do Clã CD é a C50, que reúne as Separases, enzimas essenciais para o correto funcionamento do ciclo celular, sendo as responsáveis pela clivagem do complexo proteico que mantém unidas as cromátides irmãs até a segregação dos cromossomos durante a mitose. Sequências que codificam Separases têm sido encontradas nas bases de dados dos genomas de *T. brucei*, *L. major*, *Giardia* e *Plasmodium* (Mottram et al., 2003). Por outro lado, enzimas da família C14 como as Caspases, são muito

conhecidas porque regulam e executam apoptose ou morte celular programada em metazoários. Porém, enzimas homólogas distantes das caspases, denominadas Metacaspases, são menos conhecidas e foram identificadas apenas em plantas, fungos e protozoários (Uren et al., 2000). Genes de Metacaspases têm sido encontrados nos genomas de diversos tripanossomatídeos patogênicos, como *T.brucei* (MCA1-MCA5), *T.cruzi* (MCA3, MCA5), *Leishmania donovani* (MCA1, MCA2) e *L.major* (MCA5) (Ambit et al., 2008; Helms et al., 2006; Kosec et al., 2006 a,b; Lee et al., 2007; Szallies et al., 2002).

Alguns estudos sugerem que Metacaspases poderiam (como suas homólogas distantes) agir como agentes intermediários do processo de morte celular programada ou estar envolvidas na regulação do ciclo celular de alguns parasitas (Ambit et al., 2008; Kosec et al., 2006 a,b; Zalila et al., 2011).

O **Clã CA** é o que reúne a maioria das CPs descritas, cuja tríade catalítica é formada por resíduos de Cisteína, Histidina e Asparagina ou, em alguns casos, Ácido Aspártico (C-H-N/D) (Mottram et al., 2003). Neste Clã são encontradas as catepsinas B, C, K, L e S dos mamíferos e seus equivalentes em outros organismos, inclusive protozoários (*catepsinas-like*). Proteases do **Clã CA** estão organizadas em famílias, cada uma das quais apresentam similaridades bioquímicas, evolutivas e unidades peptídicas conservadas. A Papaína (primeira CP descrita) é o protótipo deste grupo, e as diversas proteases com sequências, estruturas e atividades similares à Papaína são denominadas “Papaína-like” (Mottram et al., 2003; Rawlings, 2007; Sajid, McKerrow, 2002).

Grande parte das CPs dos protozoários parasitas pertence ao **Clã CA** e às famílias **C1** e **C2**. A família **C1** reúne importantes enzimas “papaína-like” como as Catepsinas L e B (Toxopapaína de *T. gondii*, Falcipapaína de *P. falciparum*, Cruzipapaína de *T. cruzi* etc.) e a **C2** agrupa as enzimas intracelulares dependentes de cálcio, em conjunto conhecidas como “calpapaína-like”, visto que o protótipo (de origem humana) e as primeiras calpapaínas caracterizadas, foram encontradas principalmente em mamíferos. Porém, pouco se conhece em relação às funções biológicas que calpapaínas exercem nos parasitas. Alguns estudos sugerem envolvimento na remodelação do citoesqueleto, transdução de sinais biológicos e diferenciação celular (Jørgensen e Buchman, 2011; Mottram et al., 2003; Sajid, McKerrow, 2002; Sato, Kawashima, 2001).

### 1.7.1 Catepsinas L-like de tripanossomatídeos

Catepsinas L e B (CATL e CATB) são responsáveis pelas principais atividades proteolíticas de tripanossomatídeos. Ambas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e posteriormente

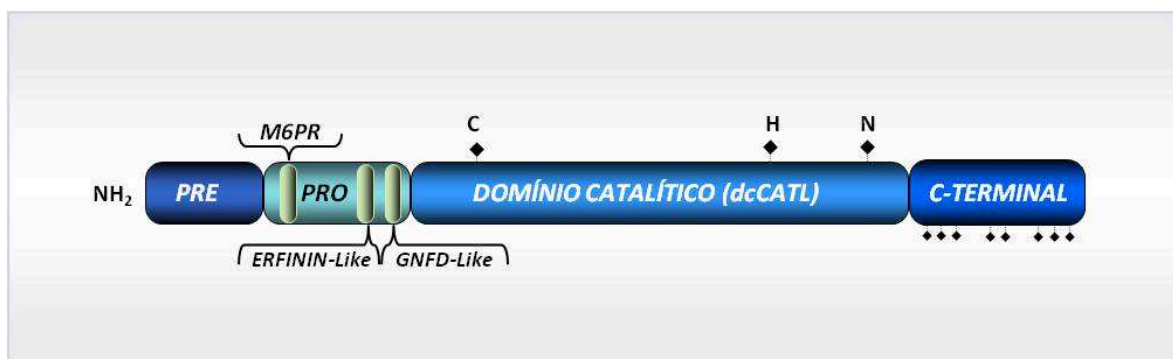


direcionadas para compartimentos intracelulares como lisossomos ou endossomos, onde ocorre a conversão das pro-catepsinas a formas maduras, cataliticamente ativas, executoras dos diversos tipos de proteólise (geralmente do tipo endopeptidase). De fato, Catepsinas L e B possuem um motivo característico no pro-domínio, que liga resíduos de manose-6-fosfato (M6PR) necessários para o direcionamento correto das enzimas até os lisossomos (Figura 8). Outras características compartilhadas por ambas as catepsinas incluem a sensibilidade ao inibidor E-64 (L-*trans*-epoxisuccinil-leucil-amido [4-guanidino] butano) e o subsítio S<sub>2</sub> definindo a especificidade pelo substrato (Sajid, McKerrow, 2002).

No entanto, **Catepsinas L-like** podem ser diferenciadas pela presença de quatro domínios principais: pré-domínio (peptídeo sinal), pro-domínio, domínio central ou catalítico e extensão C-terminal. Além disso, particularidades apenas exibidas pelas Catepsinas L permitem sua distinção de outros tipos de Catepsinas. No pro-domínio destas enzimas são observados dois motivos típicos, ERFININ-*like* e GNFD-*like* que podem apresentar algumas variações entre espécies diferentes, mas que costumam ser muito conservados entre isolados da mesma espécie ou espécies muito próximas. Já no domínio central são encontrados os resíduos catalíticos Cisteína, Histidina e Asparagina e mais um motivo conservado, o GCNGG-*like* (Ruszczuk et al., 2008a,b; Sajid, McKerrow, 2002; Turk et al., 2000).

As Catepsinas L-*like* são codificadas por famílias multigênicas, de modo que ocorrem como arranjos em *tandem*, contendo múltiplas cópias, que se comportam como unidades policistrônicas nos tripanossomatídeos. Cada unidade de repetição é formada pela região intergênica e pelos quatro domínios estruturais (pré- e pró- domínios, domínio central e a extensão C-terminal), podendo variar de 1.8 – ~2kb de acordo com cada espécie (Campetella et al., 1992; Eakin et al., 1992; Labriola, Gazzulo, 1995; Martinez et al., 1995). A porção C-terminal (que sofre auto-hidrólise) não é comum a todas as Catepsinas L-*like*, mas é característica dos tripanossomatídeos e apresenta 8 resíduos de cisteína muito conservados (Mottram et al., 1989; Souza et al., 1992).

Blocos gênicos contendo múltiplas cópias de genes *CATL* arranjados em *tandem* já foram identificados em *T. brucei*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. dionisii*, *T. rangeli* e *Leishmania* spp. De acordo com cada espécie, estes arranjos podem variar em número de cópias, localização cromossômica e tipos de sequências. Contudo, alguns arranjos se comportam como blocos gênicos homólogos e podem ser encontrados em segmentos cromossômicos totalmente sintênicos entre estas espécies (Caffrey et al., 2011; Jackson, 2007; Sajid, McKerrow, 2002).

**Figura 8-** Representação esquemática do gene de Catepsina L-like

Na figura são representados os principais motivos das Catepsinas L: Os losangos do domínio central indicam a posição dos resíduos catalíticos Cisteína (C); Histidina (H) e Asparagina (N). Os losangos da região C-terminal representam os resíduos de cisteína conservados nos tripanossomatídeos.

Aparentemente, eventos de duplicação foram responsáveis pelos blocos gênicos contendo múltiplas cópias extremamente homogêneas entre si. No entanto, em alguns parasitas foram evidenciadas (*In vitro* e/ou *In silico*) cópias diferentes – ou genes parálogos- que divergem não apenas nas sequências, mas também nas funções dos produtos codificados, gerando outras isoformas de Catepsina L-like (Lalmanach et al., 2002; Lima et al., 1994; Pillay et al., 2010).

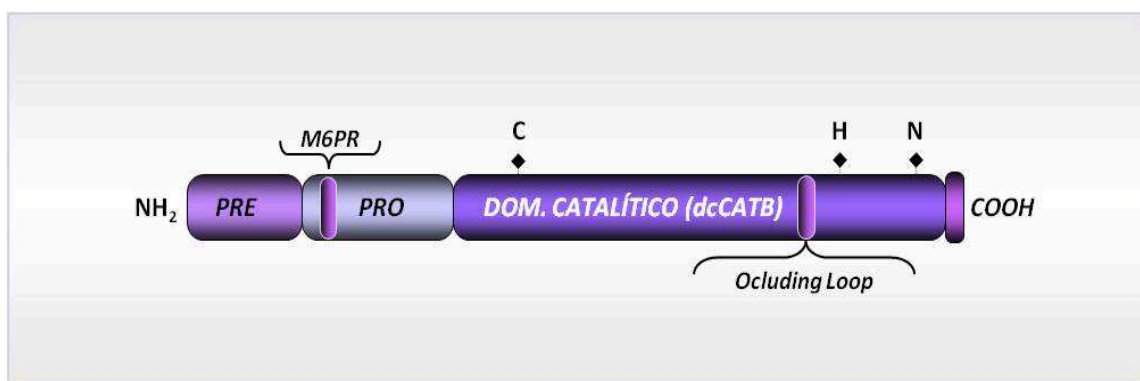
### 1.7.2 Catepsinas B-like de tripanossomatídeos

Como mencionado anteriormente, enzimas CATL e CATB compartilham várias características, como a atividade endopeptidase. No entanto, elas apresentam particularidades nas estruturas, sequências e funções dos genes que as codificam. **Catepsinas B-like** possuem apenas três domínios: pré-domínio (peptídeo sinal), pro-domínio e o domínio central ou catalítico. Diferentemente de Catepsinas L-like, a extensão C-terminal de **Catepsinas B-like** é muito curta (menos de 10 resíduos) ou inexistente. Além disso, Catepsinas B-like caracterizam-se por uma inserção peptídica no domínio catalítico, conhecida como “loop de oclusão”, responsável pela atividade de exopeptidase destas enzimas (Sajid, McKerrow, 2002; Turk et al., 2002). Portanto, diferindo de Catepsinas L-like, Catepsinas B-like exercem atividade exo- e endopeptidase, sendo capazes de clivar substratos diferentes simultaneamente (Sajid, McKerrow, 2002).

Quanto à organização genômica, estudos prévios têm sugerido que genes *CATB* são ubíquos nos tripanossomatídeos e comumente de cópia única (Caffrey et al., 2011; Mackey et al., 2004; Mort, Buttle, 1997; Nóbrega et al., 1998; Sakanari et al., 1997). Não obstante, uma exceção foi observada no genoma

de *T. congolense*, no qual foram achadas 13 variantes ou cópias do gene, dispostas em cromossomos diferentes e classificadas em dois grupos principais, um deles contendo formas canônicas da enzima (TcoCBc1-TcoCBc6) e o outro contendo cópias com triades catalíticas modificadas (TcoCBs7-TcoCBs13) (Mendoza-Palomares et al., 2008).

**Figura 9-** Representação esquemática do gene de Catepsina B-like



Na figura são representados os principais motivos das Catepsinas B: Os losangos do domínio central indicam a posição dos resíduos catalíticos Cisteína (C); Histidina (H) e Asparagina (N).

### 1.7.3 Catepsinas mais estudadas em *Trypanosoma* spp.

Apesar das evidências sugerirem ou mesmo demonstrarem o envolvimento das Catepsinas em eventos essenciais nos ciclos de vida dos tripanossomas, poucas enzimas têm sido estudadas em detalhe ou exploradas como marcadores moleculares. A maioria dos estudos têm se concentrado na análise de Catepsinas L-like de tripanossomas patogênicos, enquanto o estudo de Catepsinas B-like tem se limitado a *Leishmania* spp. e *Trypanosoma congolense*. Apesar de bem caracterizadas, Catepsinas L-like de tripanossomas de importância médica ou veterinária requerem novos estudos voltados a entender o repertório, o polimorfismo e as funções na interação parasita-hospedeiro, áreas praticamente desconhecidas.

Em tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma*, as cisteíno-proteases mais estudadas são as tripanopainas (Brucipaina e Rhodesaina de *T. brucei brucei* e *T. b. rhodesiense* respectivamente), as congopainas (CATL-like de *T. congolense*), as cruzipainas (CATL-like de *T. cruzi*) e as Rangelipainas (CATL-like de *T. rangeli*) (Cazzulo et al., 2001; Klemba, Goldberg, 2002; Kosec et al., 2006 a,b; Lalmanach et al., 2002; Martinez et al., 1995; McKerrow et al., 2006; Mottram et al., 1998, 2003; Rosenthal, 1999; Sajid, McKerrow, 2002; Tanaka et al., 1994).

**1.7.3.1 Tripanopáinas:** Brucipáinas e Rhodesáinas (98,4% de similaridade na sequência de aminoácidos) são as Catepsinas L-like predominantes em *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense*. Quanto aos genes que codificam essas duas enzimas, mais de 20 cópias dispostas em *tandem* estão presentes nos respectivos genomas (Rosenthal, 1999). Diferenças nos níveis de expressão de genes *CATL* foram observadas de acordo com o estágio dos parasitas e algumas evidências sugeriram participação em eventos importantes, como: a) a diferenciação das formas sanguíneas no inseto vetor, favorecendo a sobrevivência do parasita na mosca tsé-tsé; b) a liberação da capa de VSG durante a diferenciação das formas sanguíneas para as formas procíclicas; c) a patogênese para o hospedeiro vertebrado, uma vez que genes *CATL* são expressos preferentemente pelas formas sanguíneas; d) a sobrevivência das formas sanguíneas, já que inibidores específicos de Catepsinas L podem acarretar a morte dos parasitas; e) a invasão do sistema nervoso central do hospedeiro pelo *T. b. gambiense* (Caffrey et al., 2001; Mackerrow et al., 1993; Nikolskaia et al., 2006; Okenu et al., 1999; Pamer et al., 1991).

**1.7.3.2 Congopáinas:** Pelo menos duas isoformas de Catepsina L-like, Cisteíno-protease 1 (CP1) e Cisteíno-protease 2 (CP2 ou Congopáina) foram identificadas em *Trypanosoma congolense*. Uma comparação das sequências deduzidas de aminoácidos, revelou que os pre- e pro-domínios destas enzimas são idênticos. Entretanto, substituições não sinônimas foram observadas no domínio catalítico e na extensão C-terminal, apresentando divergências de 14% e 10% respectivamente (Boulangé et al., 2001). As enzimas do tipo CP2, também conhecidas como Congopáinas, são as formas majoritárias e os antígenos imunodominantes em gado infectado com *T. congolense*. No entanto, algumas raças de gado tripanotolerante, tais como N'Dama, possuem a capacidade natural de controlar as parasitemias bem como as patologias induzidas pelos parasitas. Coincidentemente, raças tripanotolerantes a *T. congolense* apresentam títulos altos de anticorpos IgG anti-congopáina (Authié et al., 1994), os quais são capazes de inibir a atividade proteolítica de CP2. Além disso, análises da resposta imune-humoral de gado suscetível e tripanotolerante infectado com *T. congolense* sugeriram uma relação direta entre a produção de anticorpos anti-congopáina e o aumento da resistência à tripanossomíase.

**1.7.3.3 Cruzipáinas:** Cruzipáinas, cisteíno-proteases do tipo Catepsina L-like presentes em *Trypanosoma cruzi* (Cazullo et al., 2001), são enzimas expressas diferencialmente nos diversos estágios do ciclo celular. Níveis maiores de atividade são detectados em epimastigotas, enquanto que em tripomastigotas e amastigotas a atividade é cerca de 10 vezes menor (Campetella et al., 1992; Tomás, Kelly, 1996). Apesar

disto, os níveis de mRNA são similares em todos os estágios evolutivos, indicando que a regulação da expressão deve ocorrer em níveis traducionais ou pós-traducionais (Tomás, Kelly, 1996).

De maneira similar a *T. congolense*, *Trypanosoma cruzi* apresenta pelo menos duas isoformas de Catepsinas L-like, denominadas Cruzipaína 1 e Cruzipaína 2, sendo a primeira a forma majoritária ou imunodominante. Diversos estudos sugerem o envolvimento de Cruzipaína 1 na replicação das formas amastigotas, assim como na diferenciação das formas tripomastigotas para amastigotas. Outras evidências sugerem sua participação na metacicloênese, na patogênese e em diversos mecanismos de evasão (Aparício et al., 2004; Bontempi e Cazzulo, 1990; Burleigh et al., 2002; Costales, Rowland, 2007; Giordanengo et al., 2000; McKerrow et al., 2006). Genes que codificam Cruzipaína 1 estão organizados em repetições em *tandem*, com cerca de 60-100 cópias em mais de um cromossomo (Campetella et al., 1992; Rosenthal, 1999). Por outro lado, Cruzipaína 2 (mais expressa em tripomastigotas e amastigotas) difere de Cruzipaína 1 na especificidade pelo substrato, nos parâmetros cinéticos, na porção C-terminal e, provavelmente, em modificações pós-traducionais. O genoma de *T. cruzi* apresenta ~6 cópias do gene que codifica Cruzipaína 2 (Lima et al., 1994, 2001).

**1.7.3.4 Rangelipainas:** Genes que codificam CPs similares à Cruzipaína1 foram detectados em *T. rangeli* (Martínez et al., 1995; Tanaka et al., 1994) e os produtos de expressão também apresentavam pesos moleculares similares. No entanto, níveis inferiores de mRNA foram detectadas nas formas epimastigotas de *T. rangeli*. Além disso, análises da atividade proteolítica das rangelipainas corroboraram a presença de genes com sequências homólogas às Cruzipaínas, porém, com atividade enzimática menos evidente em relação a *T. cruzi* (Labriola, Cazzulo, 1995). Estes estudos também demonstraram que Genes *CATL* de *T. rangeli* estão organizados em *tandem* com unidades de repetição de ~1.9kb, presentes em dois arranjos principais com ~75 cópias por genoma. No entanto, as localizações cromossômicas destes genes poderiam variar de acordo com cada isolado (Labriola e Cazzulo, 1995; Martinez et al., 1995; Toaldo et al., 2001). Apesar de genes *CATL* terem sido identificados e caracterizados em *T. rangeli*, o papel das Rangelipainas assim como seu repertório e polimorfismo são completamente desconhecidos.

## 1.8 Genes de Catepsinas L e B-like como marcadores filogenéticos

Em geral, Catepsinas-like são excepcionalmente imunogênicas, razão pela qual têm sido muito exploradas como marcadores sorológicos e para o desenvolvimento de drogas e vacinas contra diversas

doenças parasitárias. Nos tripanossomatídeos, as enzimas mais estudadas com esses propósitos têm sido as Catepsinas L-like de *Leishmania* spp., *T. cruzi*, *T. congolense* e *T. brucei* (Sajid, McKerrow, 2002). Genes que codificam estas enzimas também têm sido explorados como marcadores moleculares para o diagnóstico de tripanossomas, devido ao grande número de cópias, facilidade de amplificação por PCR e o polimorfismo das sequências entre espécies diferentes e/ou muito relacionadas (Cortez et al., 2009, Tanaka, 1997). No entanto, genes *CATL* e *CATB* têm sido pouco explorados como marcadores filogenéticos, apesar do potencial que possuem para a reconstrução de histórias evolutivas. Considerando as funções que as Catepsinas L e B-like desempenham em cada parasita, é provável que os genes que as codificam estejam submetidos a diferentes pressões seletivas, e deste modo, informações particulares de cada espécie poderiam ser extraídas das sequências de ambos os genes.

Catepsinas em geral, apresentam sequências de aminoácidos e conformações similares e, dados estruturais suportam uma origem comum para estas proteínas (Turk et al., 2002). Por outro lado, análises filogenéticas incluindo uma grande diversidade de sequências do tipo Papaína-like (helmintos, protozoários, plantas, crustáceos, mamíferos etc.) também sugeriram uma origem comum para estas enzimas, revelando ainda a formação de quatro grupos principais: (i) Catepsinas B, (ii) Catepsinas L de origem vegetal (iii) Catepsinas L de origem animal e (iv) Catepsinas L de protozoários (Berti, Storer, 1995; Kirschke et al., 1998). Estes resultados corroboram a homologia e ubiquidade destes genes, fatores importantes na escolha de marcadores moleculares para estudos evolutivos.

A maior parte das filogenias inferidas para compreender a história evolutiva e as estruturas populacionais dos tripanossomatídeos têm sido baseadas principalmente em sequências de DNA não codificadoras, principalmente dos genes ribossômicos (*SSUrDNA* ou *LSUrDNA*) e Spliced Leader (*SL* ou Mini-exon) (De Freitas et al., 2006; Hamilton et al., 2004, 2007; Simpson et al., 2006; Stevens, Gibson 1999a,b; Stevens et al., 2001). No entanto, diversos estudos têm demonstrado a importância de genes codificadores de proteínas como marcadores filogenéticos para resolver politomias e gerar filogenias com suportes estatísticos mais robustos. Nos tripanossomatídeos, o gene *gGAPDH* tem sido bastante empregado com essa finalidade (Hamilton et al., 2005, 2007, 2009, 2012b; Simpson et al., 2006). Outros estudos têm analisado genes de múltiplas cópias, codificadores de proteínas, para análises filogenéticas de tripanossomatídeos (Jackson, 2007) e populações de *T. cruzi* (Cerqueira et al., 2008).

Nos últimos anos, genes *CATL* e *CATB* têm sido utilizados em análises filogenéticas, porém, estudos evolutivos baseados em genes *CATB* focaram-se principalmente em helmintos (Ranjit et al., 2008; Rehman, Jasmer, 1999), sendo ainda pouco explorados em estudos filogenéticos de protozoários (Dacks

et al., 2008). De fato, estudos de genes *CATB* nos tripanossomatídeos têm-se limitado a *Leishmania* (Sakanari et al., 1997) e *T. congolense* (Mendoza-Palomares et al., 2008). Por outro lado, estudos de genes *CATL* são ainda esporádicos e a maioria foi desenvolvida nos últimos anos. Além de espécies de helmintos (Kongkerd et al., 2008; Robinson et al., 2008), genes *CATL* foram explorados em estudos evolutivos de alguns cinetoplastídeos: *Leishmania* spp., *Cryptobia salmositica*, *Trypanoplasma borreli* e *T. vivax* (Cortez et al., 2009; Jesudhasan et al., 2007; Kuru et al., 2007; Ruszczuk et al., 2008a,b; Sakanari et al., 1997).

Apesar de múltiplas cópias de genes *CATL* (facilitando a amplificação por PCR) e da disponibilidade de sequências *CATL* de várias espécies de tripanossomas nos bancos de dados, as relações evolutivas entre eles ainda não foram analisadas. Embora restritos a um pequeno número de espécies, estudos prévios demonstraram congruências entre as filogenias tradicionais e as inferidas com genes *CATL*, tanto de helmintos quanto de protozoários, sugerindo que esses genes são bons marcadores para estudos evolutivos.

Embora sequências codificadoras presentes em uma única cópia ou poucas cópias no genoma sejam as mais indicadas para estudos filogenéticos, estas geralmente apresentam um alto grau de conservação, dificultando, às vezes, a análise de organismos muito relacionados como, por exemplo, isolados de uma mesma espécie e até espécies de um mesmo gênero. Em contraste, famílias multigênicas compostas por várias cópias do mesmo gene, apresentam um grande potencial em estudos de estrutura de populações e relações filogenéticas, mesmo entre organismos estreitamente relacionados (Cerqueira et al., 2008; Jackson, 2007).

Catepsinas L-like de tripanossomatídeos são codificadas por famílias multigênicas, com genes presentes em múltiplas cópias organizadas em *tandem*, geradas por sucessivas duplicações gênicas. Genes homólogos à Cruzipaína têm sido descritos em diversos tripanossomas de mamíferos (*T. brucei brucei*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. cruzi* e *T. rangeli*) e no tripanossoma de peixe *T. carassii*. Análises filogenéticas realizadas pelo nosso grupo, incluindo as sequências de genes *CATL* destas espécies além dos bodonídeos *Cryptobia salmositica* e *Trypanoplasma borreli*, confirmaram o potencial dos genes *CATL* como marcadores para estudos evolutivos nos cinetoplastídeos (Cortez et al., 2009; Jesudhasan et al., 2007; Kuru et al., 2007; Ruszczuk et al., 2008a,b; Sakanari et al., 1997). Em geral, filogenias inferidas com genes *CATL* geraram clados que refletem a filogenia das espécies, mostrando-se congruentes com filogenias baseadas em sequências de *SSUrDNA* e

gGAPDH (Cortez et al., 2006; Hamilton et al., 2005, 2007, 2009, 2012b; Rodrigues et al., 2008; Stevens et al., 2001).

Estudos com outros parasitas também apoiam o potencial de genes *CATL* como marcadores filogenéticos. Assim, sequências de genes *CATL* foram utilizadas para analisar os relacionamentos filogenéticos entre genes *CATL* de *Fasciola* spp. Os resultados mostraram uma grande diversidade de sequências ou isoformas de *CATL* nestes parasitas e a formação de um grupo monofilético composto por clados que refletem a diversidade funcional das enzimas, a virulência dos isolados e a adaptação de cada espécie a seus hospedeiros (Robinson et al., 2008). Análises filogenéticas de genes *CATL* do nematóide *Gnathostoma spinigerum* revelaram um relacionamento compatível com a divergência de espécies quando comparadas com genes homólogos de outros nematóides (Kongkerd et al., 2008). Em todos esses estudos, as relações filogenéticas de genes de *CATL* refletem, aparentemente, a adaptação e a especiação dos parasitas.



## 5 CONCLUSÃO.

- \* Análises filogenéticas derivadas dos genes *CATB* e *CATL* segregaram as espécies de tripanossomas de mamíferos analisadas em quatro Clados principais: *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. theileri* e *T. lewisi* como previamente descrito com genes SSUrDNA e gGAPDH. Nossos resultados evidenciaram a utilidade de ambos os genes como marcadores filogenéticos para estudos evolutivos da família Trypanosomatidae.
- \* Análises do polimorfismo genético e organização genômica de genes *CATL* revelaram a utilidade destes marcadores no desenvolvimento de métodos diagnósticos altamente sensíveis para *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, *T. theileri* e *T. congolense*.
- \* Análises filogenéticas intraespecíficas derivadas dos genes *CATB* e *CATL* evidenciaram a importância destes marcadores no estudo da estrutura populacional de *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. dionisii*, *T. marinkellei*, *T. theileri* e *T. congolense*.
- \* Análises filogenéticas concatenadas e individuais derivadas dos genes *CATL* e *CATB* suportam a hipótese “*Bat seeding*” (previamente apoiada por filogenias derivadas de genes SSUrRNA e gGAPDH) a qual sugere uma origem comum (triplanossomas de morcegos) para todas as espécies do Clado *T. cruzi*, que foram segregadas em dois grupos principais: Os subclados *Schizotrypanum* e *T. rangeli/T. conorhini*. Nossos resultados suscitam novas perspectivas sobre a evolução de *T. cruzi* e *T. rangeli* e sugerem que ambos os grupos poderiam ter evoluído de maneira independente para se tornar parasitas generalistas de mamíferos, incluindo o homem, nas Américas.

## REFERÊNCIAS\*

- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitol.* 2010 Jul;26(7):324-8.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012 Sep;59(5):429-93.
- Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1157-60.
- Alvarez F, Cortinas MN, Musto H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of Trypanosoma. *Mol Phylogenet Evol.* 1996 Apr;5(2):333-43.
- Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ.* 2008 Jan;15(1):113-22.
- Aparicio IM, Scharfstein J, Lima AP. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by Trypanosoma cruzi requires trypomastigote membranes. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):5892-902.
- Atkinson HJ, Babbitt PC, Sajid M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends Parasitol.* 2009 Dec;25(12):573-81.
- Austen JM, Jefferies R, Friend JA, Ryan U, Adams P, Reid SA. Morphological and molecular characterization of Trypanosoma copemani n. sp. (Trypanosomatidae) isolated from Gilbert's potoroo (Potorous gilbertii) and quokka (Setonix brachyurus). *Parasitology.* 2009 Jun;136(7):783-92.
- Authie E. Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle: a role for congopain? *Parasitol Today.* 1994 Sep;10(9):360-4.
- Baptista CS, Vencio RZ, Abdala S, Carranza JC, Westenberger SJ, Silva MN, et al. 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 Dec;150(2):236-48.
- Barnabe 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 Feb;2(3):201-8.
- Barrett AJ. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 1994;244:1-15.
- Barrett AJ, McDonald JK. Nomenclature: a possible solution to the 'peptidase anomaly'. *Biochem J.* 1985 Nov 1;231(3):807.
- Barrett AJ, McDonald JK. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J.* 1986 Aug 1;237(3):935.

---

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

- Berti PJ, Storer AC. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol.* 1995 Feb 17;246(2):273-83.
- Bontempi E, Cazzulo JJ. Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Aug;58(3):337-41.
- Bose R, Friedhoff KT, Olbrich S, Buscher G, Domeyer I. Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. *Parasitol Res.* 1987;73(5):421-4.
- Boulangé A, Serveau C, Brillard M, Minet C, Gauthier F, Diallo A, et al. Functional expression of the catalytic domains of two cysteine proteinases from *Trypanosoma congolense*. *Int J Parasitol.* 2001 Nov;31(13):1435-40.
- Braun U, Rogg E, Walser M, Nehrbass D, Guscetti F, Mathis A, et al. *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *Vet Rec.* 2002 Jan 5;150(1):18-9.
- Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. *J Eukaryot Microbiol.* 2007 Jan-Feb;54(1):86-92.
- Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, et al. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2003 Feb;2(3):173-83.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001 Sep;31(11):1218-26.
- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 2002 Nov;4(11):701-11.
- Busse I, Preisfeld A. Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene.* 2002 Feb 6;284(1-2):83-91.
- 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 Mar;53(Pt 2):617-24.
- Caffrey CR, Hansell E, Lucas KD, Brinen LS, Alvarez Hernandez A, Cheng J, et al. Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Nov;118(1):61-73.
- Caffrey CR, Lima AP, Steverding D. Cysteine peptidases of kinetoplastid parasites. *Adv Exp Med Biol.* 2011;712:84-99.
- Callahan HA, Litaker RW, Noga EJ. Molecular taxonomy of the suborder Bodonina (Order Kinetoplastida), including the important fish parasite, *Ichthyobodo necator*. *J Eukaryot Microbiol.* 2002 Mar-Apr;49(2):119-28.
- Camargo EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964 May-Jun;6:93-100.
- Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol Today.* 2000 Feb;16(2):78-82.

- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* 2003 Nov;5(13):1231-40.
- Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frascch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Feb;50(2):225-34.
- Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proc Biol Sci.* 2004 Jun 22;271(1545):1251-62.
- Cavazzana M, Jr., Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 2010 Mar 1;40(3):345-55.
- Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: A valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Design.* 2001 Aug;7(12):1143-56.
- Cerqueira GC, Bartholomeu DC, DaRocha WD, Hou L, Freitas-Silva DM, Machado CR, et al. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008 Jan;157(1):65-72.
- Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes.* 2009 Feb;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. *Parasitology.* 2006 Aug;133(Pt 2):159-69.
- Costales J, Rowland EC. A role for protease activity and host-cell permeability during the process of *Trypanosoma cruzi* egress from infected cells. *J Parasitol.* 2007 Dec;93(6):1350-9.
- 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 Sep;97(6):877-80.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000 Apr;16(4):142-4.
- D' Alessandro A, Behr MA. *Trypanosoma lewisi* and its relatives. Kreier JP, Baker JR, editors. New York: Academic Press; 1991.
- Dacks JB, Kuru T, Liapounova NA, Gedamu L. Phylogenetic and primary sequence characterization of cathepsin B cysteine proteases from the oxymonad flagellate *Monocercomonoides*. *J Eukaryot Microbiol.* 2008 Jan-Feb;55(1):9-17.
- D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1718-25.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Goncalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2006 Mar;2(3):e24.

- de Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Prog Histochem Cytochem*. 2009;44(2):67-124.
- Delorenzi M, Sexton A, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Speed T, Schofield L. Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4510-22.
- Desquesnes M, McLaughlin G, Zougrana A, Davila AM. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol*. 2001 May 1;31(5-6):610-4.
- Dolezel D, Jirku M, Maslov DA, Lukes J. Phylogeny of the bodonid flagellates (Kinetoplastida) based on small-subunit rRNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000 Sep;50 Pt 5:1943-51.
- Dyková I, Fiala I, Lom J, Lukes J. Perkinsiella amoebae-like endosymbionts of *Neoparamoeba* spp., relatives of the kinetoplastid *Ichthyobodo*. *Eur J Protistol*. 2003;39(1):37-52.
- Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 1992 Apr 15;267(11):7411-20.
- 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 Apr;110(1):15-21.
- Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasit Vectors*. 2013;6(1):313.
- Fernandes O, Degraeve W, Campbell DA. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. *Parasitology*. 1993 Sep;107 ( Pt 3):219-24.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. 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. *Parasitology*. 1999 Feb;118 ( Pt 2):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 Aug;66(2):261-71.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, Junqueira AC, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;95(1):97-9.
- Fernandes O, Teixeira MM, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraeve WM, et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Eukaryot Microbiol*. 1997 Nov-Dec;44(6):535-9.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*. 2007 Oct;134(Pt 11):1623-38.

- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, et al. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Eukaryot Microbiol.* 2008 Sep-Oct;55(5):427-35.
- Flegontov P, Votycka J, Skalicky T, Logacheva MD, Penin AA, Tanifuji G, et al. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol.* 2013 Sep 23;23(18):1787-93.
- Garcia HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AH, Campaner M, Nunes VL, et al. Multilocus phylogeographical analysis of Trypanosoma (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *Int J Parasitol.* 2011 Nov;41(13-14):1385-96.
- Gardiner P, Musa M. Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside Sub Sahara, Africa. Kreier JP, editor. San Diego: Academic Press; 1992.
- Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Apr 15;107(2):269-77.
- Giordanengo L, Fretes R, Diaz H, Cano R, Bacile A, Vottero-Cima E, et al. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Muscle Nerve.* 2000 Sep;23(9):1407-13.
- 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 Jul-Aug;49(4):275-9.
- Gruby D. Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, Trypanosoma sanguinis. Sci CRA, editor. Paris 1843.
- Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular characterization and diagnosis of trypanosoma cruzi and T. rangeli. *Arch Med Res.* 2002 Jul-Aug;33(4):362-70.
- Guhl F, Vallejo GA. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Jun;98(4):435-42.
- Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):443-52.
- Haag J, O'Huigin C, Overath P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 Mar 1;91(1):37-49.
- Hamilton PB, Adams ER, Malele, II, Gibson WC. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the Trypanosoma brucei subgenus, Trypanozoon. *Infect Genet Evol.* 2008 Jan;8(1):26-33.
- Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the Trypanosoma cruzi clade in African terrestrial mammals. *Infect Genet Evol.* 2009 Jan;9(1):81-6.
- Hamilton PB, Cruickshank C, Stevens JR, Teixeira MM, Mathews F. Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. *Mol Phylogenet Evol.* 2012b May;63(2):521-6.

- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol Phylogenet Evol.* 2007 Jul;44(1):15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 2004 Nov;34(12):1393-404.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol.* 2005a Apr 1;35(4):431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol Ecol.* 2005b Sep;14(10):3167-75.
- Hamilton PB, Teixeira MM, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol.* 2012a Apr;28(4):136-41.
- Hampel V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AG, et al. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 10;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 Oct;55(1-2):115-26.
- Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *J Mol Evol.* 1998 Dec;47(6):728-38.
- Hashimoto T, Nakamura Y, Kamaishi T, Adachi J, Nakamura F, Okamoto K, et al. Phylogenetic place of kinetoplastid protozoa inferred from a protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Mar;70(1-2):181-5.
- Helms MJ, Ambit A, Appleton P, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC. Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. *J Cell Sci.* 2006 Mar 15;119(Pt 6):1105-17.
- Hernandez R, Rios P, Valdes AM, Pinero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Jun;41(2):207-12.
- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007 Jul;7(4):535-9.
- Hilley JD, Zawadzki JL, McConville MJ, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell.* 2000 Apr;11(4):1183-95.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford, In: Blackwell Scientific Publications; 1972, 750pp.

- Howie S, Guy M, Fleming L, Bailey W, Noyes H, Faye JA, et al. A Gambian infant with fever and an unexpected blood film. *PLoS Med.* 2006 Sep;3(9):e355.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001 Aug;17(8):754-5.
- 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.* 2003a Apr;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 Jan;8(1):56-68.
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* 2006 Feb;23(2):254-67.
- Jackson AP. Tandem gene arrays in *Trypanosoma brucei*: comparative phylogenomic analysis of duplicate sequence variation. *BMC Evol Biol.* 2007;7:54.
- Jackson AP, Allison HC, Barry JD, Field MC, Hertz-Fowler C, Berriman M. A cell-surface phylome for African trypanosomes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2121.
- Jesudhasan PR, Tan CW, Hontzeas N, Woo PT. A cathepsin L-like cysteine proteinase gene from the protozoan parasite, *Cryptobia salmositica*. *Parasitol Res.* 2007 Mar;100(4):881-6.
- Jorgensen L, Buchmann K. Cysteine proteases as potential antigens in antiparasitic DNA vaccines. *Vaccine.* 2011 Aug 5;29(34):5575-83.
- Jorgensen LV, Buchmann K. Cysteine proteases as potential antigens in antiparasitic DNA vaccines. *Vaccine.* 2011 Aug 5;29(34):5575-83.
- Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Mar-Apr;90(2):129-32.
- Junqueira AC, Degraeve W, Brandao A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* 2005 Jun;21(6):270-2.
- Kang X, Szallies A, Rawer M, Echner H, Duszenko M. GPI anchor transamidase of *Trypanosoma brucei*: in vitro assay of the recombinant protein and VSG anchor exchange. *J Cell Sci.* 2002 Jun 15;115(Pt 12):2529-39.
- Karbowiak G, Wita I, Rychlik L. *Trypanosoma (Megatrypanum) ornata* sp n., a parasite of the Eurasian water shrew *neomysfodiens* (Pennant, 1771). *Acta Protozool.* 2005 Nov;44(4):363-7.
- Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *EMBO J.* 1990 Sep;9(9):2751-8.
- Kingston N, Morton JK. *Trypanosoma cervi* sp. n. from elk (*Cervus canadensis*) in Wyoming. *J Parasitol.* 1975 Feb;61(1):17-23.



- Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND. Lysosomal cysteine proteases. 2 ed. Press OU, editor. Oxford 1997.
- Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:275-305.
- Kongkerd N, Uparanukraw P, Morakote N, Sajid M, McKerrow JH. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Gnathostoma spinigerum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008 Aug;160(2):129-37.
- Kosec G, Alvarez V, Cazzulo JJ. Cysteine proteinases of *Trypanosoma cruzi*: from digestive enzymes to programmed cell death mediators. *Biocell.* 2006 Dec;30(3):479-90.
- Kosec G, Alvarez VE, Agüero F, Sanchez D, Dolinar M, Turk B, et al. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Jan;145(1):18-28.
- Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schonian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 2005 Aug-Sep;7(11-12):1224-34.
- Kuru T, Jirata D, Genetu A, Barr S, Mengistu Y, Aseffa A, et al. *Leishmania aethiopia*: identification and characterization of cathepsin L-like cysteine protease genes. *Exp Parasitol.* 2007 Mar;115(3):283-90.
- Labriola C, Cazzulo JJ. Purification and partial characterization of a cysteine proteinase from *Trypanosoma rangeli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Jun 15;129(2-3):143-8.
- Lake JA, de la Cruz VF, Ferreira PC, Morel C, Simpson L. Evolution of parasitism: kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(13):4779-83.
- Lalmanach G, Boulange A, Serveau C, Lecaille F, Scharfstein J, Gauthier F, et al. Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate. *Biol Chem.* 2002 May;383(5):739-49.
- Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyan A, Debrabant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell.* 2007 Oct;6(10):1745-57.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell.* 2003 Oct;2(5):830-40.
- Lillico S, Field MC, Blundell P, Coombs GH, Mottram JC. Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8. *Mol Biol Cell.* 2003 Mar;14(3):1182-94.
- Lima AP, dos Reis FC, Serveau C, Lalmanach G, Juliano L, Menard R, et al. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Apr 25;114(1):41-52.
- Lima AP, Tessier DC, Thomas DY, Scharfstein J, Storer AC, Vernet T. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994 Oct;67(2):333-8.
- Lima L, Espinosa-Alvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, et al. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):221.

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

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

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

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

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 29;104(22):9375-80.

Machado CA, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7396-401.

Mackey ZB, O'Brien TC, Greenbaum DC, Blank RB, McKerrow JH. A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2004 Nov 12;279(46):48426-33.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JHS, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*. 2009 Apr;136(4):411-23.

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

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

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

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

Mansfield JM. Non-pathogenic trypanosomes of mammals. Kreier JP, editor. New York: Academic Press; 1977.

Maraghi S, Molyneux DH, Wallbanks KR. Differentiation of rodent trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma* by lectins. *Trop Med Parasitol*. 1989 Sep;40(3):273-8.

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

Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol*. 2009b Dec;9(6):1265-74.

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

Martinez J, Henriksson J, Rydaker M, Cazzulo JJ, Pettersson U. Genes for cysteine proteinases from *Trypanosoma rangeli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1995 Jun 15;129(2-3):135-41.

Martinkovic F, Matanovic K, Rodrigues AC, Garcia HA, Teixeira MM. *Trypanosoma* (Megatrypanum) *melophagium* in the sheep ked *Melophagus ovinus* from organic farms in Croatia: phylogenetic inferences support restriction to sheep and sheep keds and close relationship with trypanosomes from other ruminant species. *J Eukaryot Microbiol*. 2012 Mar-Apr;59(2):134-44.

Maslov DA, Simpson L. Evolution of Parasitism in Kinetoplastid Protozoa. *Parasitology Today*. 1995 Jan;11(1):30-2.

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

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

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

McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol-Mech*. 2006;1(1):497-536.

McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*. 1993;47:821-53.

Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology*. 2002 Feb;124(Pt 2):177-84.

Mendoza-Palomares C, Biteau N, Giroud C, Coustou V, Coetzer T, Authie E, et al. Molecular and biochemical characterization of a cathepsin B-like protease family unique to *Trypanosoma congolense*. *Eukaryot Cell*. 2008 Apr;7(4):684-97.

Meyer A. *Evolution of mitochondrial DNA in fishes*. Hochacka P, Mommsen TP, editors. Canada: Elsevier Science Publishers B.V.; 1993.

Michels PA, Poliszczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, Wierenga RK, et al. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*. 1986 May;5(5):1049-56.

Molyneux DH. The morphology and biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *evotomys* of the bank-vole, *Clethrionomys glareolus*. *Parasitology*. 1969 Nov;59(4):843-57.

Molyneux DH. *Trypanosomes of Bats*. Kreier JP, Baker JR, editors. New York: Academic Press; 1991.

Moreira D, Lopez-Garcia P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(Pt 5):1861-75.

Moreira D, von der Heyden S, Bass D, Lopez-Garcia 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 Jul;44(1):255-66.

Mort JS, Buttle DJ. Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 May;29(5):715-20.

Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 1998 Aug;1(4):455-60.

Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol*. 2003 Apr;19(4):182-7.

Mottram JC, North MJ, Barry JD, Coombs GH. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett*. 1989 Dec 4;258(2):211-5.

Myler PJ, Glick D, Feagin JE, Morales TH, Stuart KD. Structural organization of the maxicircle variable region of *Trypanosoma brucei*: identification of potential replication origins and topoisomerase II binding sites. *Nucleic Acids Res*. 1993 Feb 11;21(3):687-94.

Nicholas KB, Nicholas HB. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>. 1997.

Nikolskaia OV, de ALAP, Kim YV, Lonsdale-Eccles JD, Fukuma T, Scharfstein J, et al. Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2739-47.

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

Nobrega OT, Santos Silva MA, Teixeira AR, Santana JM. Cloning and sequencing of *tccb*, a gene encoding a *Trypanosoma cruzi* cathepsin B-like protease. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Nov 30;97(1-2):235-40.

Nunes LR, Teixeira MM, Camargo EP, Buck GA. Sequence and structural characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 Nov;74(2):233-7.

- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabe C, Douzery EJ, Breniere SF. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infect Genet Evol.* 2007 Sep;7(5):587-93.
- Okenu DM, Opara KN, Nwuba RI, Nwagwu M. Purification and characterisation of an extracellularly released protease of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Res.* 1999 May;85(5):424-8.
- Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, et al. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Trop.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Dec;112(3):249-59.
- Pacheco RS, Ferreira MS, Machado MI, Brito CM, Pires MQ, Da-Cruz AM, et al. Chagas' disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 Mar-Apr;93(2):165-9.
- Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, et al. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.* 2006 Oct;99(2-3):252-9.
- Pamer EG, Davis CE, So M. Expression and deletion analysis of the *Trypanosoma brucei* rhodesiense cysteine protease in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1991 Mar;59(3):1074-8.
- Pena SD, Machado CR, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul;104 Suppl 1:108-14.
- Pillay D, Boulange AF, Coetzer TH. Expression, purification and characterisation of two variant cysteine peptidases from *Trypanosoma congolense* with active site substitutions. *Protein Expr Purif.* 2010 Dec;74(2):264-71.
- Piontkivska H, Hughes AL. Environmental kinetoplastid-like 18S rRNA sequences and phylogenetic relationships among Trypanosomatidae: paraphyly of the genus *Trypanosoma*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005 Nov;144(1):94-9.
- Podlipaev SA, Sturm NR, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, et al. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *J Eukaryot Microbiol.* 2004 May-Jun;51(3):283-90.
- Poinar G, Jr. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasit Vectors.* 2008;1(1):22.
- Poinar G, Jr., Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist.* 2004 Sep;155(3):305-10.
- Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG. Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 May;51(Pt 3):751-8.
- Ralston KS, Hill KL. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int J Parasitol.* 2008 Jul;38(8-9):869-84.
- Ralston KS, Kabututu ZP, Melehani JH, Oberholzer M, Hill KL. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:335-62.

Ranjit N, Zhan B, Stenzel DJ, Mulvenna J, Fujiwara R, Hotez PJ, et al. A family of cathepsin B cysteine proteases expressed in the gut of the human hookworm, *Necator americanus*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Aug;160(2):90-9.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Sep;62(3):597-635.

Rawlings ND. Unusual phyletic distribution of peptidases as a tool for identifying potential drug targets. *Biochem J*. 2007 Jan 15;401(2):e5-7.

Rehman A, Jasmer DP. Defined characteristics of cathepsin B-like proteins from nematodes: inferred functional diversity and phylogenetic relationships. *Mol Biochem Parasitol*. 1999 Aug 20;102(2):297-310.

Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, et al. 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 Jun;7(6):1111-23.

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

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

Rodrigues AC, Neves L, Garcia HA, Viola LB, Marcili A, Da Silva FM, et al. 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 Sep;135(11):1317-28.

Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MM. Phylogeny of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006 Feb;132(Pt 2):215-24.

Rosenthal PJ. Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol*. 1999;43:105-59.

Roy J, Faktorova D, Lukes J, Burger G. Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist*. 2007 Jul;158(3):385-96.

Rudenskaya GN, Pupov DV. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Jan;73(1):1-13.

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*. 2008;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*. 2008 Feb;24(2):205-14.

- Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Mar;120(1):1-21.
- Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Exp Parasitol*. 1997 Jan;85(1):63-76.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3a edição ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, et al. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. *J Med Microbiol*. 2007 Aug;56(Pt 8):1118-21.
- Sato K, Kawashima S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem*. 2001 May;382(5):743-51.
- Sehgal RN, Jones HI, Smith TB. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Mol Ecol*. 2001 Sep;10(9):2319-27.
- Seifi HA. Clinical trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran. *Trop Anim Health Prod*. 1995 May;27(2):93-4.
- Serin MS, Waki K, Chang KP, Aslan G, Direkel S, Otag F, et al. Consistence of miniexon polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Mar;57(3):295-9.
- Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol*. 1999 Mar;91(3):268-79.
- Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol*. 2002 Dec;19(12):2071-83.
- Simpson AG, Patterson DJ. On core jakobids and excavate taxa: the ultrastructure of *Jakoba incarcerationata*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001 Jul-Aug;48(4):480-92.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phylogenet Evol*. 2004a Jan;30(1):201-12.
- Simpson AG, Roger AJ. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol*. 2004b Sep 7;14(17):R693-6.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006 Apr;22(4):168-74.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:363-82.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: Genomic Organization, transcription, replication and evolution. *Annals*. 1987.

- Simpson L, Sbicego S, Aphasizhev R. Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *RNA*. 2003 Mar;9(3):265-76.
- Simpson L, Thiemann OH, Savill NJ, Alfonzo JD, Maslov DA. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20;97(13):6986-93.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Mar;83(5):1383-7.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996 Dec 20;83(2):141-52.
- Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol*. 1999 Apr;91(4):306-14.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett*. 1992 Oct 19;311(2):124-7.
- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006 Nov 1;22(21):2688-90.
- Steindel M, Grisard EC, de 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 Florianopolis, Santa Catarina State, Brazil. *J Parasitol*. 1998 Jun;84(3):601-7.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008 Sep;15(3):226-32.
- Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitology Today*. 1999b Nov;15(11):432-7.
- Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica*. 1999a Oct-Dec;15(4):673-84.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol*. 2001;48:1-56.
- Stuart K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol Biochem Parasitol*. 1983 Oct;9(2):93-104.
- Stuart K, Allen TE, Heidmann S, Seiwert SD. RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997 Mar;61(1):105-20.
- Stuart K, Panigrahi AK. RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol*. 2002 Aug;45(3):591-6.
- Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci*. 2005 Feb;30(2):97-105.
- Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, et al. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. *Int J Parasitol*. 2008 May;38(6):617-22.



- Swofford DL, . PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. 2003.
- Szallies A, Kubata BK, Duszenko M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 2002 Apr 24;517(1-3):144-50.
- Tanaka T, Kaneda Y, Iida A, Tanaka M. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol.* 1994 Apr;24(2):179-88.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, et al. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist.* 2011 Jul;162(3):503-24.
- Teixeira MM, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp Parasitol.* 1996 Dec;84(3):311-9.
- Thompson CK, Botero A, Wayne AF, Godfrey SS, Lymbery AJ, Thompson RCA. Morphological polymorphism of *Trypanosoma copemani* and description of the genetically diverse *T. vegrandis* sp nov from the critically endangered Australian potoroid, the brush-tailed bettong (*Bettongia penicillata* (Gray, 1837)). *Parasite Vector.* 2013 Apr 26;6.
- Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding beta-tubulin, cysteine proteinase, hsp 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Jan;96(1):113-21.
- Tomas AM, Kelly JM. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Feb-Mar;76(1-2):91-103.
- Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):98-111.
- Turk V, Turk B, Guncar G, Turk D, Kos J. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul.* 2002;42:285-303.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell.* 2000 Oct;6(4):961-7.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sanchez JL, Jaramillo JC, et al. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* 2002 Jan;81(1):77-82.
- 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. *Infect Genet Evol.* 2003 May;3(1):39-45.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop.* 1999 Mar 15;72(2):203-12.

- Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MM. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol*. 2001 Sep;99(1):37-48.
- Vermelho AB, Simone SG, Levy CMD, Santos ALS, De Melo ACN, Silva Jr FP, et al. *Trypanosomatidae* peptidases: a target for drugs development. *Current Enzyme Inhibition*. 2007;3(1):19-46.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. Lumdsen WHR, Evans DA, editors. New York: Academic Press; 1976.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*. 1994 Dec;24(8):1317-31.
- Villa A, Gutierrez C, Gracia E, Moreno B, Chacon G, Sanz PV, et al. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec;1149:352-4.
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, et al. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology*. 2009b Jan;136(1):55-65.
- Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, et al. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake *Trypanosoma* species: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *J Eukaryot Microbiol*. 2009a Nov-Dec;56(6):594-602.
- Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, et al. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 2008 Apr;135(5):595-605.
- Votypka J, Obornik M, Volf P, Svobodova M, Lukes J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*. 2002 Sep;125(Pt 3):253-63.
- Votypka J, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, et al. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*. 2013 Nov;164(6):763-81.
- Ward WH, Hill MW, Mazlin ID, Foster CK. Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. *Aust Vet J*. 1984 Oct;61(10):324.
- Wells EA. Subgenus *Megatrypanum*. In: Lumdsen WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida Volume 1*. London: Academic Press; 1976, 257-284.
- 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 Mar;36(3):337-46.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledon R, Campbell DA, et al. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology*. 2004 Nov;129:537-47.

Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Dec 15;124(3):419-23.

Wright AD, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH. Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Mar 15;99(1):69-76.

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

Yurchenko VY, Lukes J, Jirku M, Zeledon R, Maslov DA. *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology.* 2006 Nov;133(Pt 5):537-46.

Yurchenko VY, Lukes J, Tesarova M, Jirku M, Maslov DA. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *crithidia*. *Protist.* 2008 Jan;159(1):99-114.

Zalila H, Gonzalez IJ, El-Fadili AK, Delgado MB, Desponds C, Schaff C, et al. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. *Mol Microbiol.* 2011 Jan;79(1):222-39.

Zidkova L, Cepicka I, Szabova J, Svobodova M. Biodiversity of avian trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 2012 Jan;12(1):102-12.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, et al. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 1998 Jan;28(1):105-12.

Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:159-64.