Zuleima del Carmen Caballero Espinosa

**Origem, evolução e relações filogenéticas de
homólogos de prolina racemase em espécies
de *Trypanosoma***

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

São Paulo
2014

Zuleima del Carmen Caballero Espinosa

**Origem, evolução e relações filogenéticas
de homólogos de prolina racemase em
espécies de *Trypanosoma***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Espinosa, Zuleima del Carmen Caballero.

Origem, evolução e relações filogenéticas de homólogos de prolina racemase em espécies de *Trypanosoma* / Zuleima del Carmen Caballero Espinosa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Geraldtes Teixeira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Taxonomia, diversidade e evolução de tripanossomatídeos do homem, de animais domésticos, silvestres e plantas.

Versão do título para o inglês: Origin, evolution and phylogenetic relationships of proline racemase homologs from species of *Trypanosoma*.

1. Prolina racemase 2. PRAC 3. *Trypanosoma* 4. Transferência horizontal de genes 5. Filogenia I. Teixeira, Profa. Dra. Marta Maria Geraldtes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0108/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Zuleima del Carmen Caballero Espinosa.

Título da Tese: Origem, evolução e relações filogenéticas de homólogos de prolina racemase em espécies de *Trypanosoma*.

Orientador(a): Profa. Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 422/10 referente ao projeto intitulado: *“Novos marcadores moleculares no estudo da diversidade genética de isolados de T.cruzi das Américas Central e do Sul”* sob a responsabilidade de **Zuleima Caballero Espinosa**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de setembro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

A Deus e aos meus pais, pelo amor e carinho e por terem sempre me apoiado a seguir o caminho do conhecimento.

As minhas irmãs por serem sempre minhas melhores amigas e companheiras e por me incentivarem em todos os momentos da minha vida

AGRADECIMIENTO

À Profa. Dra Marta Maria Geraldês Teixeira, pela oportunidade oferecida na realização do meu doutorado, pelo incentivo, pela confiança e excelente orientação durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Erney Camargo pelas valiosas contribuições e todo o apoio outorgado na realização desta tese.

À Profa. Dra Silvia Celina Alfieri por sua grande contribuição na correção desta tese e por todos os ensinamentos brindados aos longo deste doutorados.

Ao Prof. Dr. Octávio Sousa, do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina, Universidade de Panamá, por todos os ensinamentos brindados durante toda minha vida profissional; também pelo apoio com algumas cepas de *T. cruzi* utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Robson Ferreira pela paciência, colaboração, por todos os seus preciosos ensinamentos sempre que precisei e acima de tudo pela amizade construída durante todos esses anos.

À Dra. Adriana Fuzato pela ajuda nas técnicas de PCR para amplificação de amostras de ADN em sangue e por toda a colaboração no entendimento dos tripanossomas africanos.

Ao André Guilherme por toda a colaboração e ajuda nas análises de bioinformática utilizadas neste trabalho e pela amizade, lealdade e carinho durante todos esses anos.

Ao Dr. João Marcelo (Jota) pela valiosa contribuição na montagem dos genomas utilizados neste trabalho.

À Carmen Takata pela paciência e colaboração nas técnicas utilizadas no laboratório e por todos os ensinamentos.

À Marta Campaner pelos importantes ensinamentos e dedicação no isolamento e manutenção dos parasitas utilizados neste estudo.

Aos Amigos e funcionários deste departamento pela amizade, apoio, pelos momentos de descontração no café, pelo grande carinho e por toda sua contribuição no desenvolvimento deste trabalho especialmente Marinete, Manuel, Val, Márcio e Emília.

Ao Omar pela grande amizade, pelos ensinamentos, paciência e por todo o carinho e apoio emocional brindado durante todos esses anos.

Aos meus velhos amigos, Charlotte, Herakles pelo carinho, confiança, amizade e por todos os momentos compartilhados.

Aos meus novos amigos Lyslaine, Andernice, Danielle, Bruno e Carla por toda a amizade e pelos grandes momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório, Arlei, Flávia, Juliana, Laerte, Luciana, Oneida, Paola, Tarcila e Tânia, pelo companheirismo e em especial pela grande amizade durante todos esses anos.

À Universidade de São Paulo, ao INDICASAT (Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología) e à SENACYT (Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología y Innovación).

La fuerza no proviene de la capacidad física sino de la voluntad indomable.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Caballero Z. Origem, evolução e relações filogenéticas de homólogos de prolina racemase em espécies de *Trypanosoma* [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

As espécies de tripanossomas são altamente divergentes em relação a seus hospedeiros, ciclos de vida e patogenicidade. Ao longo da evolução, esses parasitas desenvolveram diferentes estratégias para infectar, obter energia e evadir dos mecanismos de defesa de seus hospedeiros invertebrados (vetores) e vertebrados. A enzima prolina racemase (PRAC) descrita em *T. cruzi* (TcPRAC) e *T. vivax* (TvPRAC) participa desses processos. A descoberta de genes homólogos à PRAC de bactérias nesses tripanossomas e a ausência em *T. brucei*, *T. congolense* e *Leishmania* sugeriram uma história evolutiva complexa. A fim de entender melhor a aquisição e evolução desses genes, buscamos homólogos de TcPRAC nos genomas de tripanossomas de mamíferos, cobra, crocodilo e anuro, e também em tripanossomatídeos de outros gêneros, bodonídeos e euglenídeos. Genes PRAC foram também investigados nos genomas de outros eucariotos e em diversos procariotos. Foram identificados genes PRAC em isolados de *T. cruzi* de todos os genótipos (DTUs TcI-TcVI e Tcbat), *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. rangeli*, *T. conorhini* e *T. lewisi*. Polimorfismos nesses genes permitiram genotipar todas as DTUs: os híbridos TcV e TcVI possuem duas cópias (TcPRACA e TcPRACB) e seus parentais TcII e TcIII apenas uma cópia de TcPRACA ou TcPRACB, respectivamente. Diferentes genes TcPRAC foram identificados em TcI, Tcbat e TcIV. Homólogos foram também encontrados nos genomas de tripanossomas de cobra, crocodilo e anuro. De acordo com as análises filogenéticas e de sintenia, genomas haplóides possuem apenas uma cópia de gene TryPRAC que, aparentemente, pode ser expressa como enzima funcional. As exceções são *T. rangeli*, que só apresentou pseudogenes, e *T. brucei* ssp., *T. evansi* e *T. congolense*, cujo ancestral comum perdeu esse gene. Com esse estudo, demonstramos que homólogos de TryPRAC são ubíquos nos genomas de espécies de *Trypanosoma*. As relações filogenéticas e a alta sintenia nos loci PRAC apóiam uma história evolutiva congruente com a filogenia do gênero *Trypanosoma*: os genes TryPRAC são espécies e genótipos específicos. A presença de homólogos de PRAC em tripanossomas de anuros, mas não em tripanossomatídeos de outros gêneros, bodonídeos e euglenídeos, sugere que um ancestral comum de *Trypanosoma* adquiriu o gene PRAC de uma bactéria por um único e antigo evento de transferência horizontal. A doadora deve ter sido uma bactéria do filo Firmicutes (Bacilli). Os resultados obtidos nesse trabalho são muito importantes para entender a contribuição de enzimas PRAC nos ciclos de vida, infecção, patogenicidade, virulência e evasão das defesas dos hospedeiros das diferentes espécies de tripanossomas.

Palavras-chave: Prolina racemase. PRAC. *Trypanosoma*. Transferência horizontal de genes. Filogenia.

ABSTRACT

Caballero Z. Origin, evolution and phylogenetic relationships of proline racemase homologs from species of *Trypanosoma* [Ph. D. thesis (Science)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Trypanosomes are highly divergent in host range, life cycles and pathogenicity. Along their evolutionary history, trypanosomes rely on different strategies to infect, obtain energy and evade host defenses of invertebrate (vectors) and vertebrate hosts, all crucial mechanisms for trypanosome-host adaptation. The proline racemases (PRACs) of *T. cruzi* (TcPRAC) and *T. vivax* (TvPRAC) have been implicated in these processes. The identification of PRAC homologs of bacterial origin in these species and the absence in *T. brucei*, *T. congolense* and *Leishmania* spp. suggested a complex evolutionary history of PRAC genes in trypanosomatids. Aiming a better understanding on acquisition and evolution of these genes, we searched for TcPRAC homologs in the genomes of trypanosomes of mammals, snake, crocodile and anuran, in other genera of trypanosomatids, and in genomes of bodonids and euglenids. We also searched for homologs in other eukaryote and prokaryote genomes. We identified PRAC genes in all genotypes (TcI-TcVI and Tcbat) of *T. cruzi*, and in *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. rangeli*, *T. conorhini* and *T. lewisi*. Polymorphisms of TcPRAC genes agreed with *T. cruzi* genotypes: the hybrids (TcV and TcVI) show two gene copies (TcPRACA and TcPRACB), and their parental TcII and TcIII only one copy of TcPRACA and TcPRACB, respectively. Distinct TcPRAC genes were identified in TcI, Tcbat and TcIV. Homologs were also found in trypanosomes from snake, crocodile and anuran, always as a single-copy per genome. According to our analyses, TryPRAC homologs can express functional enzymes, except *T. rangeli* that possess only pseudogenes, and *T. brucei* ssp., *T. evansi* and *T. congolense* that lost the PRAC genes. Results from this study demonstrated that TryPRAC homologs are ubiquitous in the genus *Trypanosoma*. Phylogenetic inferences and high synteny support an evolutionary history congruent with the *Trypanosoma* phylogeny, with TryPRAC genes evolving to become species and genotype specific. The presence of PRAC homolog in the anuran trypanosome, but not in trypanosomatids of other genera or in bodonids and euglenids, suggests that one common ancestor of *Trypanosoma* gained the PRAC gene through a single and ancient horizontal gene transfer from a bacteria. The donor was most likely one bacteria of Firmicutes closely related to Bacilli. The data obtained in this study are valuable to understand the roles played by PRAC enzymes in the life cycles, infection, pathogenicity, virulence and evasion from host defenses of different trypanosome species.

Keywords: Proline racemase. PRAC. *Trypanosoma*. Horizontal gene transfer. phylogeny.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B	Análise Bayesiana
P	Parcimônia
MV	Máxima Verossimilhança
BAB	Meio agar sangue (“Blood Agar Base”)
BSA	Albumina bovina sérica
gGAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal
Cytb	Citocromo b
DMSO	Dimetilsulfóxido
dATP	Desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	Desoxicitosina-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-trifosfato
dTTP	Desoxitimidina-trifosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTU	Discreted Typing Units
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Molar
mg	Miligrama
MH	Microhematócrito
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PBS	Salina em tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
Sarkosil	Lauril sarcosinato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SE	Solução salina Tris-EDTA
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão Tris acetato-EDTA
TCC	Trypanosomatid Culture Collection
TE	Tampão tris-EDTA
UV	Luz ultravioleta
N ₂	Nitrogênio líquido
DMSO	Dimetil-sulfóxido
μL	Microlitro
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Os cinetoplastídeos e a família Trypanosomatidae	13
1.2 O gênero <i>Trypanosoma</i>	14
1.2.1 Clado <i>T. brucei</i>	16
1.2.2 Clado <i>T. cruzi</i>	18
1.2.2.1 subclado <i>Schizotrypanum</i>	19
1.2.2.2 Clado <i>T. rangeli</i> - <i>T. conorhini</i>	24
1.2.3 Clado <i>T. lewisi</i>	26
1.2.4 Clado <i>T. theileri</i>	27
1.2.5 Clados de tripanossomas de aves, lagartos e crocodilianos.....	27
1.2.6 Clado Aquático	28
1.3 Genes tradicionalmente utilizados em análises filogenéticas de tripanossomas: SSU rRNA e gGAPDH.....	29
1.4 A enzima prolina racemase	31
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	37
2.1 Justificativa.....	37
2.2 Objetivos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Tripanossomas utilizados e cultivo	40
3.2 Extração de DNA.....	42
3.3 Reações de PCR e eletroforese dos produtos amplificados em gel de agarose.	43
3.4 Purificação de fragmentos de DNA amplificados por PCR.....	45
3.5 Clonagem e sequenciamento	45
3.6 Alinhamento de sequências e construção das matrizes de similaridade	45
3.7 Análises filogenéticas e genealogias	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE – Artigo em elaboração.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os cinetoplastídeos e a família Trypanosomatidae

Os cinetoplastídeos (classe Kinetoplastea, filo Euglenozoa) são caracterizados pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da única mitocôndria desses organismos, localizada na base flagelar e que contem o DNA mitocondrial. A classe Kinetoplastea contem duas subclasses, a Prokinetoplastina, representada apenas pela ordem Prokinetoplastida, e a subclasse Metakinetoplastina, esta última dividida em 4 ordens: Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida (organismos biflagelados, parasitas ou de vida livre, comumente conhecidos como bodonídeos) e Trypanosomatida (Moreira et al., 2004; Stevens, 2014; Vickerman, 1976). Estudos recentes sugerem a parafilia dos bodonídeos, apontando os tripanossomatídeos como grupo irmão de Eubodonida (Deschamps et al., 2011).

A maior parte da diversidade conhecida dos cinetoplastídeos está contida na família Trypanosomatidae, o único grupo da ordem Trypanosomatida e que alberga organismos uniflagelados e parasitas obrigatórios (Lukes et al., 2014; Maslov et al., 2013; Vickerman, 1976).

Dentre as peculiaridades de interesse filogenético e evolutivo da classe Kinetoplastea estão: variação antigênica de glicoproteínas de superfície, proteína de membrana ancorada por GPI, endocitose e exocitose de macromoléculas via bolso flagelar, presença de um nucleotídeo não usual denominado base J em seu DNA nuclear, ausência de condensação cromossômica durante a mitose, edição de RNA mitocondrial, arquitetura única do DNA mitocondrial, trans-splicing dos RNA mensageiros, transcrição eucariótica policistrônica e compartimentalização das enzimas glicolíticas nos glicossomas (Donelson et al., 1999; Gull, 2001; Gupta et al., 2013; Horn et al., 2014; Mattos et al., 2014; Michaeli 2011; Rodrigues et al., 2014; Simpson et al., 2006).

Os organismos conhecidos da família Trypanosomatidae estão agrupados em 14 gêneros, definidos de acordo com parâmetros clássicos (morfologia, hospedeiro de origem e ciclo de vida) e filogenéticos (monofilia). Tripanossomatídeos dos gêneros *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma* possuem ciclos de vida heteroxênico, desenvolvendo-se em hospedeiros invertebrados e vertebrados ou invertebrados e vegetais (Jankevicius et al., 1988; Leonard et al., 2011; Lukes et al.,

2014; Maslov et al., 2013; Porcel et al., 2014). Os gêneros *Paratrypanosoma*, *Blechnomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Angomonas* incluem parasitas monoxênicos, que realizam seus ciclos de vida em hospedeiros invertebrados (Borghesan et al., 2013; Lukes et al., 2014; Maslov et al., 2013; Merzlyak et al., 2001; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2013). O gênero *Paratrypanosoma* está, até o momento, representado por uma única espécie - *Paratrypanosoma confusum* - posicionada na base da irradiação dos tripanossomatídeos em análises filogenéticas (Flegontov et al., 2013).

Os tripanossomatídeos apresentam uma grande diversidade de hospedeiros, infectando animais invertebrados e vertebrados de praticamente todas as ordens; depois dos nematóides, são os eucariotos que apresentam a maior variedade de hospedeiros e distribuição geográfica (Lukes et al., 2014; Maslov et al., 2013; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1976).

Estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares buscam entender eventos evolutivos importantes da história dos tripanossomatídeos, como a origem do parasitismo e do modo de vida heteroxênico. Esses estudos têm sugerido a hipótese de um bodonídeo aquático de vida livre ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao habitat intestinal, assim originando os tripanossomatídeos monoxênicos de insetos. Com o surgimento da hematofagia nos insetos, esses parasitas podem ter sido inoculados em vertebrados e aqueles que se adaptaram ao parasitismo no sangue passaram a circular entre insetos hematófagos e vertebrados (Hamilton et al., 2007). Insetos hematófagos existentes há milhões de anos (Cretáceo-Jurássico), como os ceratopogonídeos e os flebotomíneos, podem ter participado desse processo (Poinar, 2008; Poinar, Poinar, 2004).

1.2 O gênero *Trypanosoma*

As espécies do gênero *Trypanosoma* desenvolvem-se em hospedeiros vertebrados e invertebrados hematófagos, que atuam respectivamente como reservatórios e vetores. Tripanossomas infectam vertebrados de todas as classes (peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos) e invertebrados como anelídeos (sanguessugas) e artrópodes hematófagos das ordens Diptera (moscas e mosquitos), Hemiptera (triatomíneos), Siphonaptera (pulgas) e Parasitiforme (carrapatos). A

enorme diversidade de hospedeiros reflete a ampla distribuição geográfica, a variedade de ecossistemas e nichos ecológicos e os mecanismos de transmissão descritos para as diversas espécies de tripanossomas (Hamilton et al., 2007; Hoare 1972; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001).

Os critérios tradicionais utilizados na classificação de tripanossomas são baseados na combinação de dados como: hospedeiro(s) vertebrado e/ou invertebrado, origem geográfica, morfologia, ciclo de vida, patologia, características bioquímicas e fisiológicas (Hoare, 1972). De acordo com o desenvolvimento no vetor, Hoare (1972) dividiu os tripanossomas de mamíferos em duas secções: Stercoraria e Salivaria. A secção Salivaria compreende os tripanossomas de origem africana dos subgêneros *Duttonella* (*T. vivax*), *Trypanozoon* (*T. b. brucei*), *Pycnomonas* (*T. suis*) e *Nannomonas* (*T. congolense*). A multiplicação no hospedeiro vertebrado se dá sob a forma tripomastigota. Esses parasitas são transmitidos por moscas tsétsé, com a inoculação de formas metacíclicas junto com a saliva da mosca. Apenas as espécies do subgênero *Trypanozoon* completam seu desenvolvimento nas glândulas salivares, as demais espécies de tripanossomas da secção Salivaria se desenvolvem exclusivamente na probóscide (*T. vivax*) ou probóscide e intestino da mosca tsetse (*T. congolense*). Exceções conhecidas são *T. equiperdum* e *T. evansi*, cuja transmissão ocorre apenas mecanicamente (Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001).

Na secção Stercoraria estão os tripanossomas cujo desenvolvimento, em geral, ocorre no intestino posterior do invertebrado, condicionando a eliminação das formas metacíclicas com as fezes do inseto vetor e a infecção do hospedeiro vertebrado por meio de solução de continuidade na pele e mucosas (transmissão contaminativa). Dependendo da espécie de *Trypanosoma*, a multiplicação dos parasitas no hospedeiro vertebrado ocorre sob a forma amastigota, epimastigota, ou tripomastigota. Reunidos na secção Stercoraria estão os subgêneros *Schizotrypanum*, *Herpetosoma* e *Megatrypanum*, cujas espécies-tipo são, respectivamente, *T. cruzi*, *T. lewisi* e *T. theileri* (Hoare, 1972). Com exceção de *T. cruzi* e de alguns casos de infecção humana por *T. lewisi* (Sarataphan et al., 2007; Truc et al., 2012), a maioria das espécies dos três subgêneros não infecta o homem e, geralmente, não são patogênicas para seus hospedeiros vertebrados (Hoare, 1972).

Os critérios taxonômicos clássicos têm se mostrado insuficientes ou mesmo incongruentes com os padrões hierárquicos obtidos em inferências filogenéticas de

espécies de tripanossomas baseadas em marcadores moleculares (Ferreira et al., 2007, 2008; García et al., 2011, b; Gibson, 1999; Hamilton et al., 2004, 2005a, b, 2007, 2009; Lima et al., 2012a, b; Maia da Silva et al., 2004a, b; Rodrigues et al., 2006; Stevens et al., 2001; Viola et al., 2008, 2009a, b). Estudos iniciais baseados em sequências dos genes de SSU rRNA sugeriram a polifilia do gênero *Trypanosoma* (Maslov et al., 1996). Porém, inferências filogenéticas incluindo um maior número de espécies e baseadas em sequências independentes e combinadas dos genes SSU rRNA e gGAPDH demonstraram que todas as espécies de tripanossomas conhecidas compartilham um ancestral comum e exclusivo (Lukes et al., 2002, 2005, 2014; Stevens et al., 1998, 1999b, c, 2001). Esses trabalhos reforçam a hipótese de uma origem comum a todas as espécies de tripanossomas de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, e apóiam a existência de duas grandes irradiações no gênero: a dos tripanossomas do Clado Aquático (hospedeiros vertebrados aquáticos e anfíbios) e outra que alberga todos os demais tripanossomas.

Análises filogenéticas baseadas em diversos genes têm apoiado três grandes clados no gênero *Trypanosoma*: clado *T. brucei*, clado *T. cruzi* e o clado Aquático (Hamilton et al., 2004, 2007; Stevens et al., 1998, 1999a, 2001). Com a inclusão de um maior número de táxons foram identificados novos agrupamentos de espécies, revelando os clados *T. theileri* (parasitas de ruminantes) e *T. lewisi* (principalmente parasitas de roedores) (García et al., 2011b; Hamilton et al., 2007, 2009; Maia da Silva et al., 2010; Rodrigues et al., 2006, 2010). Outros tripanossomas foram posicionados fora desses grandes grupos e com a inclusão de novos táxons, novos clados estão sendo decobertos baseado em estudos filogéticos: *T. cyclops*, *T. copemani*; *T. avium*/*T. corvi*, lagartos/serpentes e crocodilianos (Fermino et al., 2013; Ferreira et al., 2008; Hamilton et al., 2004, 2005a, 2007; Rodrigues et al., 2006; Viola et al., 2009a, b).

1.2.1 Clado *T. brucei*

O clado *T. brucei* está constituído por espécies dos subgêneros *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*), *Duttonella* (*T. vivax*), *Pycnomonas* (*T. suis*) e *Nannomonas* (*T. congolense* e *T. simiae*), todas de origem africana e pertencentes à secção Salivaria (Adams et al., 2010a, b; Hoare, 1972). Este clado forma um grupo monofilético altamente suportado e separado por alto grau de divergência das demais espécies de

tripanosomas, o que sugere uma história evolutiva única, provavelmente confinada à África e associada à presença de seus vetores naturais, as moscas tsetsé (Hamilton et al., 2007; Stevens et al., 2001).

As espécies do clado *T. brucei* são consideradas patogênicas e podem infectar humanos (*T. brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* e, em situações excepcionais, também *T. evansi*), sendo patógenos de mamíferos domésticos de grande interesse econômico. Espécies de ungulados como bovinos, bufalinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos são comumente infectados na África por *T. brucei* ssp, *T. vivax*, *T. congolense* e *T. simiae*. Nos ciclos silvestres, estes tripanossomas circulam entre ungulados selvagens que agem como reservatórios e raramente apresentam sinais clínicos de infecção (Adams et al., 2010a, b). A distribuição desses parasitas está diretamente associada à presença de moscas tsé-tsé que, por sua vez, estão associadas a nichos ecológicos específicos (Peacock et al., 2012).

Os tripanossomas do clado *T. brucei* passam por diferentes estágios de desenvolvimento na mosca tsé-tsé, com exceção de *T. evansi* e *T. equiperdum*, que não se desenvolvem em invertebrados e cuja transmissão é exclusivamente mecânica, envolvendo insetos hematófagos (*T. evansi*) ou contato sexual (*T. equiperdum*). Por outro lado, *T. vivax*, embora requeira a mosca tsé-tsé para completar seu ciclo de desenvolvimento, também está adaptado à transmissão mecânica, utilizando outros vetores hematófagos para infectar mamíferos. Esta capacidade de adaptação permite a propagação das três espécies na ausência da mosca tsetsé e, portanto, sua difusão para áreas além da ocorrência deste inseto na África e mesmo fora do continente africano (Desquesnes et al., 2013; Hoare, 1972; Stevens et al., 2001).

Trypanosoma evansi tem sido descrito na América do Sul, Ásia e Europa, *T. vivax* nas Américas do Sul e Central e *T. equiperdum* no continente americano e na Ásia (Desquesnes et al., 2013; Hamilton et al., 2007; Hoare, 1972; Stevens et al., 2001, 2008). A provável introdução de animais trazidos do norte e oeste da África pelos colonizadores europeus é uma das hipóteses que explica a difusão desses tripanosomas nas Américas (García, 2012; Desquesnes et al., 2013; Ventura et al., 2001, 2002).

1.2.2 Clado *T. cruzi*

O clado *T. cruzi* agrupa todas as espécies do subgênero *Schizotrypanum*, incluindo *T. cruzi* (a espécie-tipo) e outras espécies conhecidas, porém restritas a hospedeiros da ordem Chiroptera, como *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* e *T. erneyi*. Dessas espécies, apenas *T. cruzi* tem a capacidade de infectar tanto morcegos como uma grande variedade de outros mamíferos (Cavazanna et al., 2010; Hamilton et al., 2012a, b; Hoare, 1972; Lima et al., 2012a, b, 2013; Marinkelle, 1982a; Molyneux, 1991; Stevens et al., 2001).

Inferências filogenéticas baseadas em marcadores moleculares posicionam *T. rangeli* e *T. conorhini* no clado *T. cruzi*. *T. vespertilionis* (de morcegos europeus e africanos), outros tripanossomas isolados na África (*T. sp. HochNdi1* de macaco, *T. sp. NanDoum1* de civet e *T. sp. bat*, de morcego), incluindo *T. livingstonei* (Lima et al., 2012a, 2013), também foram incluídos nesse clado. Alguns estudos demonstraram que alguns tripanossomas de marsupiais e roedores australianos também pertencem ao clado *T. cruzi* (Averis et al., 2009; Botero et al., 2013; Paparini et al., 2011). Análises filogenéticas baseadas em diversos marcadores moleculares têm apoiado o agrupamento monofilético de todas essas espécies e sua distribuição em dois subclados: *Schizotrypanum* (*T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. erneyi* e *T. dionisii*) e *T. rangeli-T. conorhini*, este último formado por *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. vespertilionis*, *T. sp. NanDoum1*, *T. sp. HochNdi1*. Nesse clado, *T. sp. bat*, *Trypanosoma livingstonei* e *T. sp. H25* têm uma posição basal, porém ainda não muito bem resolvida (Hamilton et al., 2007, 2009, 2012a, b; Lima et al., 2012b, 2013; Stevens et al., 1999c).

Diversas evidências sustentam a hipótese de que o clado *T. cruzi* foi ancestralmente um grupo de parasitas restritos a morcegos. Uma revisão recente sugere a hipótese chamada “*bat seeding*”, segundo a qual um tripanossoma ancestral parasita de morcegos, provavelmente do Velho Mundo, deu origem a todas as espécies do clado *T. cruzi* com espécies restritas a morcegos, como também espécies capazes de infectar mamíferos de outras ordens (Hamilton et al., 2012a, b). Recentemente, a adição de duas novas espécies de tripanossomas isoladas de morcegos africanos (*T. erneyi*, filogeneticamente posicionada no subclado *Schizotrypanum*, e *T. livingstonei* (a espécie mais basal do clado *T. cruzi*), parece corroborar essa hipótese (Lima et al., 2012a, 2013).

1.2.2.1 subclado *Schizotrypanum*

Trypanosoma dionisii, *T. erneyi* e *T. cruzi marinkellei* (espécies *T. cruzi*-like) são espécies muito relacionadas e cujas formas sanguíneas são praticamente indistinguíveis morfológicamente das de *T. cruzi*. As espécies do subgênero *Schizotrypanum* são as únicas que infectam células de mamíferos e se multiplicam intracelularmente como amastigotas. Porém, diferindo de *T. cruzi*, que infecta o homem e mamíferos de várias ordens, as demais espécies são parasitas exclusivos de morcegos (Hoare, 1972; Molyneux, 1991).

Trypanosoma cruzi ocorre do sul dos Estados Unidos ao sul da América do Sul e *T. c. marinkellei* é encontrado apenas nas Américas Central e do Sul. *Trypanosoma dionisii* está distribuído no Novo e no Velho mundo e *T. erneyi*, até o momento, foi descrito apenas na África. *Trypanosoma cruzi marinkellei* é a espécie filogeneticamente mais próxima de *T. cruzi*, seguida de *T. erneyi* e *T. dionisii* (Cavazzana et al., 2010; Franzén et al., 2012; Lima et al., 2012b).

Os ciclos biológicos dos tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* diferem apenas na capacidade de infectar outros mamíferos além de morcegos e, nos vetores: triatomíneos de diferentes gêneros são os vetores de *T. cruzi*, enquanto *T. c. marinkellei* é transmitido apenas por triatomíneos do gênero *Cavernicola*. Na Europa, *Cimex pipistrelli* é o vetor natural de *T. dionisii*, sendo o desenvolvimento no vetor semelhante ao de *T. cruzi* em triatomíneos (Bower, Woo, 1982; Gardner, Molyneux, 1988). Cimicídeos de morcegos são pouco estudados no Brasil e, aparentemente, pouco abundantes se comparados aos do Velho Mundo. Até o momento não conhecemos o vetor de *T. dionisii* nas Américas e de *T. erneyi* na África (Cavazanna et al., 2010; Lima et al., 2012b).

Trypanosoma cruzi compreende populações bastante heterogêneas que podem diferir segundo critérios morfológicos, biológicos (comportamento em vertebrados e triatomíneos), patológicos (virulência, mortalidade, tropismo celular), clínicos (forma cardíaca e digestiva), imunológicos, bioquímicos e moleculares (Andrade et al., 1999; Zingales et al., 2012). Essa espécie apresenta uma grande diversidade intraespecífica e estrutura populacional complexa. A enorme variabilidade genética evidenciada com diferentes marcadores moleculares levou à

divisão de *T. cruzi* em seis DTUs (Discrete Typing Units), TcI-TcVI (Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012).

Trypanosoma cruzi mantém, predominantemente, um modo de reprodução clonal (Tibayrenc, Ayala, 2013; Zingales et al., 2012). Nos últimos anos, com o advento de novas metodologias e com o emprego de múltiplos genes nucleares e mitocôndrias e de polimorfismo de loci de microssatélites, tem sido demonstrado que eventos de hibridização são comuns entre diferentes DTUs (Discrete Typing Units), assim como entre isolados de uma mesma DTU (Brisse et al., 2003; Roellig et al., 2013; Tibayrenc, Ayala, 2002; Westenberger et al., 2005; Yeo et al., 2011).

Isolados de *T. cruzi* associados ao ciclo silvestre começaram apenas recentemente a serem caracterizados com marcadores moleculares (Charles et al., 2013; Herrera et al., 2008, 2009; Lima et al., 2014; Lisboa et al., 2004, 2006, 2008, 2009; Marcili et al., 2009a, b, c; Rocha et al., 2013; Roque et al., 2013; Xavier et al., 2012).

Os isolados pertencentes às DTUs TcI, TcIII e TcIV são prevalentes no ciclo silvestre. Porém, a transmissão doméstica de TcI é a principal causa de Doença de Chagas do Norte da América do Sul (Venezuela e Colômbia), América Central e México, podendo provocar cardiopatias severas. Existe uma grande variabilidade em relação à virulência e patogenicidade de isolados de TcI (Añez et al., 2004; Gómez-Hernández et al., 2011; Martínez-Tovar et al., 2014; Molina-Garza et al., 2014; Poveda et al., 2014).

Estudos recentes têm revelado uma grande variabilidade genética entre isolados de TcI, mesmo entre populações simpátricas, com crescente número de relatos de infecções multiclonais e recombinação entre genótipos dessa DTU (Guhl, Ramírez, 2013; Lima et al., 2014; Ocaña-Mayorga et al., 2010; Ramírez et al., 2012; Zumaya-Estrada, et al., 2012).

TcI e TcIV são comuns em casos humanos de infecção oral por *T. cruzi* na Amazônia brasileira, Venezuela e Colômbia, e nesses casos as infecções agudas podem ser bastante graves (Marcili et al., 2009a, c; Monteiro et al., 2012, 2013; Ramírez et al., 2013; Santana et al., 2014; Valente et al., 2009).

Existem evidências de diversidade genética intra-TcIV e de relevante virulência e patogenicidade nesse grupo (Monteiro et al., 2012, 2013). Isolados de TcIV da América do Sul e América do Norte, previamente caracterizados como TcIV, formaram um grupo monofilético contendo dois clados de acordo com a origem

geográfica. Estes dois grupos independentes circulam entre distintos hospedeiros e nichos ecológicos, embora estejam filogeneticamente muito relacionados (Marcili et al., 2009c).

Estudos realizados na região Amazônica, com o objetivo de entender a complexidade dos ciclos de transmissão das diferentes DTUs de *T. cruzi*, demonstraram que TcI e TcIV circulam entre primatas silvestres e são transmitidos por espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Esta associação com hospedeiros e nichos ecológicos revelou uma sobreposição dos ciclos naturais de transmissão de TcI e TcIV (Marcilli et al., 2009a; Miles et al., 2009; Monteiro et al., 2013).

Estudos de isolados de *T. cruzi* obtidos de triatomíneos e animais silvestres confirmaram a ampla distribuição de TcIII, com diversas descrições desde a Venezuela, até o Sul na América do Sul onde essa DTU é bastante prevalente. Os estudos vêm indicando uma forte associação com ciclo de transmissão terrestre, com isolados de TcIII em tatus, tamanduás, marsupiais terrestres, carnívoros, roedores e cães domésticos, assim como triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma* (Enriquez et al., 2013a, b; Lewis et al., 2009; Llewellyn et al., 2009; Marcili et al., 2009c; Orozco et al., 2013; Yeo et al., 2005).

As DTUs TcII, TcV e TcVI tem sido associadas aos ciclos de transmissão doméstico e peridoméstico causando severas patologias em humanos, com manifestações cardíacas e digestivas (megaesôfago e megacólon) (Broutin et al., 2006; Ragone et al., 2012; Virreira et al., 2006; Zingales et al., 2012). TcII é predominantemente encontrada nas regiões sul e central da América do Sul, com relatos esporádicos na Colômbia e Venezuela. A verdadeira extensão da ocorrência de TcII ainda não é clara, assim como seus reservatórios silvestres. No ambiente silvestre, TcII foi identificado em primatas, e esporadicamente, em outras espécies de mamíferos na Mata Atlântica do Brasil. Outras espécies, incluindo tatus e roedores foram descritas como reservatórios no Sul da América do Sul (Fernandes et al., 1999; Lisboa et al., 2007; Zingales et al., 2012).

As DTUs TcV e TcVI foram associadas a formas clínicas graves, com complicações cardíacas e digestivas, e à transmissão congênita. Esses genótipos têm sido reportados em regiões endêmicas de Brasil (Rio Grande do Sul), Bolívia (Santa Cruz, Potosi), Chile (Salvador, Tulahuen), Paraguai (Makthlawaiya) e Argentina (Chaco) (Zingales et al., 2009). Análises multigênicas e genômicas, confirmaram a heterozigosidade destas DTUs, sugerindo que TcV e TcVI são híbridos derivados de

TcII e TcIII; possivelmente produto de um único evento de hibridação, seguido de divergência clonal (Brisse et al., 2003; Tibayrenc, Ayala, 2002; Westenberger et al., 2005) ou de eventos de hibridação independentes (de Freitas et al., 2006).

Na América do Sul, TcIV e TcV têm sido associados, quase que exclusivamente, a transmissão por *T. infestans*, com altas prevalências nos ambientes peridoméstico e doméstico, conseqüentemente, também em humanos (Bacigalupo et al., 2012; Barnabé et al., 2011). Estudos recentes realizados em regiões endêmicas da Bolívia (Gran Chaco) reportaram altas porcentagens (56.2%) de infecções mistas em *Triatoma infestans*, principalmente entre as DTUs TcII, TcV e TcVI (Pérez et al., 2013). Outros estudos realizados em regiões endêmicas da Argentina identificaram TcVI como genótipo mais frequente em cães e gatos, seguido de TcV e TcIII. Esses estudos têm reforçado a importância desses animais como reservatórios domésticos das DTUs híbridas, com importante papel na conexão dos ciclos de transmissão doméstico e silvestre (Enriquez et al., 2013a, b).

Morcegos infectados por *T. cruzi* podem atuar como reservatórios domésticos (Barnabé et al., 2003; Cavazzana et al., 2010; Grisard et al., 2003; Lisboa et al., 2008; Maia da Silva et al., 2008; Marcili et al., 2009b; Steindel et al., 1998). Visto que a maioria dos morcegos infectados é insetívora, a infecção de morcegos provavelmente ocorre por via oral, isto é, pela ingestão de vetores infectados. Triatomíneos que vivem em buracos de árvores, cavernas, telhados de folhas de palmeiras, tocas de animais silvestres, palmeiras e forros de residência devem ser os responsáveis pelas infecções e os principais vetores de *T. cruzi* entre os morcegos (Marinkelle, 1977).

Com a exceção de *T. cruzi*, as demais espécies do subgênero *Schizotrypanum* não infectam o homem e a destruição extracelular mediada por anticorpos, linfócitos e complemento está entre os mecanismos propostos para explicar a eliminação desses parasitas do organismo (Glauert et al., 1982; Mkwanzani et al., 1976; Molyneux, 1991; Thorne et al., 1979, 1981).

Trypanosoma cruzi marinkellei, a espécie mais filogeneticamente relacionada com *T. cruzi* até o momento, é transmitida por triatomíneos do gênero *Cavernicola*, e, aparentemente, é restrita a morcegos da família Phyllostomidae (Cavazzana et al., 2010; Marinkelle, 1977, 1982b). Infecções de células “in vitro” mostraram que *T. c. marinkellei* desenvolve-se em células de diversos mamíferos, da mesma forma que *T. cruzi* (Cavazzana et al., 2010; Franzen et al., 2012). Por outro lado, *T. c. marinkellei* foi descrito como uma espécie distinta, com base em características biológicas,

bioquímicas, imunológicas e moleculares (Baker et al., 1978; Barnabé et al., 2003; Marinkelle, 1982a; Petry et al., 1986; Steindel et al., 1998; Tibayrenc, Le Ray, 1984). Porém, análises proteômicas comparando *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* não conseguiram detectar diferenças entre os dois parasitas (Telleria et al., 2010). A comparação dos genomas de *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* também demonstrou uma alta similaridade entre esses parasitas, com pequena redução de tamanho do genoma de *T. c. marinkellei*, coerente com menor expansão em várias famílias multigênicas (Franzen et al., 2012), corroborando a grande proximidade entre as duas espécies.

Embora compartilhem muitos antígenos, *T. c. marinkellei* não parece conferir proteção contra uma infecção por *T. cruzi*. Estudos de imunização mostraram que camundongos infectados com *T. c. marinkellei* ou outro *T. cruzi*-like não são protegidos da infecção por *T. cruzi* (Marinkelle, 1982a, b; Nascentes et al., 2008, 2010).

Trypanosoma dionisii é outra espécie pertencente ao subgênero *Schizotrypanum*, filogeneticamente mais distante de *T. cruzi*. Na Europa e no Canadá, *Cimex pipistrelli* tem sido descrito como o vetor natural de *T. dionisii* e *T. vespertilionis*. O desenvolvimento destas duas espécies no vetor é semelhante ao de *T. cruzi* em triatomíneos (Bower, Woo, 1982; Gardner, Molyneux, 1988). Em morcegos, as formas amastigotas encontradas no músculo esquelético são muito parecidas com as de *T. cruzi*. Porém, além dos ninhos de amastigota, *T. dionisii* forma pseudocistos de formas epimastigotas, no coração, diafragma, músculo do esterno, mucosa intestinal e no ovário dos morcegos. Em cultura, o desenvolvimento de *T. dionisii* também foi similar ao de *T. cruzi*. O parasita tem a capacidade de invadir células não fagocíticas, utilizando, provavelmente, a mesma estratégia de *T. cruzi*. A capacidade de invadir células pode ser inibida com citocalasina ou pela morte dos parasitas por aquecimento (Baker et al., 1972; Baker, 1985; Glauert et al., 1982; Molyneux, 1991; Oliveira et al., 2009).

Trypanosoma erneyi, espécie recentemente descrita (Lima et al., 2012b) e proximamente relacionada com o grupo *T. cruzi*, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*, foi isolada de morcegos da família Molossidae, em Moçambique, África. Além da semelhança morfológica, *T. erneyi* é capaz de invadir e se desenvolver em células de mamíferos, característica exclusiva das espécies do subgênero *Schizotrypanum*. Assim como as demais espécies *T. cruzi*-like, *T. erneyi* não infecta camundongos

Balb/c, indicando possível restrição a morcegos. Até o momento, não se conhece o vetor de *T. erneyi* (Lima et al., 2012b).

Hemípteros das famílias Cimicidae (*Cimex*) e Polyctenidae são comumente associados com morcegos do Velho Mundo e espécies do gênero *Cimex* têm sido descritos como vetores de *T. dionisii* na Europa (Bower, Woo, 1981; Gardner, Molyneux, 1988). Assim, é possível que insetos dessas duas famílias sejam potenciais vetores de *T. erneyi*. Além disso, existem muitos ectoparasitas encontrados em morcegos (dípteros, carrapatos, ácaros e pulgas) que podem, provavelmente de forma mecânica, transmitir tripanosomas (Hoare, 1972; Molyneux, 1991).

1.2.2.2 Clado *T. rangeli*-*T. conorhini*

Estudos de relacionamento filogenético baseados em diversos genes têm demonstrado que o subclado *T. rangeli*-*T. conorhini* está mais proximamente relacionado às espécies do Subgênero *Schizotrypanum* do que a qualquer outro grupo (Hamilton et al., 2007, 2009; Lima et al., 2012b; 2013). *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*, além de compartilhar a mesma distribuição geográfica (são espécies restritas às Américas), infectam os mesmos vetores e hospedeiros mamíferos, sendo comuns as infecções mistas por ambos os parasitas. No entanto, as duas espécies apresentam diferenças morfológicas, bioquímicas e imunológicas, tanto no hospedeiro vertebrado como nos hemípteros vetores (Azambuja et al., 2005; Hoare, 1972; Vallejo et al., 2009).

Trypanosoma rangeli infecta uma ampla diversidade de hospedeiros vertebrados; incluindo humanos e mamíferos domésticos e silvestres das mais diversas ordens (Maia da Silva et al., 2007, 2009; Vallejo et al., 2009). Esse parasite ocorre na América Central e do Sul onde compartilha com *T. cruzi* os mesmos reservatórios e vetores, triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Uma alta prevalência de infecções humanas tem sido reportada na América Central e noroeste de América do Sul (Brasil, Venezuela e Colômbia) (Botero et al., 2010; Calzada et al., 2010; Fraga et al., 2014; Salazar-Antón et al., 2009; Thekisoe et al., 2010). No Brasil, vários casos humanos tem sido encontrados na região do Amazônia (Coura et al., 1996) onde as infecções de mamíferos silvestres e triatomíneos são comuns (Maia da Silva et al., 2004a, b, 2007; Miles et al., 1983).

Ao contrário de *T. cruzi* e *T. brucei*, *T. rangeli* não é patogênico para seus hospedeiros mamíferos, entretanto, pode ser patogênico para seus insetos vetores, dificultando, principalmente, o repasto sanguíneo e a ecdise do triatomíneo. *T. rangeli* é muito associado com espécies de triatomíneos do gênero *Rhodnius*; a transmissão inoculativa durante a alimentação foi demonstrada apenas para espécies deste gênero. Nas espécies do gênero *Rhodnius* *T. rangeli* se multiplica no intestino, posteriormente invade a hemolinfa e completa seu ciclo de desenvolvimento nas glândulas salivares, onde acontece a metaciclogênese (Azambuja et al., 2005; Vallejo et al., 2009).

O subclado *T. rangeli-T. conorhini* é constituído por dois grandes grupos, um dos quais agrupa exclusivamente os isolados de *T. rangeli*, distribuídos em 5 linhagens (A-E) que, aparentemente, não apresentam relação com os hospedeiros vertebrados. Estudos fitogeográficos comparados de isolados de *T. rangeli* e de seus vetores triatomíneos do gênero *Rhodnius* revelaram que as distintas linhagens de *T. rangeli* apresentam grande correlação com espécies dos diferentes complexos do gênero *Rhodnius* e com a região geográfica de origem (Maia da Silva et al., 2004a, b, 2007, 2008; Urrea et al., 2011).

Nosso grupo mostrou, pela primeira vez, com base em análises morfológicas, biológicas e filogenéticas, a presença de *T. rangeli* em morcegos capturados no Brasil. A genotipagem baseada no gene SL revelou a presença nesses hospedeiros de isolados das linhagens A e de uma nova linhagem (TrE) (Maia da Silva et al., 2009). *T. rangeli* foi detectado em infecções mistas com *T. cruzi* e *T. c. marinkellei* no Brasil, Panamá e Colômbia (Cottontail et al., 2009; Lisboa et al., 2008; Ramírez et al., 2012).

Estudos baseados em sequências de ITS rDNA, genes de spliced leader e de Catepsina L identificaram 5 linhagens (TrA-TrE) de *T. rangeli*. As linhagens TrA, TrB, TrC e TrE foram estreitamente associadas com *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius pallescens* e *Rhodnius picitipes* respectivamente (Maia da Silva et al., 2004a, b, 2007, 2008; Ortiz et al., 2009; Vallejo et al., 2009).

O complexo *R. pallescens* compreende *R. pallescens*, *R. colombiensis* e *R. ecuatoriensis*, distribuídos a oeste dos Andes, na América Central e norte e noroeste da América do Sul. O complexo *R. brethesi* é constituído por *R. brethesi*, *R. pictipes*, *R. amazonicus* e *R. stali*, espécies comuns na Amazônia. O complexo *R. prolixus* é o mais amplamente distribuído, sendo formado por *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. domesticus* e *R. neivai* (Gaunt, Miles, 2000; Monteiro et al.,

2000, 2003). Isolados da linhagem A (TrA) são da Venezuela, Colômbia, Honduras, Guatemala e Brasil; associados ao complexo *R. prolixus*. A linhagem B incluiu exclusivamente isolados brasileiros de humanos, triatomíneos e animais silvestres da região amazônica, e o vetor implicado é *R. brethesi*. A Linhagem C foi formada por isolados do complexo *R. pallens*, obtidos na Colômbia e Panamá, e isolados humanos da América Central (Panamá, Costa Rica e El Salvador) (Maia da Silva et al., 2004, 2007).

O segundo grupo do clado *T. rangeli-T. conorhini* é formado por *T. conorhini*, *T. vespertilionis* (isolado de morcego europeu, transmitido por cimiídeos) e tripanossomas de primatas, carnívoros e morcegos africanos, cujos ciclos de vida e vetores são ainda desconhecidos (Hamilton et al., 2009; Lima et al., 2013).

T. conorhini é um parasita de rato doméstico não patogênico e cosmopolita, que se multiplica no sangue, sendo transmitido de forma contaminativa por *Triatoma rubrofasciata*, a única espécie de triatomíneo com ampla distribuição em regiões tropicais de diferentes continentes, aparentemente originária das Américas (Hypsa et al., 2002). Essa espécie foi descrita em primatas e em *T. rubrofasciata* na Ásia e, em infecções experimentais, foi capaz de infectar primatas neotropicais (Deane et al., 1986; Deane, Deane, 1961).

1.2.3 Clado *T. lewisi*

O clado *T. lewisi* corresponde ao subgênero *Herpetosoma* que compreende tripanossomas que parasitam as ordens Rodentia e Lagomorpha. Está representado pela espécie tipo *T. lewisi*, um parasita cosmopolita de rato doméstico. Os parasitas deste clado têm sido isolados principalmente de roedores e são transmitidos por pulgas que parecem guardar uma grande especificidade pelo hospedeiro vertebrado (Hoare, 1972). Macacos foram encontrados infectados por estes parasitas no Brasil (Maia da Silva et al., 2010).

Estudos recentes detectaram infecções humanas por *T. lewisi* na Ásia e África, sendo estas, aparentemente, infecções oportunistas em crianças imunodeprimidas; o aumento do número de casos levou essa espécie a ser considerada como um patógeno emergente para humanos (Truc et al., 2012).

Com as novas descobertas de tripanossomas de mamíferos australianos, observou-se a formação de um novo clado composto por tripanossomas de

marsupiais (*T. copemani* e *T. gilleti*) e de carnívoros da Europa (*T. pestanai*) e do Brasil (*T. caninum*) (Austen et al., 2009; Madeira et al., 2009, 2014; McInnes et al., 2011). Análises filogenéticas utilizando sequências do gene gGAPDH posicionaram este clado próximo do clado *T. lewisi* (Hamilton et al., 2011; Lima et al., 2013).

1.2.4 Clado *T. theileri*

O subgênero *Megatrypanum*, com a espécie-tipo *T. theileri*, compreende tripanossomas isolados principalmente de ruminantes (ordem Artiodactyla). São parasitas com distribuição mundial e bastante prevalentes em bovinos, bubalinos, ovinos, cervídeos e antílopes. As espécies deste grupo, embora muito relacionadas, apresentam significativa especificidade pela espécie do hospedeiro vertebrado. Esse grupo tem moscas hematófagas das famílias *Tabanidae* e *Hippoboscidae* como seus principais vetores (García et al., 2011a, b; Hamilton et al., 2009; Hatama et al., 2007; Rodrigues et al., 2006).

O subgênero *Megatrypanum* foi revisto por Rodrigues et al. (2006) e García et al. (2011a, b), após análise de um grande número de isolados utilizando diversos genes. A polifilia desse grupo foi demonstrada e o clado *T. theileri*, formado por *T. theileri* e espécies relacionadas (*T. theileri*-like), que parasitam exclusivamente ungulados da ordem Artiodactyla, foi então proposto para validar esse subgênero. (Hamilton et al., 2004, 2007; Rodrigues et al., 2006).

O subclado *T. cyclops* (grupo irmão do clado *T. theileri*), contém tripanossomas encontrados em primatas na Ásia, marsupiais e sanguessugas terrestres na Austrália (Hamilton et al., 2005a, 2007).

1.2.5 Clados de tripanossomas de aves, lagartos e crocodilianos

O clado *T. avium* / *T. corvi* inclui a maioria dos isolados de aves, exceto *T. bennetti* (Votýpka et al., 2002, 2004, 2012) que, juntamente com os clados de isolados de serpentes e lagartos (tripanossomas de répteis) (Viola et al., 2008, 2009b) ainda requerem estudos mais abrangentes (análises de um maior número de isolados, de diversos hospedeiros e origens geográficas) que permitam elucidar as

relações filogenéticas e o posicionamento desses grupos em relação aos outros clados de tripanossomas.

O Clado de tripanossomas de crocodilianos tem *T. grayi*, parasita de crocodilos africanos (*Crocodilus niloticus*), transmitidos por tsé-tsé, como espécie de referência. Na África, *Crocodylus niloticus*, *Crocodilus cataphractus* e *Osteolaemus tetraspis* são parasitados por tripanossomas. Entre os crocodilos africanos a prevalência de infecção por tripanossomas é de ~ 80% (Hoare, 1929, 1931).

Trypanosoma grayi teve seu ciclo de desenvolvimento completamente descrito, tanto nos crocodilos quanto nas tsé-tsés. Esse é o único tripanossoma demonstradamente transmitido por tsé-tsé que não pertence a Secção Salivaria, que contém apenas parasitas de mamíferos. Entretanto, em *T. grayi*, a transmissão não ocorre por inoculação, mas sim de forma contaminativa, por deposição de fezes contaminadas na boca e por ingestão das próprias moscas pelos crocodilos. As fezes das moscas contêm os tripomastigotas metacíclicos que penetram via mucosa, caem na corrente sanguínea dos crocodilos e diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos. As infecções podem persistir por mais de dois anos com baixas parasitemias, sem causar qualquer efeito patogênico. As formas tripomastigotas de *T. grayi* são raras no sangue periférico dos crocodilos e não foram observadas em multiplicação (Hoare, 1929, 1931).

No Brasil, foram encontrados tripanossomas parasitando *Caiman crocodilus*, *Caiman yacare* (Lainson, 1977; Viola et al., 2008) e *Melanosuchus niger* (Fermino et al., 2013). Esses tripanossomas se posicionaram nas árvores filogenéticas junto com isolados de crocodilos africanos e de moscas tsé-tsé classificados como *T. grayi*, formando um clado denominado “Crocodilian” (Fermino et al., 2013; Hamilton et al., 2004, 2007, 2009; Stevens et al., 2001; Viola et al., 2009a). Não são conhecidos os vetores de tripanossomas de crocodilianos na América do Sul, onde não existem moscas tsé-tsé, vetores de *T. grayi* na África

1.2.6 Clado Aquático

O clado Aquático é formado por tripanossomas de vertebrados aquáticos, principalmente peixes e anfíbios, incluindo um isolado de ornitorrinco e um isolado de tartaruga (Stevens et al., 2001). A inclusão de novos isolados de anuros nas análises filogenéticas sugere a subdivisão do clado Aquático em dois grupos, um deles

formado predominantemente por tripanossomas de peixes e o outro por tripanossomas de anuros (Ferreira et al., 2007, 2008; Hamilton et al., 2005a, 2007).

As espécies do clado Aquático são transmitidas por sanguessugas, como demonstradas para espécies que infectam peixes, tartarugas e serpentes aquáticas, e anuros (Ferreira et al., 2007, 2008; Hayes et al., 2014; Jakes et al., 2001; Stevens et al., 2001; Viola et al., 2009b;). Porém, tripanossomas de anuros também podem ser transmitidos por moscas e mosquitos hematófagos (flebotomíneos e culicídeos) (Ferreira et al., 2008).

1.3 Genes tradicionalmente utilizados em análises filogenéticas de tripanossomas: SSU rRNA e gGAPDH

Devido à presença universal e função essencial em todos os organismos conhecidos, os genes ribossômicos podem ser empregados para inferir relacionamentos filogenéticos e analisar a história evolutiva de muitos organismos. Nos tripanossomatídeos, a utilização desses genes tem permitido inferir relacionamentos filogenéticos entre espécies de diferentes gêneros refletindo a história evolutiva dessa família de parasitas. Diferentes graus de conservação entre as regiões que compõem o cistron ribossômico permitem que regiões específicas dos genes rRNA sejam utilizadas na identificação de gêneros, espécies e genótipos de tripanossomatídeos. As análises baseadas em sequências destes genes têm gerado reconstruções filogenéticas confiáveis devido à inclusão de um grande número de táxons. Até o momento, esse é o gene com maior número de sequências depositadas em bancos de dados.

A estrutura do DNA ribossômico (rDNA) dos tripanossomatídeos compreende unidades de repetição composta por uma unidade de transcrição (cistrons ribossômicos, figura 1) e um espaçador intergênico (IGS), que se repete “in tandem” mais de 100 vezes no genoma. Esses genes são transcritos como um pré-rRNA que é então processado em 3 moléculas altamente conservadas de RNA maduros denominadas, segundo a sua velocidade de sedimentação: 18S (SSU ou subunidade menor), 5,8S e 24S (LSU, subunidade maior). A subunidade maior nos tripanossomatídeos é constituída por duas moléculas de alto peso molecular (24S α e 24S β) e por quatro subunidades de rRNAs de baixo peso molecular: S1, S2, S4 e S6. A subunidade S1 separa as subunidades 24S α e 24S β , enquanto S2, S4 e S6 se

encontram na extremidade 5' da subunidade 24S β . Estas três moléculas (18S, 5,8S e 24S) são separadas por regiões transcritas, com grau de conservação intermediário, denominadas de espaçadores internos transcritos (ITS) (Hernández et al., 1990; Sogin et al., 1986).

Figura 1. Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos.

Sequências obtidas em diversos estudos tem demonstrado que a subunidade menor (SSU) é formada por oito regiões universalmente conservadas (U1-U8), flanqueadas por regiões variáveis (V1-V9). Esse conjunto de regiões mais ou menos conservadas permite, simultaneamente, alinhamentos bastante confiáveis com poder de resolver relacionamentos entre organismos distantes assim como entre espécies muito relacionadas. Fragmentos da SSU rRNA que compreendem as regiões V7-V8 foram adotados como marcadores para análises de *DNA barcoding* e para inferir filogenias de tripanossomatídeos. Análises baseadas nas diversas regiões do cistron ribossômico têm permitido inferir diversos níveis de relacionamento entre organismos. Os espaçadores IGS e ITS, ao contrário da região SSU e LSU, são muito variáveis, com alto grau de polimorfismo inclusive entre isolados da mesma espécie (Fermino et al., 2013; Ferreira et al., 2008; Lima et al., 2012a, 2013; Maia da Silva et al., 2004b, Rodrigues et al., 2006; Viola et al., 2009b).

A enzima gGAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossomal) participa da glicólise, via metabólica que, nos parasitas da família Trypanosomatidae, ocorre em uma organela especializada chamada glicossoma, sendo essencial aos cinetoplastídeos. Na família Trypanosomatidae, a enzima gGAPDH é codificada por dois genes idênticos dispostos em tandem. Além da versão glicossomal, existe uma cópia de outro gene que codifica uma isoforma citoplasmática da enzima (cGAPDH) (Figura 2). Existem evidências de que o gene que codifica a isoforma citoplasmática

(cGAPDH) foi adquirida por transferência horizontal, provavelmente de uma espécie de *Euglena*, enquanto que os genes que codificam para gGAPDH são provenientes de um ancestral comum dos cinetoplastídeos (Hannaert et al., 1998).

Os genes de gGAPDH são bastante conservados entre os tripanossomatídeos, o que propicia alinhamentos múltiplos bastante confiáveis com pouca variação de tamanho, sem “gaps” ou regiões ambíguas. Estas características permitem que o gene inteiro possa ser empregado em análises filogenéticas de organismos muito distantes.

Figura 2. Representação esquemática dos genes GAPDH e modelo estrutural de sua proteína.

Resultados obtidos utilizando sequências do gene gGAPDH para inferir relações filogenéticas entre tripanossomas apresentaram grande congruência com os resultados obtidos em análises similares utilizando o gene SSU rRNA (Hamilton et al., 2004). Depois do gene SSU rRNA, o gene gGAPDH é o mais utilizado (em análises individuais e/ou combinadas) em estudos evolutivos da família Trypanosomatidae. Análises filogenéticas baseadas em sequências concatenadas de gGAPDH e SSU rRNA têm gerado topologias muito robustas e, assim, tem sido as mais utilizadas para o posicionamento de novas espécies e nas inferências de hipóteses sobre a história evolutiva dos tripanossomas (Fermino et al., 2013; Hamilton et al., 2004, 2005a, b, 2007, 2009; Lima et al., 2012a, 2013; Viola et al., 2009a, b).

1.4 A enzima prolina racemase

Prolina racemase (PRAC) pertence ao grupo das aminoácido-racemases, enzimas que interconvertem L e D-aminoácidos e que são classificadas em dois

grandes grupos: o das atividades independentes de piridoxal 5'-fosfato (PLP) e o das dependentes desse co-fator. Prolina, Alanina, Glutamato e Aspartato racemases, juntamente com Diaminopimelato-Epimerase e Hidroxiprolina-2-Epimerase (HyPRE) são enzimas cuja atividade independe de PLP. Enquanto racemases atuam bidirecionalmente, interconvertendo L e D aminoácidos, epimerases apenas catalizam a conversão de L a D-aminoácidos. Aminoácido-racemases têm sido associadas a importantes funções metabólicas, nutricionais e imunológicas (Coatnoan et al., 2009; Goytia et al., 2007; Yoshimura, Esak, 2003) e descritas em uma ampla variedade de bactérias, realizando reações de racemização ou processos similares como a epimerização (Fitzpatrick et al., 2008; Goytia et al., 2007; Visser et al., 2012). Estudos em diferentes bactérias, incluindo *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp., associam a atividade de alanina e glutamato racemases à presença de D-aminoácidos nos componentes da parede celular bacteriana, conferindo proteção contra os mecanismos proteolíticos e as defesas imunes dos hospedeiros (Coatnoan et al., 2009; MacArthur, Archibald 1984; Thompson et al., 1998).

Prolina racemase (PRAC) foi originalmente descrita em 1957 em *Clostridium sticklandii* (Stadman, Elliott, 1957) e somente em 2000 a primeira PRAC de eucarioto foi descrita em *T. cruzi* (Reina-San-Martin et al., 2000). Mais recentemente, a enzima foi descrita em *T. vivax* (Chamond et al., 2009). Reconhece-se hoje que os genes da família PRAC/PRAC-like estão amplamente distribuídos em diferentes grupos de procariotos, sendo, porém, raros em eucariotos e que estes os adquiriram por transferência horizontal (HGT – Horizontal Gene Transfer) a partir de procariotos do grupo Firmicutes (Subclasse Clostridia) (Fitzpatrick et al., 2008; Visser et al., 2012). Eventos de transferência horizontal representam um mecanismo evolutivo importante, participando na adaptação ao parasitismo e a nichos ecológicos especializados e contribuindo como fator de virulência e patogenicidade (Keeling, 2009; Oppendoes, Michels, 2007).

A atividade catalítica da PRAC depende principalmente de dois resíduos de cisteína (Cys₈₈ e Cys₂₃₆), sendo que a substituição de um deles pode abolir a atividade enzimática. Esses resíduos são importantes por transferirem prótons (desprotonação/reprotonação) para o carbono quiral (C^α) de ambos os enantiômeros (L-prolina/D-prolina), do que resulta a estero inversão de configuração (Buschiazzi et al., 2006; Chamond et al., 2003; Goytia et al., 2007). Os dois resíduos de cisteína estão incorporados nos motivos MCGHNS e DRSPCGT (Figura 3), ambos tidos como

essenciais para a identificação de potenciais enzimas PRAC (Chamond et al., 2003; Goytia et al., 2007), mas que, entretanto, não permitem discriminar PRAC de Hidroxiprolina-2-Epimerase (HyPRE), enzima muito similar encontrada em bactérias patogênicas e incorretamente anotada como PRAC (Goytia et al., 2007). A comparação de sequências de TcPRACs e epimerases de bactérias permitiu identificar três sítios adicionais (R1, R2 e R3), envolvidos na especificidade ao substrato, para discriminar as duas proteínas. O primeiro e mais importante (R1) é o aminoácido fenilalanina, ausente em HyPRE e essencial para os contatos hidrofóbicos entre a PRAC e os átomos de carbono da prolina; a substituição desse resíduo resulta na perda da atividade da enzima (Goytia et al., 2007). Os outros dois resíduos estão posicionados muito próximos ao motivo DRSPCGT; R2 geralmente é uma cisteína, que pode ser substituída por leucina; e R3 conserva uma tirosina, que pode ser substituída por histidina. Essas substituições parecem não afetar a atividade enzimática e continuam fornecendo o ambiente hidrofóbico necessário para as interações entre a enzima e os ligantes do substrato (Goytia et al., 2007).

		R1	*	R2	M III*	R3	
TcPRACA	[1...92]	LEPRGHDMGAFLEPDEEGADLGMVMDTGGYLANMCHNSIAAV	[139...265]	NTVLSVEIYGPPTNPEANY--KNVVI FGNRQADRSPTGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[321...393]		
TcPRACB	[1...53]	LEPRGHDMGAFLEPDEEGADLGMVMDTGGYLANMCHNSIAAV	[100...226]	NTVDSVEIYGNATNPEAKY--KNVVI FGNRQADRSPTGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[282...354]		
<i>C. difficile</i>	[1...53]	LEPRGHDMGGSVMTQPCPDADFGIIFMDGGGYLANMCHGTIGAM	[100...221]	KTVDVEIYDEPTHEATY--KNVVI FGQGVDRSPGOTSAKMATLYAKGELKVG	[277...335]		
<i>C. sticklandii</i>	[1...20]	HEPRGHDMGGSITTSNNKEADFGIIFMDGGGYLANMCHGSGIGAA	[67...188]	KTVDVEIYDEPSNPEATY--KNVVI FGQGVDRSPGOTSAKMATLYAKGHLKID	[244...299]		
<i>S. abortus</i>	[1...52]	FEPRGHDMGGSILYPTFRPCDVAFLFIETSGCLPMCHGTIGTV	[99...219]	NRLSMLWTGKPKHPQAH--RNAVFYGDKALDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[274...333]		
<i>S. suis</i>	[1...52]	FEPRGHDMGGSILYPTFRPCDVAFLFIETSGCLPMCHGTIGTV	[99...219]	NRLSMLWTGKPKHPQAH--RNAVFYGDKALDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[274...333]		
<i>S. melitensis</i>	[1...52]	FEPRGHDMGGSILYPTFRPCDVAFLFIETSGCLPMCHGTIGTV	[99...219]	NRLSMLWTGKPKHPQAH--RNAVFYGDKALDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[274...333]		
<i>S. pseudomallei</i>	[1...50]	LEPRGSDVLMGALLCEPVSAAGAGVIFFNAGYLMCHGTIGLV	[97...205]	APIDHIELFAD--DPEYDS--RSFVLCPGHAYDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[257...310]		
<i>P. putida</i>	[1...50]	LEPRGSDVLMGALLCEPVSAAGAGVIFFNAGYLMCHGTIGLV	[97...205]	APIDHIELFAD--DPEYDS--RSFVLCPGHAYDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[257...310]		
<i>P. fluorescens</i>	[1...50]	LEPRGSDVLMGALLCEPVSAAGAGVIFFNAGYLMCHGTIGLV	[97...205]	ALIDHIELFAD--DAEADS--RNFVLCPGHAYDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[257...310]		
<i>P. aeruginosa</i>	[1...50]	LEPRGSDVLMGALLCEPVSAAGAGVIFFNAGYLMCHGTIGLV	[97...205]	GAIDHIELFAD--DPEYDS--RNFVLCPGHAYDRSPGOTSAKMATLYAKGKLKFC	[257...314]		
<i>P. aeruginosa</i> SC	[1...52]	NEPRGGVTHANLLVPKDPRAQMGWIMEADTFPMGSGNSLCVA	[99...220]	DHLSFCOLAAPPERRDVLGANNVIRPKIKDRSPGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[278...344]		
<i>S. anthracis1</i>	[1...53]	NEPRGHDMGAFLEPDEEGADLGMVMDTGGYLANMCHGTIGVC	[100...220]	RLSIVETTDFTHEAIV--KNVVI FGNRQADRSPTGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[275...345]		
<i>S. anthracis2</i>	[1...53]	YEPGRGHDMGCGIITPPSAHADFGVLFHMHGEGSTHCHGTIAVI	[100...217]	KGIYGVIFSDDFMGEGATL--RNVTFI FADGQVDRSPGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[272...331]		
<i>S. cenocepacia</i> CT	[1...53]	FEPRGHDMGGSVMTQPCPDADFGIIFMDGGGYLANMCHGTIGLV	[100...221]	NHIIYGTIIANAPRHAGSTQ--ANCCV FADREVDRSPGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[276...335]		
<i>V. parahaemolyticus</i>	[1...52]	FEPRGHDMGGSVLPFPCSDNADASILFIETSGCLPMCHGTIGTV	[99...219]	CGVSIVLNTGKPTQEGATA--RNAVFYGDKALDRSPGOTSAKMATLYAKGQLRIG	[274...332]		

Figura 3. Alinhamentos de sequências de proteínas PRAC (Prolina racemase) e HyPre (Hidroxiprolina-2-Epimerases). Os motivos * (MCGH) e MIII estão coloridos em amarelo e verde, respectivamente. Os resíduos de catalíticos Cys estão coloridos em vermelho. R1, R2 e R3, elementos essenciais para a especificidade do substrato e para a discriminação de PRAC e HyPre, estão em verde (PRAC) ou azul (HyPre).

Os tripanossomatídeos dependem de diferentes fontes de carbono, disponíveis em seus hospedeiros invertebrados e vertebrados, para a obtenção de energia. No inseto vetor, por exemplo, aminoácidos como L-prolina e L-glutamina estão disponíveis na hemolinfa, sendo catabolizadas pelas formas dos tripanossomatídeos adaptadas ao inseto vetor, com uma forte preferência por L-prolina. Esse aminoácido é considerado a principal fonte de energia desses protozoários em seus hospedeiros invertebrados, podendo também operar como molécula osmoreguladora e como sinal

de diferenciação para formas infectantes (Bringaud et al., 2006; Contreras et al., 1985; Kollien et al., 2001).

No hospedeiro vertebrado, *T. brucei* e *T. cruzi* tem uma preferência por glicose, a fonte de carbono mais abundante no sangue (Lamour et al., 2005). Entretanto, estudos recentes demonstraram a importância de L-prolina em todo o ciclo de vida do parasita, não apenas para as formas presentes no vetor, mas também para os estágios do parasita que se desenvolvem nos hospedeiros vertebrados (Bringaud et al., 2006). Capturada por sistema de transporte, L-prolina fornece energia para as formas metacíclicas nos processos de invasão celular e também protege o parasita das espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (Magdaleno et al., 2009; Martins et al., 2010; Sayé et al., 2014).

Desde a descoberta de PRAC em *T. cruzi* (Reina-San Martín et al., 2000), os estudos sobre a enzima baseiam-se na cepa CL-Brener de *T. cruzi*. A pesquisa de genes PRAC no genoma de *T. cruzi* CL-Brener identificou dois genes codificando duas isoformas, ambas essenciais para a viabilidade e expressas diferencialmente durante o desenvolvimento do parasita: *TcPRACA* (45kDa), isoforma secretada por tripomastigotas metacíclicos e sanguíneos; e *TcPRACB* (39kDa), uma proteína intracelular de epimastigotas. As duas enzimas compartilham 96% de identidade, diferindo, entretanto, nas propriedades cinéticas relevantes para a atividade catalítica e pela presença de um peptídeo sinal exclusivamente em *TcPRACA*, que é a isoforma secretada (Chamond et al., 2003, 2005). Evidência obtida com a utilização de inibidores de *TcPRAC* indica a enzima como potencial alvo quimioterapêutico da Doença de Chagas (Coutinho et al., 2009; Conti et al., 2011; Benerman et al., 2013).

Diversos estudos apontam para múltiplos papéis das enzimas PRAC em *T. cruzi* e as duas isoformas são essenciais para o ciclo de vida do parasita. Enquanto a supressão dos genes compromete severamente a viabilidade do parasita, a superexpressão acelera a metaciclogênese e, conseqüentemente, aumenta a virulência do parasita (Chamond et al., 2003). Foi também observado que a PRAC secretada induz maior resposta proliferativa de linfócitos B (Buschiazzi et al., 2006; Chamond et al., 2005; Reina-San Martín et al., 2000), resposta esta inespecífica, que retarda os mecanismos efetores do sistema imune, favorecendo a evasão do sistema imune e a persistência do parasita. *TcPRAC* também ativa a produção de IL-10, uma citocina que aumenta a suscetibilidade do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, aumentando assim a virulência do parasita (Bryan, Norris, 2010; Chamond et al., 2003, 2005;

Reina-San-Martin et al., 2000). Nesse sentido, estudos demonstraram que o tratamento de macrófagos com *TcPRAC* recombinante induz a secreção de um fator solúvel que promove a proliferação de células B (Spera et al., 2013). De forma semelhante às paredes bacterianas, também foi sugerido que *TcPRACs* participam na adição de D-aminoácidos em proteínas ou peptídeos, o que gera parasitas menos imunogênicos e proporcionam resistência contra os mecanismos proteolíticos do hospedeiro (Coatnoan et al., 2009; Reina-San-Martin et al., 2000).

O gene *TvPRAC*, que codifica a prolina racemase em *T. vivax*, um parasita que se multiplica extracelularmente na corrente sanguínea, em compartimentos teciduais e no Sistema Nervoso Central (Batista et al., 2013; D'Archivio et al., 2013; Galiza et al., 2011; Whitelaw et al., 1988), foi descrito como um gene de cópia única sem peptídeo sinal (Chamond et al., 2009). A *PRAC* de *T. vivax* mantém características e parâmetros cinéticos comparáveis às da *PRAC* de *T. cruzi* (Chamond et al., 2009) e exibe também atividade mitogênica sobre células B, esta última caracterizada em experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando proteínas recombinantes. Experimentos *in vivo* indicaram incremento do número de células B uma semana pós-infecção e, também, altos títulos de anticorpos no soro de camundongos (Chamond et al., 2009). Portanto, *TvPRAC* apresenta propriedades mitogênicas similares às de *TcPRAC* de *T. cruzi* (Chamond et al., 2009), apesar da ausência de peptídeo sinal para secreção. Esses estudos levaram às hipóteses de que *TvPRAC* seja secretada via bolso flagelar e/ou liberada com a morte do parasita (Chamond et al., 2009).

Estudos imunológicos e bioquímicos demonstraram que *TcPRAC* (*T. cruzi*) e *TvPRAC* (*T. vivax*) exibem atividade de racemase e são agentes mitogênicos de células B, induzindo ativação policlonal que resulta no retardo da resposta imune específica para antígenos do parasita, concomitantemente com o aumento da parasitemia na fase inicial da infecção (Buschiazzi et al., 2006; Etienne et al., 2005, 2009; Reina-San-Martin et al., 2000).

Estudos genômicos revelaram que o locus dos genes *PRAC* é bem conservado nos genomas de *T. cruzi* e *T. vivax*, mantendo, portanto, alto grau de sintonia entre essas duas espécies de tripanossomas filogeneticamente distantes. Não foram encontradas cópias de *PRAC* nos genomas de outros tripanossomas africanos (*T. brucei* e *T. evansi*) e apenas um pseudogene foi encontrado em *T. congolense* (Chamond et al., 2009). Nas espécies de *Leishmania* estudadas (*L. major*, *L.*

brazilensis e *L. infantum*), o gene PRAC não foi encontrado (Chamond et al., 2003, 2009).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

Os tripanossomas possuem uma ampla variedade de hospedeiros; algumas espécies têm hospedeiros vertebrados bastante específicos, enquanto outras são capazes de infectar vertebrados de diversas ordens, embora, não apresentem infecções cruzadas entre hospedeiros pertencentes às diferentes classes de animais. Apenas duas espécies são patogênicas para o homem: *T. cruzi* e *T. brucei*.

A maioria dos tripanossomas se desenvolve exclusivamente na corrente sanguínea enquanto que algumas espécies podem também se desenvolver nos compartimentos extravasculares e intracelulares. Nos seus vetores, artrópodes e sanguessugas; os tripanossomas se desenvolvem apenas no intestino ou nas glândulas salivares.

Diversificações morfológicas e funcionais têm contribuído para a adaptação dos tripanossomatídeos aos seus diversos ciclos de vida, hospedeiros vertebrados e vetores. A adaptação do parasita a complexos ambientes presentes nos hospedeiros depende da adaptação de processos fisiológicos e a capacidade de evadir o sistema imune do hospedeiro.

A caracterização de moléculas essenciais envolvidas no metabolismo e nas interações parasita-hospedeiro é fundamental para entender as diversas estratégias evolutivas utilizadas pelos tripanossomas na infecção e sobrevivência dentro dos hospedeiros vertebrados e invertebrados e na emergência da patogenicidade.

Genes codificadores de moléculas importantes na interação parasita-hospedeiro, que participam dos processos de invasão, multiplicação, virulência, patogenicidade e evasão devem refletir os mecanismos desenvolvidos pelas diferentes espécies de tripanossomas durante a adaptação aos diversos ciclos de vida em seus diferentes hospedeiros vertebrados e invertebrados ao longo da evolução dos tripanossomas.

Diversas proteínas têm sido descritas em *T. cruzi* mediando processos fundamentais para a infecção, patogenicidade e sobrevivência do parasita. Para esse trabalho, selecionamos a enzima PRAC, bem caracterizada para *T. cruzi* por estar envolvida na ativação policlonal usada como estratégia do parasita para evasão do sistema imune, consequentemente, na virulência e patogenicidade.

A enzima PRAC tem sido estudada como um alvo importante para o desenvolvimento de drogas (PRAC) e, recentemente, também passou a ser investigada como antígenos para vacina. O conhecimento da diversidade genética de homólogos de PRAC de diferentes espécies e genótipos é fundamental para o sucesso desses objetivos.

A presença de homólogos de PRAC em *T. cruzi* e *T. vivax* e ausência em *T. brucei* e *T. congolense* sugerem diferentes aquisições e ou múltiplas perdas deste gene durante a evolução dos tripanossomas.

Estudos filogenéticos mais abrangentes são necessários para entender a origem procariótica, o processo de transferência horizontal, as relações filogenéticas entre genes homólogos de eucariotos e procariotos e a evolução dos genes PRAC.

O estudo evolutivo de proteínas envolvidas na invasão, virulência e evasão de tripanossomas é fundamental para entender a evolução da patogenicidade e da capacidade de infectar diferentes espécies de mamíferos dos tripanossomas. A presença e repertório de genes codificadores de moléculas com papel importante nos processos biológicos devem diferir entre espécies/isolados de tripanossomas que apresentam diferentes ciclos de vida e hospedeiros e que podem ser infectantes e patogênicos para o homem.

A enzima PRAC nunca foi explorada em espécies de tripanossomas não infectantes para o homem e não patogênica para seus hospedeiros, que são de grande importância para o entendimento da história evolutiva do gênero *Trypanosoma*. O conjunto de organismos selecionados para esse estudo permitirá uma análise bastante abrangente da evolução e relações filogenéticas entre genes homólogos à PRAC, contribuindo para o entendimento do papel dessas enzimas nos ciclos de vida, processos de infecção e evasão das defesas dos hospedeiros e patogenicidade de tripanossomas.

2.2 Objetivos

- Investigar a presença de homólogos de PRAC, descrever o repertório, organização genômica e sintenia de genes com análises de genomas disponíveis de tripanossomatídeos de diversos gêneros, bodonídeos e euglenídeos;

- Caracterizar genes *TcPRAC* de isolados de *T. cruzi* representativos da vasta diversidade intra-específica (DTUs TcI-TcVI e Tcbat);
- Investigar genes homólogos de *TcPRAC* em espécies de tripanossomas do subgênero *Schizotrypanum* restritas à morcegos (*T. c. marinkellei*, *T. dionisii* e *T. erneyi*), outras espécies parasitas de mamíferos (*T. rangeli*, *T. conorhini* e *T. lewisi*) e tripanossomas de anuros, crocodilos e serpentes;
- Analisar as relações filogenéticas entre homólogos de *TcPRAC* de tripanossomas, outros eucariotos e procariotos;
- Formular hipóteses sobre a história evolutiva dos genes PRAC considerando os resultados obtidos com as análises filogenéticas dos parasitas e das prováveis bactérias doadoras do gene PRAC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tripanossomas utilizados e cultivo

As diversas espécies e isolados de tripanossomas utilizados neste estudo, assim como seus respectivos hospedeiros de origem e áreas geográficas de isolamento estão detalhadas na tabela 1. Os tripanossomas foram cultivados em meio bifásico composto de 4% de BAB e 15% de hemáceas de carneiro; com uma fase líquida composta de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) com 10% de soro fetal bovino e incubado a 28 °C. Todas as culturas de tripanossomas estabelecidas foram criopreservadas na coleção de culturas de tripanossomatídeos (TCC: Trypanosomatidae Culture Collection) do Departamento de Parasitologia, ICB II – USP e foram mantidos congelados em N₂ líquidos em meio LIT com 10% de SFB e 20% de DMSO.

Tabela 1. Espécies de tripanossomas e suas respectivas sequências de TryPRAC e genes homólogos determinados neste estudo ou obtidos de bancos de dados.

TCC/SAG	Tripanossoma/ isolado	Hospedeiro	Origem geográfica	DTU/ genótipo	Origem da sequência
<i>Trypanosoma cruzi</i>					
1321	DM28	<i>Didelphis marsupialis</i>	Colômbia	Tcl	PCR
	Sylvio X10.6	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	Tcl	GeneBank
	JR cl4	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	Tcl	Genomic draft
30	G	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil	Tcl	PCR
1325	FC1	<i>Homo sapiens</i>	Panamá	Tcl	PCR
1324	MM1	<i>Homo sapiens</i>	Panamá	Tcl	PCR
1832		<i>Lutra longicaudis</i>	Panamá	Tcl	PCR
1834		<i>Saguinus geoffroyi</i>	Panamá	Tcl	PCR
1837		<i>Triatoma dimidiata</i>	Panamá	Tcl	PCR
1840		<i>Rhodnius pallescens</i>	Panamá	Tcl	PCR
1841		<i>Rhodnius pallescens</i>	Panamá	Tcl	PCR
	Nay	<i>Triatoma peri</i>	México	Tcl	PCR
	Camp9	<i>Triatoma peri</i>	México	Tcl	PCR
	D1	<i>Didelphis marsupialis</i>	Colômbia	Tcl	PCR
	588	<i>Homo sapiens</i>	Guatemala	Tcl	PCR
1474	Tc297	<i>Cavia sp.</i>	Peru	Tcl	PCR
1478	Tc293	<i>Cavia sp.</i>	Peru	Tcl	PCR
	TC3	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	Tcl	PCR
	TC11	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	Tcl	PCR
	TC23	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	Tcl	PCR
	536	<i>Rattus rattus</i>	Venezuela	Tcl	PCR
1401	RP01	<i>Rhodnius prolixus</i>	Venezuela	Tcl	PCR
1338		<i>Carollia perspicillata</i>	Venezuela	Tcl	PCR
TC36		<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	Tcl	PCR
183	183	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	Tcl	PCR
1990	ATCC30823	<i>Canis familiaris</i>	EUA	Tcl	PCR
1989	ATCC30160	<i>Homo sapiens</i>	EUA	Tcl	PCR
1471	XE: 5292 3246	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	Tcl	PCR
593	T. cruzi 593	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	Tcl	PCR
34	Y	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TclI	PCR
139	T.c IB42X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil	TclI	PCR
	1508	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TclI	PCR
	EP23X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brasil	TclI	PCR
2120	Esmeraldo cl3	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TclI	PCR

873	573 LU	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TcIII	PCR
845	MT3663	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Brasil	TcIII	PCR
844	MT3869	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TcIII	PCR
863	T.c 863	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Brasil	TcIII	PCR
132	T.c IB74P	<i>Philander frenatus</i>	Brasil	TcIII	PCR
1323	Suinca	<i>Canis familiaris</i>	Brasil	TcIII	PCR
1078	T.c QJIII	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brasil	TcIII	PCR
1831	T.c	<i>Tamandua mexicana</i>	Panamá	TcIII	PCR
1836	T.c	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Panamá	TcIII	PCR
1437	B6338/4	<i>Proechimys longicaudatus</i>	Brasil	TcIII	PCR
1356	B6056	<i>Oxymycterus</i> sp.	Brasil	TcIII	PCR
135	IB14X	<i>Proechimys iheringi</i>	Brasil	TcIII	PCR
864	Tc864	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Brasil	TcIII	PCR
1386	Unidero	<i>Canis familiaris</i>	Brasil	TcIII	PCR
1080	T.cruzi QMII	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brasil	TcIII	PCR
1078	QJIII	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brasil	TcIII	PCR
1079	QMI	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brasil	TcIII	PCR
	Arma13 cl1	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Paraguai	TcIII	PCR
	Arma18 cl3	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Paraguai	TcIII	PCR
	M6241 cl6	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TcIII	Genomic draft
2124	CAN III	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TcIV	PCR
85	JJ (José Julio)	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	TcIV	PCR
82	RBX	<i>Rhodnius brethesi</i>	Brasil	TcIV	PCR
778	Rb 778	<i>Rhodnius brethesi</i>	Brasil	TcIV	PCR
	STC	<i>Procyon lotor</i>	EUA	TcIV	PCR
	92122	<i>Procyon lotor</i>	EUA	TcIV	PCR
967	NRCL3	<i>Homo sapiens</i>	Chile	TcV	PCR
185	185	<i>Triatoma infestans</i>	Bolívia	TcV	PCR
656	656	<i>Homo sapiens</i>	Bolívia	TcV	PCR
	CL	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	TcVI	PCR
	CL Bre -Esm	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	TcVI	TritrypDB
	CL-Bre-Non-Esm	<i>Triatoma infestans</i>	Brasil	TcVI	TritrypDB
	Tula cl2	<i>Homo sapiens</i>	Chile	TcVI	Genomic draft
793	MO294	<i>Myotis levis</i>	Brasil	Tcbat	PCR
947	3681	<i>Myotis nigricans</i>	Brasil	Tcbat	PCR
293	998	<i>Myotis levis</i>	Brasil	Tcbat	PCR
203	248	<i>Myotis ruber</i>	Brasil	Tcbat	PCR
1122	1122	<i>Myotis albescens</i>	Brasil	Tcbat	PCR
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>					
B7		<i>Phyllostomus discolor</i>	Brasil		TritrypDB
344		<i>Carollia perspicillata</i>	Brasil		Genomic Draft
1705		<i>Artibeus planirostris</i>	Brasil		PCR
<i>Trypanosoma dionisii</i>					
211		<i>Eptesicus brasiliensis</i>	Brasil		Genomic draft
495		<i>Carollia perspicillata</i>	Brasil		PCR
1778		<i>Carollia perspicillata</i>	Brasil		PCR
<i>Trypanosoma erneyi</i>					
1946		<i>Mops condylurus</i>	Mossambique		Genomic draft
1293		<i>Tadarida</i> sp.	Mossambique		PCR
1294		<i>Tadarida</i> sp.	Mossambique		PCR
<i>Trypanosoma rangeli</i>					
031	San Agustin	<i>Homo sapiens</i>	Colômbia	A	PCR
594	SMH-79	<i>Homo sapiens</i>	Guatemala	A	PCR
1257	IM5051	<i>Saguinus bicolor</i>	Brasil	A	PCR
701	ROR-62	<i>Rhodnius robustus</i>	Brasil	A	PCR
086	AM80	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	B	Genomic draft
238	5-31	<i>Saguinus labiatus</i>	Brasil	B	PCR
010	Legeri	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Brasil	B	PCR
014	PG	<i>Homo sapiens</i>	Panamá	C	PCR
1260	Pa479GS	<i>Rhodnius pallescens</i>	Panamá	C	PCR
1952		<i>Saguinus geoffroyi</i>	Panamá	C	PCR
023	SC58	<i>Echimyis dasythrix</i>	Brasil	D	PCR
643	Tra643	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Brasil	E	PCR
1224	IM5040	<i>Rhodnius pictipes</i>	Brasil	E	PCR
1225		<i>Rhodnius pictipes</i>	Brasil	E	PCR
1228		<i>Rhodnius pictipes</i>	Brasil	E	PCR
<i>Trypanosoma conorhini</i>					

025	<i>Rattus rattus</i>	Brasil		Genomic draft
Trypanosoma lewisi				
034	<i>Rattus rattus</i>	Brasil		Genomic draft
Trypanosoma vivax				
Y486	<i>T. vivax</i>	Nigéria		TritypDB
Trypanosoma brucei brucei				
TREU927	<i>Glossina pallidipes</i>	Quênia		TritypDB
Trypanosoma brucei gambiense				
DAL972	<i>Homo sapiens</i>	Costa do Marfim		TritypDB
Trypanosoma congolense				
IL3000	<i>Bos sp.</i>	Quênia	Savannah	TriTrypDB
Cam22	<i>Capra aegagrus hircus</i>	Camarões	Forest	PCR
WG5	<i>Capra aegagrus hircus</i>	Quênia	Kilifi	PCR
TREU1457	<i>Bos taurus</i>	Nigéria	Savannah	PCR
Trypanosoma simiae				
Ken14	<i>Glossina sp.</i>	Gâmbia		PCR
Trypanosoma godfreyi				
Ken7	<i>Glossina sp.</i>	Gâmbia		PCR
Trypanosoma serpentis				
1052	<i>T. serpentis</i>	Brasil		Genomic draft
Trypanosoma grayi				
ANR4	<i>Glossina palpalis</i>	Gâmbia		TritypDB
Trypanosoma sp.				
339	<i>Trypanosoma sp.</i>	Brasil		Genomic draft
Tripanossomatídeos de insetos				
Gênero Crithidia				
<i>C. fasciculata</i>	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Brasil		TritypDB
<i>C. acanthocephali</i>	<i>Acanthocephala femorata</i>	Brasil		Genomic draft
Gênero Leptomonas				
<i>L. costaricensis</i>	<i>Ricollia similima</i>	Costa Rica		Genomic draft
Gênero Leishmania				
<i>L. major</i>	<i>Homo sapiens</i>	Israel		TritypDB
<i>L. tarentolae</i>	<i>Tarentola mauritanica</i>	Argélia		TritypDB 1
Gênero Endotrypanum				
<i>E. schaudinni</i>	<i>Choloepus hoffmani</i>	Panamá		Genomic draft
Gênero Angomonas				
<i>A. desouzai</i>	<i>Ornidia obesa</i>	Brasil		Genomic draft
<i>A. deanei</i>	<i>Zelus leucogrammus</i>	Brasil		Genomic draft
Gênero Strigomonas				
<i>S. culicis</i>	<i>Aedes vexans</i>	EUA		Genomic draft
<i>S. oncopelti</i>	<i>Oncopeltus sp.</i>	EUA		Genomic draft
Gênero Herpetomonas				
<i>H. muscarum</i>	<i>Musca domestica</i>	EUA		Genomic draft
Gênero Phytomonas				
<i>Phytomonas sp.</i>	<i>Jatropha macrantha</i>	Peru		Genomic draft
Euglena gracilis				
SAG 1224-5/25	Free living	Desconhecido		Genomic draft
Discoplastis spatirhyncha				
SAG 1224-42	Free living	Alemanha		Genomic draft
Eutreptia viridis				
SAG 1226-1c	Free living	Reino Unido		Genomic draft
Bodo sp.				
ATCC 50149	<i>Ictalurus punctatus</i>	EUA		Genomic draft
Parabodo caudatus				
ATCC 30905	Free living	Tchecoslováquia		Genomic draft

3.2 Extração de DNA

Os tripanossomas ampliados em cultura foram lavados 3 vezes com PBS e os "pellets" obtidos foram ressuspensos ($1,0 \text{ ml}/10^9$ tripanossomas) em SE (NaCl a $0,15 \text{ M}$, EDTA a $2,5 \text{ mM}$, pH 8,0, Tris a $2,5 \text{ mM}$, pH 8,0), em banho de gelo. Após a adição

de 0,5% de Sarkosil, 100 mg/ml de Pronase e 10 mg/ml de Rnase, o material foi incubado em banho-maria, a 55-60 °C, por 1 a 2 h. O DNA foi extraído com Fenol/Clorofórmio e precipitado com acetato de sódio a 0,3 M (pH 7,0) e 2 volumes de Etanol, por incubação, por 12 a 15 horas, a -20 °C. O DNA precipitado foi lavado com Etanol a 70%, os "pellets" secos a 37 °C e ressuspensos em TE (TrisHCl a 10 mM, pH 7,4, EDTA a 1 mM pH 8,0). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro U.V./ Visível, Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech).

3.3 Reações de PCR e eletroforese dos produtos amplificados em gel de agarose.

Para as reações de PCR foi utilizada a seguinte mistura de reação: 100 ng de DNA genômico, previamente incubado por 2 min a 95 °C; 100 ng de cada "primer"; 200 mM de cada dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 5µl de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂); 2,5 µl de *Taq* DNA polimerase; e água bidestilada deionizada e autoclavada (qsp 50 µl). Os ciclos de amplificação e as temperaturas de anelamento foram definidos de acordo com os "primers" empregados. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo, fotografados em transluminador de luz. Os "primers" utilizados nas reações de PCR estão especificados na tabela abaixo.

Tabela 2. Ciclos de amplificação e temperaturas utilizadas nas diferentes reações de PCR

Gene e oligonucleotídeos empregados	Condições de amplificação
SSU rDNA (completo)	
KDR3 5' GAT CTG GTT GAT TCT GCC AGT AG 3'	1 ciclo: 3 min 94 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min
KDR5 5' GAT CCA GCT GCA GGT TCA CCT AC 3'	55 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C
SSU rDNA (V7-V8)	
609F 5' CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3'	1 ciclo: 3 min 94 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min
706R 5' TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3'	48 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C
Oligonucleotídeos para sequenciamento da SSU:	
1156F 5'CGT ACT GGT GCG TCA GAG G 3'	1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 15 seg 96 °C; 15
1156R 5'CCT CTG ACG CAC CAG TAC G 3'	seg 50 °C; 4 min 60 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C
285F 5'GTG TTG ATT CAA TTC ATT C 3'	
285R 5'GAA TGA ATT GAA TCA ACA C 3'	

202F 5'ATG CTC CTC AAT GTT CTG 3'
202R 5'CAG AAC ATT GAG GAG CAT3'

ITS rDNA (ITS inteiro, ITS1 ou ITS2)

IR1 5' GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT 3'
5.8SR 5' GGA AGC CAA GTC ATC CAT C 3'
IR2 5' GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCA GGT CTG 3'

1 ciclo: 3 min 94 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C

gGAPDH

GAP-trymodF 5'GGB CGC ATG GTS TTC CAG 3'
GAP-tryR 5'CCC CAC TCG TTR TCR TAC C 3'

1 ciclo: 3 min 95 °C, 29 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 10 min 72 °C

Oligonucleotídeos para sequenciamento do gGAPDH:

GAP 4R 5'GTG CTG GGG ATG ATG TTC3'
GAP 3F 5'GTG AAG GCG CAG CGC AAC 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 15 seg 96 °C; 15 seg 50 °C; 4 min 60 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

Reações de sequenciamento de fragmentos clonados:

M13F 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'
M13R 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 15 seg 96 °C; 15 seg 50 °C; 4 min 60 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

PRAC-To (Prolina racemase) tripanossomas

PRAC-To 5' GGATTGTSACGAGTGGT 3'
PRAC-To 5' GATGCTRTCGTGAC 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 45 seg 96 °C; 45 seg 48 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

PRAC-Tc (Prolina racemase) *T. cruzi*

PRAC-Tc 5' CTCTCCCATGGGGCAGGAAAA 3'
PRAC-Tc 5' CTGAGCTCGACCAGATCTATCT 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 45 seg 96 °C; 45 seg 50 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

PRAC-Tv (Prolina racemase) *T. vivax*

PRAC-Tv 5' ATGCAGTTCACCGGAACAATG 3'
PRAC-Tv 5' GCCGTACGAAATGGATCAC 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 45 seg 96 °C; 45 seg 57 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

PRAC-Tr (Prolina racemase) *T. rangeli*

PRAC-Tr 5' ATGCGTCTCAAGAAGTCCGT 3'
PRAC-Tr 5' TCCCGGTATTTGTTCTCTCCG 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 45 seg 96 °C; 45 seg 56 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

PRAC-Td (Prolina racemase) *T. dionisii*

PRAC-Td 5' TGCCTCGACATGCATACG 3'
PRAC-Td 5'GGTGTGAAACCCGTGAT 3'

1 ciclo: 1 min 96 °C, 30 ciclos: 45 seg 96 °C; 45 seg 50 °C; 1 min 72 °C, 1 ciclo: 5 min 72 °C

3.4 Purificação de fragmentos de DNA amplificados por PCR

Fragmentos de DNA amplificados por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1.5% e corados com brometo de etídeo. Os fragmentos foram cortados dos géis e extraídos da agarose em coluna Spin-X (Costar®, Nova York, NY, Estados Unidos). Os produtos purificados foram clonados ou submetidos diretamente à reação de sequenciamento.

3.5 Clonagem e sequenciamento

Fragmentos de DNA amplificados por PCR, foram clonados em vetor pGEM®-T Easy (Promega®, São Paulo, SP, Brasil) e transformados em células DH10β. Os clones positivos foram crescidos no meio de cultura LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e purificados utilizando o sistema “Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System” (Promega®, São Paulo, SP, Brasil). O DNA clonado e produtos amplificados por PCR (não clonados) foram sequenciados em aparelho ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) utilizando o kit Big Dye Terminator, conforme especificações do fabricante. As reações de PCR foram efetuadas empregando primers específicos do fragmento clonado ou primers universais M13F/M13R utilizados no sequenciamento de fragmentos de DNA clonados em vetor pCR 2.1, sobre condições detalhadas na tabela 2.

3.6 Alinhamento de sequências e construção das matrizes de similaridade

Tanto as sequências de nucleotídeos determinadas neste estudo quanto aquelas obtidas de bancos de dados, foram alinhadas através do programa Clustal X versão 1.8 (Thompson et al., 1997) e manualmente ajustadas utilizando o programa GeneDoc v. 2.7 (Nicholas et al., 1997). O alinhamento de sequências tanto de nucleotídeos como de aminoácidos dos genes em estudo foram submetidas a análises de similaridade (baseadas em distância *p* não corrigida) utilizando-se o programa Point Replacer v.2.2 disponibilizado pelo autor (Alves, J. M.) no endereço <http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>.

3.7 Análises filogenéticas e genealogias

As inferências filogenéticas foram determinadas pelos métodos de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (MV) ("maximum likelihood") e análise bayesiana (B). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2002) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos ("RAS-TBR Branch-breaking"). As análises de suporte por "bootstrap" foram feitas em 100 replicatas com os mesmos parâmetros empregados na busca. As análises de MV foram realizadas no programa RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006). Foram empregadas 500 replicatas usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama e diagramas obtidos por parcimônia como árvores iniciais. Os parâmetros do modelo de substituição empregado foram estimados durante a busca. O suporte de ramos foi estimado com 500 replicatas de "bootstrap" no programa RAxML. As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Foram empregadas 500.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama mais proporção de sítios invariantes. Para a verificação do suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos no MrBayes v.3.1.2. As genealogias de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram inferidas por análises de Network, utilizando o programa Splitstree v4.11.3 (Huson e Bryant, 2006). Foi utilizado o método de "Neighbor-net" e os valores de suporte foram estimados através da realização de 100 réplicas de "bootstrap", usando os mesmos parâmetros otimizados pelo método de "Neighbor-net".

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o trabalho desenvolvido para essa tese estão resumidamente apresentados e discutidos abaixo. Optamos por apresentar os resultados em fase de publicação, que constitui o manuscrito anexado no final da tese.

4.1 Evolução e relações filogenéticas de genes prolina racemase adquiridos através de um único e evento de transferência horizontal a partir de bactérias para o ancestral de *Trypanosoma*.

Apêndice. The evolution and phylogenetic relationships of proline racemase genes acquired through a single and ancient horizontal gene transfer from bacterium by a common *Trypanosoma* ancestor.

Caballero ZE; Martins AGC; Ferreira RC; Buck GA; Camargo EP; Minoprio P & Teixeira MMG

Os tripanossomas são altamente divergentes quanto à patogenicidade, variedade de hospedeiros e ciclos de vida. A maioria das espécies vive na corrente sanguínea enquanto alguns também se desenvolvem em sítios intracelulares como *T. cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas) e em compartimentos extra-vasculares como *T. vivax* (agente da tripanosomose da pecuária). Prolina racemase (PRACs) de *T. cruzi* (TcPRAC) e *T. vivax* (TvPRAC) foram implicadas no metabolismo e na evasão do sistema imune no hospedeiro. Ao longo da sua história evolutiva, tripanossomas tem utilizado várias estratégias para infectar e obter energia de vetores e vertebrados e evadir as defesas dos hospedeiros, sendo estas cruciais na adaptação dos tripanossomas em seus hospedeiros. A origem bacteriana e ausência da PRAC em *T. brucei* e *T. congolense* lançaram questões acerca da aquisição e evolução de PRAC e seu papel na evolução de espécies de tripanossomas.

Métodos: Com o objetivo de analisar o repertório de genes PRAC de tripanossomas (TryPRAC), procuramos homólogos de TcPRAC nos genomas de 13 espécies de tripanossomas, tripanossomatídeos de oito gêneros, dois bodonídeos e três euglenídeos. Genes de PRAC foram também procurados nos genomas de outros

eucariotos e procariotos. Todos os genes foram analisados usando técnicas moleculares e filogenéticas.

Resultados: Genes *Try*PRAC foram identificados em todos os genótipos de *T. cruzi*; TcI-TcIV e Tcbat; *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* e *T. erneyi* (todos filogeneticamente relacionados) e em *T. rangeli*, *T. conorhini* e *T. lewisi*. O polimorfismo dos genes *Tc*PRAC concordaram com os genótipos de *T. cruzi*; Os genótipos híbridos (TcV e TcVI) apresentaram duas cópias da proteína (*Tc*PRACA e *Tc*PRACB) e os parentais (TcII e TcIII), apresentaram apenas uma cópia de *Tc*PRACA ou *Tc*PRACB, respectivamente. Os genótipos de *T. cruzi* TcI, Tcbat e TcIV apresentam genes *Tc*PRAC diferentes. Homólogos foram também encontrados em tripanossomas de cobra, crocodilo e anuro, sempre como cópia única por genoma haploide. De acordo com a análise *in silico*, muitos homólogos de *Try*PRAC podem expressar enzimas intracelulares. Contudo, *T. rangeli* possui apenas pseudogenes e *T. brucei* ssp., *T. evansi* e *T. congolense* perderam os genes PRAC. Análises filogenéticas e a alta conservação do loci PRAC suportam uma história evolutiva congruente com a filogenia de tripanossomas indicando que os genes PRAC são espécie e genótipo específicos.

Conclusões: Enzimas PRAC de *T. cruzi* e *T. vivax* são potenciais mitógenos de células B que retardam respostas imunes específicas através da proliferação não específica de células B, mascarando as respostas efetivas e permitindo a evasão do parasita das defesas dos hospedeiros. Essas enzimas têm sido relacionadas ao metabolismo e a progressão da doença. Neste estudo, além de estudar homólogos de PRAC dos patógenos *T. cruzi* e *T. vivax*, foram identificados homólogos de *Try*PRAC nos genomas de 11 espécies de tripanossomas de mamíferos, répteis (cobra e crocodilo) e anuro. Homólogos de *Try*PRAC foram identificados em ambas espécies, generalistas e que infectam humanos, e em espécies que mostram alta restrição ao hospedeiro vertebrado assim como patógenos e não patógenos, com diferentes ciclos de vida em hospedeiros vertebrados e vetores. *T. brucei* ssp., *T. evansi* e *T. congolense* foram as únicas espécies com genomas disponíveis que não apresentaram o gene PRAC. O entendimento da diversidade e história evolutiva de genes codificando enzimas PRAC em uma ampla variedade de espécies, distantes e estreitamente relacionadas, é muito útil na compreensão do papel das enzimas PRAC no vetor, nas interações do parasita com o hospedeiro vertebrado, na evasão das

defesas do hospedeiro e na evolução da virulência e patogenicidade dentro do gênero *Trypanosoma*.

Inferências filogenéticas utilizando homólogos *TryPRAC* foram congruentes com as relações reconhecidas dentro do gênero *Trypanosoma*, com genes compartilhando uma origem comum evoluindo para se tornar espécies e genótipos específicos. Devido à presença de um homólogo de PRAC em um tripanossoma de anuro, que é basal na filogenia do gênero, e a ausência de PRAC em outros tripanossomatídeos, bodonídeos e euglenídeos, somada à alta sentença do loci PRAC, nós sugerimos que o ancestral dos tripanossomas recebeu esse gene procariótico através de uma única transferência horizontal de uma bactéria. Nossa análise abrangente da família PRAC-like de procariotos e eucariotos revelou que os genes *TryPRAC* são proximamente relacionados às sequências PRAC de *Gemella* spp. (Firmicutes: Bacilli).

Nossas análises demonstraram que homólogos *TryPRAC* são ubíquos no gênero *Trypanosoma* e que a maior parte das espécies possuem uma única cópia por genoma haploide em um locus altamente sintênico. Polimorfismos de genes PRAC são importantes para genotipagem de *T. cruzi* e identificação de isolados híbridos. Todas as *TryPRACs* putativas encontradas podem ser expressas como racemases funcionais, excetuando *T. rangeli* em que encontra-se somente um pseudogene. Contudo, esses genes evoluíram em paralelo entre linhagens dentro destas espécies como demonstrado para as DTUs de *T. cruzi*. Os resultados revelaram pelo menos uma nova PRAC putativa homóloga para cada nova espécie de tripanossoma incluída neste estudo. Contudo, mais análises são necessárias para avaliar a expressão, atividade enzimática e algum envolvimento de novas enzimas *TryPRAC* putativas no ciclo de vida, estratégias de infecção e mecanismos de patogenicidade, virulência e evasão imune do hospedeiro de várias espécies de tripanossomas.

REFERÊNCIAS*

- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitology*. 2010b;26(7):324-8.
- Adams ER, Hamilton PB, Rodrigues AC, Malele, II, Delespaux V, Teixeira MM, Gibson W. New *Trypanosoma (Duttonella) vivax* genotypes from tsetse flies in East Africa. *Parasitology*. 2010a;137(4):641-50.
- Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;100(2):163-72.
- Añez N, Crisante G, da Silva FM, Rojas A, Carrasco H, Umezawa ES, Stolf AM, Ramírez JL, Teixeira MM. Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop Med Int Health*. 2004;9(12):1319-26.
- 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;136(7):783-92.
- Averis S, Thompson RC, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, Smith A. The diversity, distribution and host-parasite associations of trypanosomes in Western Australian wildlife. *Parasitology*. 2009;136(11):1269-79.
- Azambuja P, Ratcliffe NA, García ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*. 2005;77(3):397-404.
- Bacigalupo A, Segovia V, García A, Botto-Mahan C, Ortiz S, Solari A, Acuna-Retamar M, Torres-Pérez F, Cattán PE. Differential pattern of infection of sylvatic nymphs and domiciliary adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* genotypes in Chile. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(3):473-80.
- Baker JR. Bat trypanosome models for *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 1985;1(4):111-3.
- Baker JR, Liston AJ. *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii*: effect of various agents on attachment and entry to macrophages in vitro and on morphogenesis. *J Gen Microbiol*. 1978;104(1):79-89.

*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>

Baker JR, Green SM, Chaloner LA, Gaborak M. *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* of *Pipistrellus pipistrellus* (chiroptera): intra- and extracellular development in vitro. *Parasitology*. 1972;65(2):251-63.

Barnabé C, De Meeûs T, Noireau F, Bosseno MF, Monje EM, Renaud F, Brenière SF. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs): microsatellite loci and population genetics of DTUs TcV and TcI in Bolivia and Peru. *Infect Genet Evol*. 2011;11(7):1752-60.

Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol*. 2003;2(3):201-8

Batista CM, Kalb LC, Moreira CM, Batista GT, Eger I, Soares MJ. Identification and subcellular localization of TcHIP, a putative Golgi zDHHC palmitoyl transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2013;134(1):52-60.

Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MM, Camargo EP. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*. 2013;164(1):129-52.

Botero A, Thompson CK, Peacock CS, Clode PL, Nicholls PK, Wayne AF, Lymbery AJ, Thompson RC. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie (*Bettongia penicillata*). *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2013;2:77-89.

Botero A, Ortiz S, Muñoz S, Triana O, Solari A. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* of Colombia using minicircle hybridization tests. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(3):265-70.

Bower SM, Woo PT. Immunological comparison of four *Trypanosoma* spp. (subgenus *Schizotrypanum*) from bats. *Parasitology*. 1982;85(Pt1):111-4.

Bringaud F, Ghedin E, Blandin G, Bartholomeu DC, Caler E, Levin MJ, Baltz T, El-Sayed NM. Evolution of non-LTR retrotransposons in the trypanosomatid genomes: *Leishmania major* has lost the active elements. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;145(2):158-70.

Brisse S, Henriksson J, Barnabé C, Douzery EJ, Berkvens D, Serrano M, De Carvalho MR, Buck GA, Dujardin JC, Tibayrenc M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol*. 2003;2(3):173-83.

Broutin H, Tarrieu F, Tibayrenc M, Oury B, Barnabe C. Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2006;113(1):1-7.

Bryan MA, Norris KA. Genetic immunization converts the *Trypanosoma cruzi* B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen. *Infect Immun*.

2010;78(2):810-22.

Buschiazzo A, Goytia M, Schaeffer F, Degrave W, Shepard W, Gregoire C, Chamond N, Cosson A, Berneman A, Coatnoan N, Alzari PM, Minoprio P. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1705-10.

Calzada JE, Pineda V, Garisto JD, Samudio F, Santamaria AM, Saldaña A. Human trypanosomiasis in the eastern region of the Panama Province: new endemic areas for Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(4):580-2

Cavazzana M, Jr., Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MM. 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;40(3):345-55.

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

Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degrave WM, Minoprio P. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*. 2005;58(1):46-60.

Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, Degrave WM, Minoprio P. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15484-94

Charles RA, Kjos S, Ellis AE, Barnes JC, Yabsley MJ. Southern plains woodrats (*Neotoma micropus*) from southern Texas are important reservoirs of two genotypes of *Trypanosoma cruzi* and host of a putative novel *Trypanosoma* species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13(1):22-30.

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

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;16(3):315-27.

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

Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degrave W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(3):278-9.

D'Archivio S, Cosson A, Medina M, Lang T, Minoprio P, Goyard S. Non-invasive in vitro study of the *Trypanosoma vivax* infectious process consolidates the brain commitment in late infections. *Plos Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1976.

Deane LM, Deane MP, Lourenço-de-Oliveira R. Are Asian monkeys the original mammalian hosts of *Trypanosoma conorhini*? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986;81(1):127-9.

Deane MP, Deane LM. Studies on the life cycle of *Trypanosoma conorrhini*. "In vitro" development and multiplication of the bloodstream trypanosomes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1961;3:149-60.

de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, Chiari E, Junqueira AC, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SD. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathog*. 2006;2(3):e24.

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

Desquesnes M, Dargantes A, Lai DH, Lun ZR, Holzmüller P, Jittapalapong S. *Trypanosoma evansi* and *surra*: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *Biomed Res Int*. 2013;2013:321237.

Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM. More surprises from Kinetoplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):2579-81.

Enriquez GF, Cardinal MV, Orozco MM, Schijman AG, Gurtler RE. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Trop*. 2013b;126(3):211-7.

Enriquez GF, Cardinal MV, Orozco MM, Lanati L, Schijman AG, Gurtler RE. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*. 2013a;140(3):303-8.

Fermino BR, Viola LB, Paiva F, García HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CS, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MM. 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, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 1999;118(Pt2):161-6.

Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MM. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera)

sharing the same ecotopes in brazilian amazonia. *J Eukaryot Microbiol.* 2008;55(5):427-35.

Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MM. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology.* 2007;134(Pt11):1623-38.

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

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

Fraga J, Fernandez-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Trop Med Int Health.* 2014;19(2):195-206.

Franzen O, Talavera-Lopez C, Ochaya S, Butler CE, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Marinkelle CJ, Tyler KM, Miles MA, Andersson B. Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC Genomics.* 2012;13:531.

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

García Pérez HA. Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia de tripanossomas de ungulados. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

García HA, Rodrigues AC, Martinkovic F, Minervino AH, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Hamilton PB, Teixeira MM. 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.* 2011b;41(13-14):1385-96.

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

Gardner RA, Molyneux DH. *Trypanosoma (Megatrypanum) incertum* from *Pipistrellus pipistrellus*: development and transmission by cimicid bugs. *Parasitology.* 1988;96(Pt 3):433-47.

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

Gibson W, Stevens J. Genetic exchange in the trypanosomatidae. *Adv Parasitol*. 1999;43:1-46.

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

Gomez-Hernandez C, Rezende-Oliveira K, Nascentes GA, Batista LR, Kappel HB, Martinez-Ibarra JA, Trujillo Contreras F, Lages-Silva E, Ramírez LE. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(6):684-90.

Goytia M, Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Hermant D, Berneman A, Minoprio P. Molecular and structural discrimination of proline racemase and hydroxyproline-2-epimerase from nosocomial and bacterial pathogens. *Plos One*. 2007;2(9):e885.

Grisard EC, Sturm NR, Campbell DA. A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterreensis* sp. n., isolated from South American bats. *Parasitology*. 2003;127(Pt 3):265-71.

Guhl F, Ramírez JD. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2013;20:148-54.

Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol*. 2001;31(5-6):443-52.

Gupta SK, Kolet L, Doniger T, Biswas VK, Unger R, Tzfati Y, Michaeli S. The *Trypanosoma brucei* telomerase RNA (TER) homologue binds core proteins of the C/D snoRNA family. *FEBS Lett*. 2013;587(9):1399-404.

Hamilton PB. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? *Trends Parasitol*. 2012b;28(5):173.

Hamilton PB, Teixeira MM, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol*. 2012a;28(4):136-41.

Hamilton PB, Stevens JR. Resolving relationships between Australian trypanosomes using DNA barcoding data. *Trends Parasitol*. 2011;27(3):99

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

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

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;14(10):3167-75.

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

Hamilton PB, Stevens JR, 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;34(12):1393-404.

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

Hatama S, Shibahara T, Suzuki M, Kadota K, Uchida I, Kanno T. Isolation of a *Megatrypanum* trypanosome from sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) in Japan. *Vet Parasitol*. 2007;149(1-2):56-64.

Hayes PM, Lawton SP, Smit NJ, Gibson WC, Davies AJ. Morphological and molecular characterization of a marine fish trypanosome from South Africa, including its development in a leech vector. *Parasit Vectors*. 2014;7:50.

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;41(2):207-12.

Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, Bargues MD. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res*. 2009;2009:1-9.

Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourao GM, Jansen AM. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(11):1133-9.

Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. A zoological monograph Part 2 Systematic Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972:500

Hoare, C. A. Studies on *Trypanosoma grayi* III. Life cycle in the tse-tse fly and in the crocodile. *Parasitology*, London. 1931;23(4):449-84.

Hoare C.A. Studies on *Trypanosoma grayi*. 2. Experimental transmission on the crocodile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London. 1929;23(1):39-55.

Horn D. Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 2014;(22):1-7

Huson, DH; D. Bryant (2006). "Application of Phylogenetic Networks in

Evolutionary Studies". Mol. Biol. Evol. 23 (2): 254–267.

Hypsa V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego RO, Galvao C, Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. Mol Phylogenet Evol. 2002;23(3):447-57.

Jakes KA, O'Donoghue PJ, Adlard RD. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. Parasitology. 2001;123(Pt 5):483-7.

Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, do Carmo JB, Dutra-Menezes MC, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Cseko YM, Borges MB, Moreira N. Biological cycle of *Phytomonas*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83 Suppl 1:601-10.

Keeling PJ. Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. Curr Opin Genet Dev. 2009;19(6):613-9.

Kollien AH, Grospietsch T, Kleffmann T, Zerbst-Boroffka I, Schaub GA. Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. J Insect Physiol. 2001;47(7):739-47.

Lainson R. *Trypanosoma cecili* n. sp., a parasite of the South American cayman *Caiman crocodilus crocodilus* (Linnaeus, 1758) (Crocodylia: Alligatoridae). In: Canning EU. Protozoology. Berkhamstead: Clunbury Cottrell Press; 1977. v. 3. p. 87-93.

Lamour N, Riviere L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP, Bringaud F. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. J Biol Chem. 2005;280(12):11902-10.

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

Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(6):1041-9.

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

Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Teixeira MM. 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. 2012b;163(6):856-72.

Lima L, Ortiz PA, da Silva FM, Alves JM, Serrano MG, Cortez AP, Alfieri SC, Buck GA, Teixeira MM. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. Plos One. 2012a;7(6):e38385.

Lima VS, Jansen AM, Messenger LA, Miles MA, Llewellyn MS. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. Parasit Vectors. 2014;7(1):263

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

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

Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. Exp Parasitol. 2007;116(2):150-5.

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

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

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

Lukes J, Skalicky T, Tyc J, Votýpka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. Mol Biochem Parasitol. 2014;1-8

Lukes J, Hashimi H, Zikova A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. Curr Genet. 2005;48(5):277-99.

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

MacArthur AE, Archibald AR. Effect of culture pH on the D-alanine ester content of lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1984;160(2):792-3.

Madeira MF, Almeida AB, Barros JH, Oliveira TS, Sousa VR, Alves AS, Miranda LF, Schubach AO, Marzochi MC. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. J Parasitol. 2014;100(2):231-4.

Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, CC DEP, Faissal BN, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MC. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*. 2009;136(4):411-23.

Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *Plos One*. 2009;4(2):e4534.

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

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

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

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

Maia da Silva FM, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Anez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MM. 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;129(Pt 5):549-61.

Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, Coura JR, Takeda GF, Shaw JJ, Teixeira MM. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*. 2004a;128(Pt 3):283-94.

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

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MM. 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*. 2009b;136(6):641-55.

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

Marinkelle CJ. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. *Rev Biol Trop*. 1982a;30(2):107-11.

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

Marinkelle CJ. *Trypanosoma (Herpetosoma) longiflagellum* sp.n. from the tomb rat, *Taphozous nudiventris*, from Iraq. *J Wildl Dis*. 1977;13(3):262-4.

Martínez-Tovar JG, Rebollar-Téllez EA, Fernández Salas I. Seroprevalence of *T. cruzi* infection in blood donors and Chagas cardiomyopathy in patients from the coal mining region of Coahuila, Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(2):169-74.

Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun*. 2009;77(7):3023-32.

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

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

Mattos EC, Tonelli RR, Colli W, Alves MJ. The Gp85 surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem*. 2014;74:151-80.

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;138(1):59-70.

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

Michaeli S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol*. 2011;6(4):459-74.

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009;136(12):1509-28.

Miles MA, Arias JR, Valente SA, Naiff RD, de Souza AA, Pova MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(6):1251-9.

Mkwananzi JB, Franks D, Baker JR. Cytotoxicity of antibody-coated trypanosomes by normal human lymphoid cells. *Nature*. 1976;259(5542):403-4.

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

Molina-Garza ZJ, Rosales-Encina JL, Mercado-Hernández R, Molina-Garza DP, Gomez-Flores R, Galaviz-Silva L. Association of *Trypanosoma cruzi* infection with risk factors and electrocardiographic abnormalities in northeast Mexico. *BMC Infect Dis*. 2014;14:117.

Molyneux DH. Trypanosomes of bats. In JP Kreier, JR Baker (eds), *Parasitic Protozoa*, 2nd ed, vol 1, Academic Press, San Diego. 1991. p. 195-223

Molyneux DH, Stiles JK. Trypanosomatid-vector interactions. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1991;71 Suppl 1:151-66.

Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruendling AP, dos Reis D, Gomes ML, de Araujo SM, Bahia MT, Magalhaes LK, de Oliveira Guerra JA, Silveira H, Toledo MJ, Vale Barbosa M. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *Plos Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2069.

Monteiro WM, Magalhaes LK, de Sa AR, Gomes ML, Toledo MJ, Borges L, Pires I, Guerra JA, Silveira H, Barbosa M. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *Plos One*. 2012;7(7):e41284.

Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol*. 2003;12(4):997-1006.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(4):460-5.

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

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

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

Ocana-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in southern Ecuador. *Plos Negl Trop Dis*. 2010;4(12):e915.

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

Opperdoes FR, Michels PA. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. *Trends Parasitol*. 2007;23(10):470-6.

Orozco MM, Enriquez GF, Alvarado-Otegui JA, Cardinal MV, Schijman AG, Kitron U, Gurtler RE. New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(5):872-82.

Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, Alfieri SC, Teixeira MM. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Trop*. 2009;112(3):249-59.

Paparini A, Irwin PJ, Warren K, McInnes LM, de Tores P, Ryan UM. Identification of novel trypanosome genotypes in native Australian marsupials. *Vet Parasitol*. 2011;183(1-2):21-30.

Peacock L, Cook S, Ferris V, Bailey M, Gibson W. The life cycle of *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* in the tsetse fly. *Parasit Vectors*. 2012;5:109.

Pérez E, Monje M, Chang B, Buitrago R, Parrado R, Barnabe C, Noireau F, Breniere SF. Predominance of hybrid discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in domestic Triatoma infestans from the Bolivian Gran Chaco region. *Infect Genet Evol*. 2013;13:116-23.

Petry K, Baltz T, Schottelius J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* and *T. vespertilionis* by monoclonal antibodies. *Acta Trop*. 1986;43(1):5-13.

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;155(3):305-10.

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

Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units. *Plos One.* 2014;9(3):e91154.

Ragone PG, Pérez Brandan C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Tomasini N, Cimino RO, Romero NM, Portelli M, Nasser JR, Basombrio MA, Diosque P. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. *Acta trop.* 2012;123(3):196-201.

Ramírez JD, Tapia-Calle G, Guhl F. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Colombia revealed by a High-throughput Nuclear Multilocus Sequence Typing (nMLST) approach. *BMC Genet.* 2013;14:96.

Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunuba ZM, Guhl F. Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infect Genet Evol.* 2012;12(8):1743-50.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A, Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000;6(8):890-7

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

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

Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell Biochem.* 2014;74:1-42.

Roellig DM, Savage MY, Fujita AW, Barnabe C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ. Genetic variation and exchange in *Trypanosoma cruzi* isolates from the United States. *Plos One.* 2013;8(2):e56198.

Rocha FL, Roque AL, de Lima JS, Cheida CC, Lemos FG, de Azevedo FC, Arrais RC, Bilac D, Herrera HM, Mourao G, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* infection in

neotropical wild carnivores (Mammalia: Carnivora): at the top of the *T. cruzi* transmission chain. Plos One. 2013;8(7):e67463.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference undermixed models. Bioinformatics. 2003 Aug 12;19(12):1572-4.

Roque AL, Xavier SC, Gerhardt M, Silva MF, Lima VS, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Para State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. Vet Parasitol. 2013;193(1-3):71-7.

Salazar-Antón F, Urrea DA, Guhl F, Arévalo C, Azofeifa G, Urbina A, Blandón-Naranjo M, Sousa OE, Zeledón R, Vallejo GA. *Trypanosoma rangeli* genotypes association with *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens* allopatric distribution in Central America. Infect Genet Evol. 2009;9(6):1306-10.

Santana RA, Magalhaes LK, Prestes SR, Maciel MG, da Silva GA, Monteiro WM, de Brito FR, de Aguiar Raposo Camara Coelho LI, Barbosa-Ferreira JM, Guerra JA, Silveira H, das Gracias Vale Barbosa M. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. Parasit Vectors. 2014;7(1):267.

Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, Stich RW, Jittapalapong S. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (*Herpetosoma*) infection in a sick infant from Thailand. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 8):1118-21.

Saye M, Miranda MR, di Girolamo F, de los Milagros Camara M, Pereira CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. Plos One. 2014;9(3):e92028.

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

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

Spera JM, Herrmann CK, Roset MS, Comerci DJ, Ugalde JE. A *Brucella* virulence factor targets macrophages to trigger B-cell proliferation. Biol Chem. 2013;288(28):20208-16.

Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 2006;22:2688-90.

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

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;84(3):601-7.

- Stevens JR. Free-living bodonids and derived parasitic trypanosomatids: but what lies in between? *Trends Parasitol.* 2014;30(3):113-4.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite.* 2008;15(3):226-32.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 2001;1(2):143-50.
- Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today.* 1999c;15(11):432-7.
- Stevens JR, Teixeira MM, Bingle LE, Gibson WC. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Int J Parasitol.* 1999b;29(5):749-57.
- Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology.* 1999a;118(Pt 1):107-16.
- Stevens J, Noyes H, Gibson W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(5):669-76.
- Svobodová M, Zidkova L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(Pt 2):423-32.
- Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony: and other methods. version 4. Sunderland MA: Sinauer Associates; 2002.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist.* 2011;162(3):503-24.
- Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demetree E, Seveno M, Barnabe C, Ayala FJ, Tibayrenc M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(47):20411-6.
- Thekisoe OM, Rodriguez CV, Rivas F, Coronel-Servian AM, Fukumoto S, Sugimoto C, Kawazu S, Inoue N. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(5):855-60.
- Thompson RJ, Bouwer HG, Portnoy DA, Frankel FR. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. *Infect Immun.* 1998;66(8):3552-61.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997Dec 15;25(24):4876-82.

Thorne KJ, Glauert AM, Svvennsen RJ, Thomas H, Morris J, Franks D. Evasion of the oxidative microbicidal activity of human monocytes by trypomastigotes of *Trypanosoma dionisii*. *Parasitology.* 1981;83(Pt 1):115-23.

Thorne KJ, Glauert AM, Svvennsen RJ, Franks D. Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionisii* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. *Parasitology.* 1979;79(3):367-79.

Tibayrenc M, Ayala FJ. How clonal are *Trypanosoma* and *Leishmania*? *Trends Parasitol.* 2013;29(6):264-9.

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 2002;18(9):405-410.

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

Truc P, Tiouchichine ML, Cuny G, Vatunga G, Josenando T, Simo G, Herder S. Multiple infections of *Trypanosoma brucei gambiense* in blood and cerebrospinal fluid of human African trypanosomosis patients from Angola: consequences on clinical course and treatment outcome. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):399-402.

Urrea DA, Guhl F, Herrera CP, Falla A, Carranza JC, Cuba-Cuba C, Triana-Chavez O, Grisard EC, Vallejo GA. Sequence analysis of the spliced-leader intergenic region (SL-IR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis*, *R. colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* suggests a degree of co-evolution between parasites and vectors. *Acta Trop.* 2011;120(1-2):59-66.

Valente SA, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa Cesar M, dos Santos MP, Miranda CO, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(3):291-7.

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

Ventura RM, Takeda GF, Silva RA, Nunes VL, Buck GA, Teixeira MM. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *Int J Parasitol.* 2002;32(1):53-63.

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;99(1):37-48

Vickerman K, Whitt L, and D. A. Evans (eds.). *The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates*. In *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press New York. 1976:1-34.

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

Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, Rodrigues AC, Paiva F, Camargo EP, Teixeira MM. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rDNA and gGAPDH genes. *Parasitology*. 2009a;136(1):55-65.

Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, Duarte MR, Grego KF, Barrett TV, Camargo EP, Teixeira MM. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. *Parasitology*. 2008;135(5):595-605.

Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients. *Acta tropica*. 2006;100(3):252-5.

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

Votýpka J, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, Yurchenko V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*. 2013;164(6):763-81.

Votýpka J, Szabová J, Rádrová J, Zídková L, Svobodová M. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62(Pt 3):745-54.

Votýpka J, Svobodová M. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitol Res*. 2004;92(2):147-51.

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

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

Whitelaw DD, Gardiner PR, Murray M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. *Parasitology*. 1988;97(Pt1):51-61.

Xavier SC, Roque AL, Lima Vdos S, Monteiro KJ, Otaviano JC, Ferreira da Silva LF, Jansen AM. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *Plos Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1647.

Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *Plos Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1049.

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

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

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):240-53.

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

Zingales B, 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.

Zumaya-Estrada FA, Messenger LA, Lopez-Ordóñez T, Lewis MD, Flores-Lopez CA, Martínez-Ibarra AJ, Pennington PM, Cordon-Rosales C, Carrasco HV, Segovia M, Miles MA, Llewellyn MS. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. *Parasit Vectors*. 2012;5:226.

The evolution and phylogenetic relationships of proline racemase genes acquired through a single and ancient horizontal gene transfer from bacterium by a common *Trypanosoma* ancestor

Caballero ZE^a; Costa-Martins AG^a; Ferreira RC^a; Alves, JMP^a; Serrano MG^b; Buck GA^b; Camargo EP^a; Minoprio P^c & Teixeira MMG^{a*}

ABSTRACT

Background: Trypanosomes are highly divergent in their host ranges, life cycles and pathogenicity. Most species live in the bloodstream, while a few also develop in intracellular sites (e.g., *T. cruzi*, the agent of Chagas disease) or extra-vascular compartments (e.g., *T. vivax*, the agent of livestock trypanosomosis). Proline racemases (PRACs) of *T. cruzi* (TcPRAC) and *T. vivax* (TvPRAC) were implicated in metabolism and in the evasion of host defenses. Along their evolutionary history, trypanosomes have relied on various strategies to infect and obtain energy from vectors and vertebrate hosts and evade host defenses, which are crucial mechanisms in trypanosome-host adaptation. The bacterial origin and their absence in *T. brucei* and *T. congolense* have raised many questions about the acquisition and evolution of PRAC genes and their roles in the evolution of *Trypanosoma* species.

Methods: Aiming an inventory of PRAC genes of trypanosomes (TryPRAC) we searched for homologs of TcPRAC in the genomes of 13 trypanosome species, trypanosomatids of 8 other genera, two bodonids and three euglenids. We also searched for TcPRAC homologs in other eukaryote and prokaryote genomes. All genes were analyzed using molecular, phylogenetic and syntenic approaches.

Results: We identified PRAC genes in *T. cruzi* of genotypes TcI-TcVI and Tcbat, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* and *T. erneyi*, which are highly phylogenetically related, and in *T. rangeli*, *T. conorhini* and *T. lewisi*. Polymorphisms in TcPRAC genes matched *T. cruzi* genotypes: the hybrids (TcV and TcVI) contain two copies (TcPRACA and TcPRACB), and their parental genotypes, TcII and TcIII, each contain one copy of a TcPRACA gene and TcPRACB, respectively. The *T. cruzi* genotypes TcI, Tcbat and TcIV each presented a different TcPRAC gene. Homologs were also found in trypanosomes from snakes, crocodiles and anurans, always as a single copy gene per haploid genome. According to *in silico* analysis, most TryPRAC homologs can express intracellular enzymes, while *T. rangeli* possess only pseudogenes and *T. brucei* ssp., *T. evansi* and *T. congolense* have lost their PRAC genes. Phylogenetic inferences and high synteny support an evolutionary history congruent with the *Trypanosoma* phylogeny indicating that PRAC genes are species- and genotype-specifics.

Conclusions: We demonstrated that TryPRAC homologs are ubiquitous in the genus *Trypanosoma*. Their presence in an anuran trypanosome, but not in trypanosomatids of other genera or in bodonids and euglenid, and their relationships with prokaryotic PRAC homologs suggest that one common ancestor of *Trypanosoma* gained this gene through a single, ancient horizontal gene transfer from a bacterium (related to the genus *Bacillus*, phylum Firmicutes). The data provided here are useful for evaluating the roles of PRAC enzymes in the life cycles, infection strategies, and mechanisms of pathogenicity, virulence and host immune evasion of the various trypanosome species.

Keywords: proline racemase, *Trypanosoma*, *Trypanosoma cruzi*, horizontal gene transfer, kinetoplastid evolution, phylogeny, synteny, genotyping, genealogy.

Introduction

The kinetoplastids (Euglenozoa: Kinetoplastea) comprise the bodonids, which include free-living and parasitic species in aquatic environments, and their descendants, the obligate parasitic trypanosomatids, including the parasites of insects and plants as well as *Trypanosoma* and *Leishmania*, which alternate between invertebrate and vertebrate hosts (Moreira et al., 2004; Simpson et al., 2006; Maslov et al., 2013). The trypanosomes are parasites of all animal classes highly divergent in their host ranges; some species have specific vertebrate hosts, while others are able to infect hosts of diverse orders, with no cross-infections among hosts of distinct animal classes (Hoare, 1972; Hamilton et al., 2007). Most trypanosomes develop exclusively in the bloodstream, but a few species can also live in extra-vascular and intracellular compartments. In their vectors, namely, arthropods and leeches, trypanosomes develop only in the gut or in the gut and salivary glands (Hoare, 1972).

Morphological and functional diversification has given rise to trypanosomatid species differing in life cycles, vertebrate hosts, and vectors. Parasite adaptations to variable and complex host environments rely on various physiological adaptations and the ability to evade the host defenses, which has not been characterized for most species. The characterization of molecules essential to metabolism and host interactions is fundamental to understanding the diverse evolutionary strategies used by trypanosomes to infect and survive within a wide range of vertebrate and invertebrate hosts, as well as the emergence of pathogenicity.

Polyclonal lymphocyte-B activation is one of the major immunological disorders observed during microbial infections, and it is among the main strategies used by *Trypanosoma cruzi* to evade the host specific immune response, ensuring its survival in vertebrate hosts (Minoprio, 2001). This process is triggered by proline racemase (PRAC) enzymes released by *T. cruzi*, which increase the metacyclogenesis and virulence of the parasite and induce immunosuppression, favoring parasite immune evasion. Immunological and biochemical studies have demonstrated that both *TcPRAC* (*T. cruzi*) and *TvPRAC* (*T. vivax*) exhibit racemase activity and are B-cell mitogens, inducing polyclonal activation, which results in non-specific immune responses to parasite antigens

concomitant with increasing parasitemia early on *T. cruzi* infection (Reina-San-Martin et al., 2000; Chamond et al., 2005, 2009; Buschiazzi et al., 2006).

Amino-acid racemases are enzymes that catalyze the interconversion of free L-amino acids and D-amino acids associated with the synthesis of bacterial cell layers that provide protection against proteolytic effectors and host immune defenses (Thompson et al. 1998). The first PRAC enzyme was isolated from *Clostridium sticklandii* in 1968 (Cardinale and Abeles, 1968). The first eukaryotic PRAC was reported in 2000 in *T. cruzi*, and in 2009, a PRAC was reported in *T. vivax* (Reina-San-Martin et al. 2000; Chamond et al. 2009).

It is now recognized that a PRAC-like gene family is widely distributed through prokaryotes but scarce in eukaryotes, which acquired PRAC-like genes by horizontal gene transfer (HGT) from prokaryotes (Fitzpatrick et al., 2008; Visser et al., 2012). HGT has been an important evolutionary force in adaptation of trypanosomatids to parasitism and to specialized niches and has contributed to metabolic pathways and mechanisms of virulence and pathogenesis (Opperdoes and Michels, 2007; Kelling and Palmer, 2008; Alves et al., 2013).

The search for PRAC genes in the genome of *T. cruzi* CL-Brener strain revealed two genes encoding two enzyme isoforms essential for viability and differentially expressed during parasite development: *TcPRACA* (secreted by metacyclic and bloodstream trypomastigotes) and *TcPRACB* (an intracellular protein of epimastigotes). The two enzymes share 96% amino-acid identity but differ in kinetic properties relevant to catalytic activity and in a signal peptide present in *TcPRACA* (Chamond et al., 2003, 2005). Evidence provided by inhibitors of *TcPRAC* established its suitability as a target for chemotherapy against Chagas disease (Coutinho et al., 2009; Conti et al., 2011; Beuerman et al., 2013).

TcPRAC enzymes contribute to delays in the effective host immune response by non-specifically activating B lymphocytes, thus allowing immune evasion and parasite persistence. *TcPRAC* also activates the production of IL-10, a cytokine known to enhance host susceptibility to *T. cruzi* thus enhancing parasite virulence (Reina-San-Martin et al. 2000; Chamond et al., 2003, 2005; Bryan and Norris, 2010). Treatment of macrophages with recombinant *TcPRAC* induces the

secretion of a soluble factor that promotes B-cell proliferation (Spera et al., 2013). The over-expression of *TcPRAC* genes increased the differentiation of non-infective epimastigotes into infective metacyclic trypomastigotes, suggesting that the enzyme may regulate intracellular metabolic pathways of L-proline internalized from the vector gut. L-proline uptake, which is mediated by transport systems, is one major source of energy for *T. cruzi*. It also provides energy for host-cell invasion by metacyclic forms and improved parasite protection against oxidative stress (Magdaleno et al., 2009; Martins et al., 2009; Sayé et al., 2014). The inhibition of *TcPRAC* significantly reduced *T. cruzi* invasion of cells and intracellular differentiation of parasites (Chamond et al., 2003, 2005). *TcPRACs* may also participate in the addition of D-amino acid to proteins or peptides generating less immunogenic parasites and providing resistance against host proteolytic mechanisms, similarly to the bacterial walls (Reina-San-Martin et al. 2000; Coatnoan et al., 2009).

T. vivax multiplies extracellularly in the bloodstream, tissue spaces and SNC (Batista et al., 2013; D'Archivio et al., 2013). Because *TvPRAC* display mitogenic activity to B-cells despite the lack of a signal peptide for secretion, it was suggested that *TvPRAC* can be secreted through the parasite flagellar pocket and/or released with the death of parasites (Chamond et al., 2009).

Throughout their evolutionary history, trypanosomes have relied on various strategies to infect their hosts, obtain energy from available sources in vectors and vertebrate hosts, develop virulence factors, and evade host defenses. PRAC enzymes have been implicated in all of these processes. The discovery of PRAC homologs of bacterial origin in *T. cruzi* and *T. vivax*, which are separated by a large phylogenetic distance, and the absence of homologs in the genomes of *T. brucei* and *T. congolense*, which together with *T. vivax* form the clade *T. brucei*, as well as in *Leishmania* spp. genomes (Chamond et al., 2003, 2009), suggest that PRAC genes have a complex evolutionary history in trypanosomatids. To form a better understanding of bacteria donors, the number and timing of transfer events, and the evolution of PRAC genes, we a) searched for *TcPRAC* homologs in trypanosomes of mammals (*T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. rangeli*, *T. conorhini* and *T. lewisi*), snakes,

crocodiles, anurans, and other genera, and in bodonids and euglenids; b) characterized *TcPRAC* genes of *T. cruzi* isolates representing the whole range of intra-specific diversity (*Tcl-TcVI* and *Tcbat*); c) analyzed the phylogenetic relationships among PRAC homologs through phylogenetic trees, network genealogies and synteny analysis; and d) generated hypotheses about the evolutionary history of PRAC homologs, taking in account their prokaryotic origin, wide relationships with procariotic and eukaryotic PRAC-like family, and the phylogeny of genus *Trypanosoma* at species and genotype levels.

2. Methods

2.1. Trypanosome genomes used for searches of *TcPRAC* homologous genes

Searches for PRAC gene orthologs were performed against genome drafts and the annotated trypanosome genomes in TriTrypDB by BLAST, using as queries the previously described sequences of *T. cruzi* PRACs (Chamond et al., 2003).). The draft genomes of the following trypanosomes were used in this study: *T. cruzi* (G and TCC1994) *T. cruzi marinkellei* (TCC344), *T. dionisii* (TCC211), *T. erneyi* (TCC1946), *T. rangeli* (AM80), *T. lewisi* (TCC34), *T. conorhini* (TCC025E), *T. theileri* (TCC165), *T. serpensis* (TCC1052), *Trypanosoma* sp. from anuran (TCC339), *C. acanthocephali* (TCC037E), *Leptomonas costaricensis* (TCC169E), *E. schaudinni* (TCC224), *A. desouzai* (TCC079E), *A. deanei* (TCC036E), *S. culicis* (TCC012E), *S. oncopelti* (TCC290E), *H. muscarum* (TCC001E), *Phytomonas* sp. (Jma). The trypanosomatids are cryopreserved at Trypanosomatid Culture Collection of the University of São Paulo (TCC-USP). The draft genomes were sequenced using standard pyrosequencing shotgun methodology according to Roche 454 protocols and resulting reads were assembled by Roche's Newbler software (version 2.3) as previously described (Alves et al., 2012, 2013). Besides the genomes from trypanosomes species, PRAC genes were searched draft genomes of two bodonids (*Bodo* sp. and *Parabodo caudatus*) and three euglenids (*Euglena gracilis*, *Eutrepia viridis*, *Discoplastis spathirhyncha*) The genomes were obtained within the ATOL (Assemble of tree of Life), phylum Euglenozoa, incentive sponsored by the National Science Foundation.

2.2. PCR Amplification of PRAC gene sequences from *T. cruzi* and *T. rangeli* isolates

PCR amplification of the partial *TcPRAC* coding sequence (1015 bp comprising all essential motifs and residues, but not the region including the signal peptide of *TcPRACA* of *T. cruzi* CL Brener) was conducted under the conditions previously described by Reina-San-Martin *et al.* (2000) with the following primers: PRAC1, 5'-CTCTCCCATGGGGCAGGAAAAGCTTCTG -3' and PRAC2, 5'-CTGAGCTCGACCAGATCTATCTGC -3'. The PCR products were cloned into the pCR II-TOPO vector (Invitrogen), and 5 clones from each species/isolate were sequenced. Ten clones were sequenced from each of the hybrid isolates of *T. cruzi*. The resulting sequences were submitted to GenBank under the access numbers listed in Table 1.

2.3. Alignments, essential motifs and residues and phylogenetic analyses of PRAC sequences.

Predicted amino-acid sequences from all PRAC genes identified in the trypanosome genomes were evaluated regarding motifs essential for racemase activity to identify putative homologous genes encoding PRAC enzymes, thus ensuring the selection of genes encoding racemases and excluding closely related PRAC-like genes such as epimerases. Because previous studies on *T. cruzi* PRAC enzymes and bacterial PRACs demonstrated that catalytic cysteines (Cys130 and Cys300), active sites (SPCGT) and essential motifs (MCGH and MIII) are not sufficiently stringent to discriminate between hydroxyproline-2 epimerases (HyPREs) and racemase enzymes, as both possess the two catalytic cysteines; the residues R1, R2 and R3, which are involved in substrate specificity, were used to distinguish between PRAC from HyPRE enzymes *in silico* (Goytia *et al.*, 2007; Chamond *et al.*, 2009). These features were examined to confirm the existence of genes encoding putative homologous PRAC enzymes in most trypanosome genomes.

Amino-acid and nucleotide sequences of whole *TcPRAC*-homologous genes (1200 bp) from the various trypanosome species were obtained from genome-data banks, aligned using Clustal X v2.0 (Larkin *et al.*, 2007) and manually adjusted. In addition, sequences of partial PRAC genes obtained by sequencing PCR-amplified gene segments or from data banks were aligned to conduct intra-specific analyses of *TcPRAC* sequences from

isolates of *T. cruzi* assigned to all DTUs (TcI-TcVI and Tcbat) and *T. c. marinkellei*. Similarly, an alignment was created exclusively with PRAC sequences from *T. rangeli* isolates representing the 5 phylogenetic lineages (A-E). The Genbank access numbers of PRAC sequences determined in this study are listed in Table 1.

Maximum-likelihood and maximum-parsimony analysis were performed respectively with RAXML v7.2.8 (Stamatakis, 2006) and PAUP* v4 (Swofford, 2003) using nucleotide sequences and the predicted amino-acid sequences from the full *TcPRAC* gene. Network genealogy was inferred using the neighbor-net method (Bryant and Moulton, 2003) with Kimura's 2-parameter model implemented in SplitsTree4 V4.10 (Huson and Bryant, 2006). Internode support was estimated by performing 100 bootstrap replicates using the same parameters optimized for network inferences.

2.4. Horizontal-gene-transfer analysis

The horizontal-gene-transfer (HGT) analysis includes a comprehensive dataset of 2,530 PRAC-like protein sequences from prokaryotes and eukaryotes in the nonredundant database (NR; <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/> as of April, 2014). A BLASTp search was performed with a maximum-expected-value threshold of 1e-20, using the *TcPRACA* and *TcPRACB* sequences as queries. The retrieved sequences were checked for PRAC-like domains using the Batch search tool in the Conserved Domain Database

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)

. Multiple-sequence alignment was performed using MUSCLE v3.8 (Edgar, 2009) and edited using Gblocks v0.91b (Castresana, 2000) to eliminate poorly aligned positions. Maximum-likelihood analyses were carried out using the WAG substitution model, gamma-distributed heterogeneity rate categories (PROTGAMMAWAG), as implemented in RAXML v7.2.8 (Stamatakis, 2006). The phylogenetic tree was visualized using Dendroscope v3.2.4 (Huson and Scornavacca, 2012). The access numbers of the 314 PRAC-like sequences from NR that were most similar to *TcPRAC* included in the HGT analysis (including racemases and epimerases) are listed in Table S1.

Table 1. Trypanosome species and their respective sequences encoding for TryPRAC and homologous genes determined in this study or retrieved from data banks

TCC code/SAG	Trypanosome isolate	Host species	Geographic origin	DTU/ genotype	Origin of sequences
<i>Trypanosoma cruzi</i>					
1321	DM28	<i>Didelphis marsupialis</i>	Colombia	TcI	PCR
	Sylvio X10.6	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcI	GeneBank
	JR cl4	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	TcI	Genomic draft
30	G	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brazil	TcI	PCR
1325	FC1	<i>Homo sapiens</i>	Panama	TcI	PCR
1324	MM1	<i>Homo sapiens</i>	Panama	TcI	PCR
1832		<i>Lutra longicaudis</i>	Panama	TcI	PCR
1834		<i>Saguinus geoffroyi</i>	Panama	TcI	PCR
1837		<i>Triatoma dimidiata</i>	Panama	TcI	PCR
1840		<i>Rhodnius pallescens</i>	Panama	TcI	PCR
1841		<i>Rhodnius pallescens</i>	Panama	TcI	PCR
	Nay	<i>Triatoma peri</i>	Mexico	TcI	PCR
	Camp9	<i>Triatoma peri</i>	Mexico	TcI	PCR
	D1	<i>Didelphis marsupialis</i>	Colombia	TcI	PCR
	588	<i>Homo sapiens</i>	Guatemala	TcI	PCR
1474	Tc297	<i>Cavia sp.</i>	Peru	TcI	PCR
1478	Tc293	<i>Cavia sp.</i>	Peru	TcI	PCR
	TC3	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	TcI	PCR
	TC11	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	TcI	PCR
	TC23	<i>Homo sapiens</i>	Venezuela	TcI	PCR
	536	<i>Rattus rattus</i>	Venezuela	TcI	PCR
1401	RP01	<i>Rhodnius prolixus</i>	Venezuela	TcI	PCR
1338		<i>Carollia perspicillata</i>	Venezuela	TcI	PCR
TC36		<i>Didelphis marsupialis</i>	Venezuela	TcI	PCR
183	183	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivia	TcI	PCR
1990	ATCC30823	<i>Canis familiaris</i>	USA	TcI	PCR
1989	ATCC30160	<i>Homo sapiens</i>	USA	TcI	PCR
1471	XE: 5292 3246	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcI	PCR
593	<i>T. cruzi</i> 593	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	TcI	PCR
34	Y	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcII	PCR
139	T.c IB42X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brazil	TcII	PCR
	1508	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcII	PCR
	EP23X	<i>Didelphis marsupialis</i>	Brazil	TcII	PCR
2120	Esmeraldo cl3	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcII	PCR
873	573 LU	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcIII	PCR
845	MT3663	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Brazil	TcIII	PCR
844	MT3869	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcIII	PCR
863	T.c 863	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Brazil	TcIII	PCR
132	T.c IB74P	<i>Philander frenatus</i>	Brazil	TcIII	PCR
1323	Suinca	<i>Canis familiaris</i>	Brazil	TcIII	PCR
1078	T.c QJIII	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brazil	TcIII	PCR
1831	T.c	<i>Tamandua mexicana</i>	Panama	TcIII	PCR
1836	T.c	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Panama	TcIII	PCR
1437	B6338/4	<i>Proechimys longicaudatus</i>	Brazil	TcIII	PCR
1356	B6056	<i>Oxymycterus sp.</i>	Brazil	TcIII	PCR
135	IB14X	<i>Proechimys iheringi</i>	Brazil	TcIII	PCR
864	Tc864	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Brazil	TcIII	PCR
1386	Unidero	<i>Canis familiaris</i>	Brazil	TcIII	PCR
1080	T.cruzi QMII	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brazil	TcIII	PCR
1078	QJIII	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brazil	TcIII	PCR
1079	QMI	<i>Triatoma rubrovaria</i>	Brazil	TcIII	PCR
	Arma13 cl1	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Paraguay	TcIII	PCR
	Arma18 cl3	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Paraguay	TcIII	PCR
	M6241 cl6	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcIII	Genomic draft
2124	CAN III	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcIV	PCR
85	JJ (José Julio)	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	TcIV	PCR
82	RBX	<i>Rhodnius brethesi</i>	Brazil	TcIV	PCR
778	Rb 778	<i>Rhodnius brethesi</i>	Brazil	TcIV	PCR
	STC	<i>Procyon lotor</i>	USA	TcIV	PCR
	92122	<i>Procyon lotor</i>	USA	TcIV	PCR
967	NRCL3	<i>Homo sapiens</i>	Chile	TcV	PCR
185	185	<i>Triatoma infestans</i>	Bolivia	TcV	PCR

656	656	<i>Homo sapiens</i>	Bolivia	TcV	PCR
	CL	<i>Triatoma infestans</i>	Brazil	TcVI	PCR
	CL Bre -Esm	<i>Triatoma infestans</i>	Brazil	TcVI	TritypDB
	CL-Bre-Non-Esm	<i>Triatoma infestans</i>	Brazil	TcVI	TritypDB
	Tula cl2	<i>Homo sapiens</i>	Chile	TcVI	Genomic draft
793	MO294	<i>Myotis levis</i>	Brazil	Tcbat	PCR
947	3681	<i>Myotis nigricans</i>	Brazil	Tcbat	PCR
293	998	<i>Myotis levis</i>	Brazil	Tcbat	PCR
203	248	<i>Myotis ruber</i>	Brazil	Tcbat	PCR
1122	1122	<i>Myotis albescens</i>	Brazil	Tcbat	PCR
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>					
B7		<i>Phyllostomus discolor</i>	Brazil		TritypDB
344		<i>Carollia perspicillata</i>	Brazil		Genomic Draft
1705		<i>Artibeus planirostris</i>	Brazil		PCR
<i>Trypanosoma dionisii</i>					
211		<i>Eptesicus brasiliensis</i>	Brazil		Genomic draft
495		<i>Carollia perspicillata</i>	Brazil		PCR
1778		<i>Carollia perspicillata</i>	Brazil		PCR
<i>Trypanosoma erneyi</i>					
1946		<i>Mops condylurus</i>	Mozambique		Genomic draft
1293		<i>Tadarida</i> sp.	Mozambique		PCR
1294		<i>Tadarida</i> sp.	Mozambique		PCR
<i>Trypanosoma rangeli</i>					
				Lineage	
031	San Agustín	<i>Homo sapiens</i>	Colombia	A	PCR
594	SMH-79	<i>Homo sapiens</i>	Guatemala	A	PCR
1257	IM5051	<i>Saguinus bicolor</i>	Brazil	A	PCR
701	ROR-62	<i>Rhodnius robustus</i>	Brazil	A	PCR
086	AM80	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	B	Genomic draft
238	5-31	<i>Saguinus labiatus</i>	Brazil	B	PCR
010	Legeri	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Brazil	B	PCR
014	PG	<i>Homo sapiens</i>	Panama	C	PCR
1260	Pa479GS	<i>Rhodnius pallescens</i>	Panama	C	PCR
1952		<i>Saguinus geoffroyi</i>	Panama	C	PCR
023	SC58	<i>Echimys dasythrix</i>	Brazil	D	PCR
643	Tra643	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Brazil	E	PCR
1224	IM5040	<i>Rhodnius pictipes</i>	Brazil	E	PCR
1225		<i>Rhodnius pictipes</i>	Brazil	E	PCR
1228		<i>Rhodnius pictipes</i>	Brazil	E	PCR
<i>Trypanosoma conorhini</i>					
025		<i>Rattus rattus</i>	Brazil		Genomic draft
<i>Trypanosoma lewisi</i>					
034		<i>Rattus rattus</i>	Brazil		Genomic draft
<i>Trypanosoma vivax</i>					
Y486	<i>T. vivax</i>	<i>Bos taurus</i>	Nigeria		TritypDB
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>					
TREU927		<i>Glossina pallidipes</i>	Kenya		TritypDB
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>					
DAL972		<i>Homo sapiens</i>	Ivory Cost		TritypDB
<i>Trypanosoma congolense</i>					
IL3000		<i>Bos</i> sp.	Kenya	Savannah	TriTrypDB
Cam22		<i>Capra aegagrus hircus</i>	Cameroon	Forest	PCR
WG5		<i>Capra aegagrus hircus</i>	Kenya	Kilifi	PCR
TREU1457		<i>Bos taurus</i>	Nigeria	Savannah	PCR
<i>Trypanosoma simiae</i>					
Ken14		<i>Glossina</i> sp.	The Gambia		PCR
<i>Trypanosoma godfreyi</i>					
Ken7		<i>Glossina</i> sp.	The Gambia		PCR
<i>Trypanosoma serpentis</i>					
1052	<i>T. serpentis</i>	<i>Pseudoboa nigr</i>	Brazil		Genomic draft
<i>Trypanosoma grayi</i>					
ANR4		<i>Glossina palpalis</i>	The Gambia		TritypDB
<i>Trypanosoma</i> sp.					
339	<i>Trypanosoma</i> sp.	<i>Rhinella marina</i>	Brazil		Genomic draft
Insect Trypanosomatids					
Genus <i>Crithidia</i>					
	<i>C. fasciculata</i>	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Brazil		TritypDB
	<i>C. acanthocephali</i>	<i>Acanthocephala femorata</i>	Brazil		Genomic draft

Genus Leptomonas			
<i>L. costaricensis</i>	<i>Ricolla simillima</i>	Costa Rica	Genomic draft
Genus Leishmania			
<i>L. major</i>	<i>Homo sapiens</i>	Israel	TritypDB
<i>L. tarentolae</i>	<i>Tarentola mauritanica</i>	Argelia	TritypDB 1
Genus Endotrypanum			
<i>E. schaudinni</i>	<i>Choloepus hoffmani</i>	Panama	Genomic draft
Genus Angomonas			
<i>A. desouzai</i>	<i>Omidia obesa</i>	Brazil	Genomic draft
<i>A. deanei</i>	<i>Zelus leucogrammus</i>	Brazil	Genomic draft
Genus Strigomonas			
<i>S. culicis</i>	<i>Aedes vexans</i>	USA	Genomic draft
<i>S. oncopelti</i>	<i>Oncopeltus</i> sp.	USA	Genomic draft
Genus Herpetomonas			
<i>H. muscarum</i>	<i>Musca domestica</i>	USA	Genomic draft
Genus Phytomonas			
<i>Phytomonas</i> sp	<i>Jatropha macrantha</i>	Peru	Genomic draft
Euglena gracilis			
SAG 1224-5/25	Free living	Unknown	Genomic draft
Discoplastis spatirhyncha			
SAG 1224-42	Free living	Germany	Genomic draft
Eutreptia viridis			
SAG 1226-1c	Free living	United Kingdom	Genomic draft
Bodo sp.			
ATCC 50149	<i>Ictalurus punctatus</i>	USA	Genomic draft
Parabodo caudatus			
ATCC 30905	Free living	Czechoslovakia	Genomic draft

Table 1: TCC - Code number of the isolates/strains cryopreserved in the Trypanosomatid Culture Collection (TCC). SAG - The culture collection of Algae at the University of Gottingen, Germany. Prolina racemase sequences obtained by sequencing of PCR-amplified genes are going to be deposited in Genbank. Sequences from genome databases: GenBank, TriTrypDB and drafts genomes from our Tree of Life project or from the Washington University School of Medicine.

2.5. Genomic organization and codon analyses of trypanosome PRAC genes

The comparison of PRAC genomic organization in the analyzed genomes was performed with the bl2seq BLASTX algorithm using the flanking downstream and upstream regions (~ 10,000 bp) previously reported for *T. cruzi* and *T. vivax* (Chamond et al., 2000, 2009) in all trypanosome genomes investigated in this study. Codon-selection analysis was performed using the HyPhy v2.2 open-source package (Kosakovsky et al., 2005) with a threshold *p*-value < 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. The analysis of kinetoplastid and euglenid genomes revealed a family of PRAC gene homologs exclusively in *Trypanosoma* species

We searched for PRAC homologs in the genomes of trypanosomatids, bodonids and euglenids using *TcPRACA* and *TcPRACB* sequences as queries. Homologous genes were identified in isolates representing the full intra-specific diversity of *T. cruzi*, and also in *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. erneyi*, *T. rangeli*, *T. conorhini* and *T. lewisi*. In addition to these mammalian parasites, PRAC homologs were found in trypanosomes from snakes (*T. serpentis*), crocodiles (*T. grayi*) and anurans (*T. sp* 339). All species showed a single copy of a PRAC homolog per haploid genome (Table 1; Fig. 1).

Previous studies have reported the absence of PRAC homologs from the genomes of *T. b. brucei* and *T. congolense* (Reina-San-Martin et al., 2000; Chamond et al., 2005, 2009). Here, *T. b. gambiense* and *T. evansi* (subgenus *Trypanozoon*) was among the trypanosomes lacking PRAC (Table 1). Attempts to detect PRAC genes by PCR amplification failed for *T. simiae*, *T. godfreyi*, and *T. congolense* of subgroups Forest and Killif (data not shown), which together with *T. congolense* of subgroup Savannah (the only available genome) form the subgenus *Nannomonas*. All the species of *Trypanozoon* and *Nannomonas* formed a subclade within the major *T. brucei* clade in which *T. vivax* has a basal and is the only species that carries a PRAC gene (Hamilton et al., 2007; Cortez et al., 2006; Adams et al., 2010).

The examination of non-trypanosome species of the Trypanosomatidae revealed that PRAC genes are absent not only from *Leishmania* spp., as previously reported (Reina-San-Martin et al., 2000), but also from the genomes of monoxenic parasites of insects of the genera *Crithidia* and *Leptomonas*, as well as *Angomonas*, *Strigomonas* and *Herpetomonas*, which are mostly parasites of dipterans, and in the plant-hemipteran parasites of *Phytomonas* (Maslov et al., 2013; Borghesan et al., 2013; Lukes et al., 2014). Regarding non-trypanosomatid kinetoplastids, our search did not reveal PRAC homologs in *Bodo* sp. and *Parabodo caudatus*. No homologs were found in the genomes of the euglenids *Euglena gracilis*, *Eutrepia viridis* and *Discoplastis spathirhyncha*.

In conclusion, *TcPRAC* homologs were found in the genomes of species representing the main clades within the *Trypanosoma* phylogeny (Fig. 1). Confirming previous studies (Chamond et al., 2005; 2009), in the clade *T. brucei*, only *T. vivax* carries the PRAC gene. Therefore, *TcPRAC* homologs are widespread in genus *Trypanosoma*, and their absence from non-trypanosome trypanosomatids, bodonids and euglenids strongly suggests that these genes evolved exclusively in *Trypanosoma* (Table 1, Figs 1, 2).

3.2. Molecular characterization of new putative PRAC-like enzymes of trypanosomes.

The catalytic mechanism of trypanosome PRAC is essentially identical to that of the prokaryotic PRAC enzymes. The catalytic activity of PRAC enzymes depends mainly on two residues of cysteine that transfer protons (deprotonation/reprotonation) to the chiral carbon (C α) of L-proline/D-proline enantiomers, resulting in the stereoconversion of its configuration (Chamond et al., 2003; Buschiazzi et al., 2006). PRAC-like genes include racemase-like genes that exhibit strong sequence similarity to proline racemases. A small number of eukaryotic PRAC-like enzymes have all the residues critical for racemase activity, and most of the PRAC-like enzymes function as proline epimerases and, more sporadically, as proline dehydratases (Fitzpatrick et al., 2008; Visser et al., 2012).

Figure 1: Amino acid alignment of proline racemase (PRAC) homologs from species of genus *Trypanosoma*: *T. cruzi* (DTUs TcI-TcVI and Tc-bat), *T. cruzi marinkellei* (*T. c. m.*), *T. erneyi*, *T. dionisii*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. lewisi*, TvPRAC - *T. vivax*, *T. serpenti*, *T. grayi*, *T. sp 339* (anuran trypanosome), *Gemella* (*Gemella haemolysans*), CsPRAC – *Clostridium difficile*. Essential motifs in green (MCGH and MIII), active site in red (SPCGT), R1, R2 and R3 are residues involved in substrate specificity, and Cys 91 and Cys 267 are catalytic cystein residues. Numbers in blue indicate amino-acids described to distinguish between *TcPRACA* and *TcPRACB*, and numbers in red indicate new substitutions identified in putative PRAC defined for new trypanosome species.

Proline Racemase

gGAPDH

Figure 2. Congruent phylogenies (Maximum likelihood analyses) of trypanosome species inferred using nucleotide sequences from entire PRAC and gGAPDH genes. The internode support was estimated by performing 100 bootstrap replicates. The arrow on the gGAPDH-derived tree indicates the place hypothesized for the horizontal transference of bacterial PRAC gene to a common ancestor of *Trypanosoma*.

The alignment of 28 *TryPRAC* homologs from 11 trypanosome species using *TcPRAC* for guidance revealed the two cysteine residues, the active site SPCGT and the MCGH motif in all sequences; only the MIII motif had relevant polymorphism. At the residues R1, R2 and R3, which are involved in substrate specificity, *TryPRAC* homologs have conserved R1 and variable R2 and R3 (Fig. 1). All species of the subgenus *Schizotrypanum* (*T. cruzi* of all DTUs, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* and *T. erneyi*) share identical essential motifs and conserved residues. Within this clade, only *T. erneyi* showed one non-synonymous substitutions at R3. In contrast, homologs from more distant trypanosomes showed synonymous and non-synonymous substitutions at R2 (*T. rangeli*, *T. conorhini* and *T. sp* TCC339) and R3 (*T. conorhini*, *T. serpentis*, *T. grayi* and *T. sp* TCC339; Fig. 1). The implications of these substitutions for changes in substrate specificity merit further investigation.

All *TryPRAC* sequences identified in this work lacked a signal peptide, as reported in the isoform *TcPRACA* of *T. cruzi* CL Brener, as well as *TcPRACB* and *TvPRAC* (Chamond et al., 2003, 2009), suggesting that *TryPRAC* are mostly intracellular enzymes that can be released through the flagellar pocket and/or parasite death (Chamond et al., 2009). Despite a high conservation of catalytic domains, we identified one new PRAC homolog for each species of trypanosome characterized in this study, suggesting that variant *TryPRAC* enzymes can play different roles in the life cycles and infectious processes of diverse trypanosome species.

3.3. Phylogenetic relationships of 11 trypanosome species based on PRAC homologs support the currently recognized phylogeny of *Trypanosoma*

T. cruzi is closely phylogenetically related to all other species of the subgenus *Schizotrypanum* (*T. c. marinkellei*, *T. dionisii* and *T. erneyi*), which are called *T. cruzi*-like because they share morphology of blood and culture forms, although they differ in hosts, vectors and pathogenicity. The development as amastigotes and differentiation to trypomastigotes within mammalian cells *in vitro* is a feature of *Schizotrypanum* spp., whereas *in vivo*, only *T. cruzi* infect mammals other than bats. Nevertheless, as in *T. cruzi* infection, nests of amastigotes in cardiac cells can be found in bats infected with *T. cruzi*-like species. *T. cruzi* is transmitted by triatomines, while only cimicids are proved vectors of *T. dionisii* (Cavazzana et al., 2010; Lima et al., 2012a).

For phylogenetic inferences within *Schizotrypanum*, we selected 72 isolates of *T. cruzi* assigned to TcI-TcVI and Tcbat. According to a strongly supported branching pattern of the phylogenetic tree and amino-acid-sequence divergence, all species clustered tightly, forming a monophyletic assemblage of trypanosomes diverging by a maximum of ~3% (within *T. cruzi*) to 21% (between *T. cruzi* and *T. dionisii*). *T. c. marinkellei* from South American bats was the closest relative of *T. cruzi* (~8% divergence), followed by *T. erneyi* from African bats (14%) and *T. dionisii* from European and South American bats (15%). Despite relevant sequence divergence (34-39%), PRAC sequences from *T. rangeli* and *T. conorhini* clustered to form the sister group of the clade *Schizotrypanum*, altogether forming the clade *T. cruzi*, with *T. lewisi* as outgroup (Fig. 2). In the bat-seeding hypothesis for the origin of the *T. cruzi* clade, we proposed a scenario in which an ancestral trypanosome parasite in bats diverged to lineages that evolved exclusively in Chiroptera, giving rise to the bat-restricted species, or evolved through multiple host jumps, at independent times, giving rise to species infective to other mammalian orders, including the generalists *T. cruzi* and *T. rangeli*, which infect both bats and humans (Hamilton et al., 2012; Lima et al., 2012a,b, 2013).

The most divergent PRAC sequence among the trypanosomes infecting mammalian hosts was TvPRAC of *T. vivax*, which belong to the clade *T. brucei*.

The divergence between TcPRAC and TvPRACs was ~39%. Homologous PRAC genes from trypanosomes of non-mammalian hosts, including snakes (*T. serpentis*), crocodiles (*T. grayi*) and anurans (TCC339), diverged from both TcPRACs and TvPRAC. The anuran trypanosome TCC339 formed the most basal branch in the PRAC phylogenetic tree (Fig. 2). Previous phylogenies demonstrated that all trypanosomes from anurans nested into the aquatic clade, which also includes trypanosomes of fishes, turtles and other animals that share aquatic environments with their vector leeches. Increasing evidence has strongly supporting this clade as the most basal in genus *Trypanosoma* (Hamilton et al., 2007; Ferreira et al., 2008). Also concordant with previous phylogenies, *T. serpentis*, a parasite of snakes transmitted by sand flies that clustered with lizard trypanosomes (Viola et al., 2009) nested into the main clade, which also includes species from mammals and birds. *T. grayi*, which infects African crocodiles and is transmitted by tsetse flies (Fermineo et al., 2013), was also placed in this main clade, but is distinct from the trypanosomes of lizards and snakes (Fig. 2).

According to the PRAC inferred phylogeny, which is totally congruent with the currently accepted phylogenetic relationships established using SSU rRNA and gGAPDH genes (Fig. 2) for the genus *Trypanosoma* (Hamilton et al., 2007, 2012; Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2009; Lima et al., 2012a, 2013; Fermineo et al., 2013), TryPRAC homologs evolved to become species-specific. Despite their absence from *Trypanozoon* and *Nannomonas* species, phylogenetic inferences support the suitability of TryPRAC homologs for evolutionary studies of trypanosomes.

3.4. Specific genetic repertoire and relationships among PRAC genes from *T. cruzi* of TcI-TcVI and Tcbat

T. cruzi is a complex of genetically diverse isolates distributed among 7 intraspecific subdivisions: TcI-TcVI and Tcbat. Chagas disease pathology ranges from subclinical infection to severe cardiac and digestive syndromes and death. The heterogeneity of *T. cruzi* isolates has been implicated in different clinical forms of the disease. However, attempts to associate *T. cruzi* genotypes with clinical forms, virulence and

pathogenicity as well as levels of metacyclogenesis and mechanisms of host-cell invasion revealed some degrees of association but involved factors from hosts and parasites that are not well understood (Zingales et al., 2012).

We initially compared entire predicted PRAC amino-acid sequences from the genomes of *T. cruzi* Sylvio X10.6, JRcl4 and G of TcI; Esmeraldo cl3 of TcII; M6241cl6 of TcIII; CANIII of TcIV; NRCL3 of TcV; CL Brener (Esmeraldo-like and non-Esmeraldo-like haplotypes) and Tula of TcVI and Tcbat. Unlike all other isolates, which carried single PRAC genes, *T. cruzi* CL Brener (TcVI) exhibited two PRAC genes, *TcPRACA* and *TcPRACB*, as reported previously (Chamond et al., 2003), which were found in the genomes of the haplotypes Esmeraldo and non-Esmeraldo like, respectively (Fig. 1).

By analyzing the amino-acid alignment, we assessed the polymorphism at 7 residues that were previously used to differentiate between *TcPRACA* and *TcPRACB* (Chamond et al., 2003). A leucine at position 7 (typical of *TcPRACB*) was found in all isolates of TcI, TcIII, TcIV and Tcbat. The phenylalanine at position 7 that had been reported to be specific to *TcPRACA* was found in Y and TCC1508, but not in Esmeraldo, although all three are strains of TcII. Sequences of some isolates of TcV and TcVI showed only phenylalanine at this position, most likely because the sequences obtained so far were derived from only one haplotype; however, like CL Brener of TcVI and corroborating the hybrid origin and heterozygosity, sequences of NRCL3 of TcV may have either phenylalanine or leucine. All *TcPRACs* from all DTUs have isoleucine at position 79 (like *TcPRACB*); methionine at this position is exclusive to *TcPRACA*. The isolates of TcII and TcIV had valine at positions 108 and 167 and asparagine at position 247, like *TcPRACA*. At these positions, TcI, TcIII and Tcbat had leucine, isoleucine and lysine, respectively, like *TcPRACB*. Additional polymorphic sites were identified for TcI, Tcbat and TcIV. Together, amino-acid polymorphisms at 12 positions defined DTU-specific profiles (Fig. 1).

To assess the genetic repertoires and infer phylogenetic relationships among *T. cruzi* DTUs, we inferred a network genealogy using amino-acid sequences of *TcPRAC* homologs from 58 isolates representing the intra-specific phylogenetic diversity. All

isolates were previously genotyped using traditional ribosomal and mini-exon markers (Zingales et al., 2012). (Table 1). In the network, *TcPRAC* genes from isolates of the same DTUs in general clustered to form 5 subclades: TcI, Tcbat, TcIV, TcIII and TcII. However, sequences from TcV and TcVI clustered with TcII or TcIII. In agreement with their hybrid origin, sequences from NRCL3 of TcV and CL Brener of TcVI clustered with TcII or TcIII, forming a reticulate pattern in the network (Figs. 3, 4). The results demonstrated that TcV and TcVI *PRACs* were derived from hybridization between TcII and TcIII, as hypothesized from other markers (Westenberger et al., 2005; Yeo et al., 2011; Lewis et al., 2011; Zingales et al., 2012). Probably all hybrid isolates have two *PRAC* genes, more sequences must be investigated for both TcV and TcVI isolates. Also in accord with previous studies, large divergences among *TcPRAC* sequences (~4%) suggest that TcI, TcII, TcIII and TcIV diverged a long time ago, whereas Tcbat and TcI diverged more recently, but before the recently emerged TcV-TcVI (Marcili et al., 2009a,b,c; Flores-Lopez et al., 2011; Lewis et al., 2011).

Future investigations should include functional studies of putative *TcPRAC* enzymes using isolates representing both genetic and phenotypic diversity. Different *TcPRAC* enzymes can be related to DTU- or strain-specific features such as degrees of metacyclogenesis, cell invasion and virulence, with infections ranging from asymptomatic to highly lethal. The extensive intra-DTU genotypic and phenotypic diversity complicates the association between the different *TcPRACs* and parasite behaviors. In general, strains of TcII and TcVI show high parasitemia and mortality in mice and have been associated with severe cardiac and digestive forms of Chagas disease in Southern Cone countries (Ragone et al., 2012; Zingales et al., 2012). TcIII, common in a sylvatic cycle in Brazil and neighboring countries, also induces significant pathology in mice (Martins et al., 2008; Marcili et al., 2009a; Llewellyn et al., 2009a). TcI is the most widespread throughout Latin America, strains are highly divergent in terms of virulence, and it is the main agent of Chagas disease in Central and Northern South America, causing severe cardiomyopathies (Áñez et al., 2004; Samudio et al., 2007; Ramirez et al., 2012). TcIV, predominately from sylvatic cycles, is common in human

oral infections in Brazilian Amazonia and Venezuela, induces moderated parasitemia and low mortality in mice (Marcili et al., 2009a; Monteiro et al., 2013; Segovia et al., 2013). Tcbat, common in bats from South and Central America and recently found in humans, induces very low parasitemia in mice (Marcili et al., 2009c; Pinto et al., 2012; Ramirez et al., 2014).

In conclusion, new *TcPRAC* gene was each found for TcI, Tcbat and TcIV. Therefore, *T. cruzi* comprises at least three (TcI, TcIII and TcIV exhibited small heterogeneities) additional *TcPRAC* homologs besides *TcPRACA* and *TcPRACB*. Further studies are required to confirm whether the new genes code for functional enzymes while the identification of new isoforms required biochemical analysis.

3.6. Genotyping of *T. cruzi* DTUs based on polymorphisms of *TcPRAC* homologs

Diverse DNA sequences and approaches have been employed to genotype *T. cruzi* isolates including multicopy or single-copy genes, multiple genes and microsatellite loci analyses. Most genetic targets allow the separation of TcI, TcII, TcIII, TcIV and Tcbat; however, the differentiation between TcV and TcVI still requires multistep approaches or the analysis of several cloned sequences of genes carrying copies differing in the two haplotypes of hybrid DTUs (Brisse et al., 2001; Lewis et al., 2009; Zingales et al., 2012; Lima et al., 2002b).

To evaluate the value of *TcPRAC* polymorphisms as genotyping markers, we compared partial PRAC sequences from *T. cruzi* isolates of all DTUs (Table 1). We detected polymorphic-amino acids unique to one DTU or shared by two or more DTUs. Taken together, sets of DTU-specific polymorphic amino-acids permit differentiation among TcI, Tcbat, TcII, TcIII and TcIV. The hybrids TcV and TcVI lacked specific PRAC sequences, but can be identified by the presence of two different gene copies resembling *TcPRACA* and *TcPRACB* (Fig. 3A).

The inferred genealogy using PRAC nucleotide sequences from 24 isolates (63 polymorphic sites) of all DTUs corroborated the clustering according to DTUs, the clustering of sequence from the hybrids TcV and TcVI with TcII and TcIII, and due to the larger number of polymorphic sites compared to amino-acid sequences

clearly demonstrated the heterogeneity within TcI, TcIII and TcIV (Fig. 4). Within TcIV, the isolates from North America were clearly separated from South American isolates, as previously demonstrated using other molecular markers (Marcili et al., 2009a; Lewis et al., 2010). *TcPRAC* polymorphisms were also compatible to known polymorphisms within TcIII and TcI (Marcili et al., 2009b; Llewellyn et al., 2009a, b; Ramirez et al. 2011; Ocaña-Mayorga et al., 2010). Taken together, polymorphisms in *TcPRAC* genes can be useful for genotyping *T. cruzi* at the DTU level, to assess intra-DTU subgroups, and to identify hybrid isolates.

3.7. *T. rangeli* has only PRAC pseudogenes and they are closest to homologous gene of *T. conorhini*

T. rangeli is a non-pathogenic parasite of humans and domestic and wild animals in Central and South America. This species is thought to be restricted to the bloodstream and survives host defenses for months or years by unknown mechanisms at low parasitemia. *T. cruzi* and *T. rangeli* are the only agents of human trypanosomiasis in the Americas, sharing mammalian hosts, triatomine vectors and their geographic distribution (Vallejo et al., 2009). *T. rangeli* overcomes the immune defenses of the insect vector (*Rhodnius* spp.), multiplying in the gut and invading the haemolymph, where the parasites multiply both outside of and inside haemocytes before reaching the salivary glands, where metacyclogenesis takes place. This species differs from *T. cruzi*, which develops exclusively in the gut, and from *T. brucei*, which reaches the tsetse salivary glands from the proboscis (Azambuja et al., 2005; Vallejo et al., 2009).

All predicted proteins encoded by *TryPRAC* genes are compatible with the expression of racemase enzymes. The only exception is *T. rangeli* that possess only pseudogenes. This finding was confirmed by the analysis of PRAC genes from the *T. rangeli* AM80 genome (lineage B) and sequences (determined by PCR-sequencing) from isolates of this and other phylogenetic lineages (A-E). PRAC pseudogenes were previously reported in *T. congolense* (Reina-San-Martin et al., 2000; Chamond et al., 2009); however, while *T. congolense* retained gene remnants, *T. rangeli* contained full conserved sequences (Figs 1, 4).

Figure 3. (A). Polymorphic sites flanking conserved catalytic domains of PRAC amino-acid sequences from isolates of *T. cruzi* representative of the entire infraespecific genetic diversity: DTUs TcI-TcVI and Tcbat. TcPRACA and TcPRACB = major isoforms of *T. cruzi* **(B).** Network genealogy of TcPRAC amino-acid sequences from *T. cruzi* and closely related species of the subgenus *Schizotrypanum*: *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* and *T. erneyi*. Size of circles correspond to the number of isolates.

We also identified a putative PRAC homolog, apparently expressed and functional, in *T. conorhini*, the trypanosome of domestic rats transmitted by *Triatoma rubrofasciata* and infective for monkeys under experimental conditions (Deanei et al., 1961; Deanei et al., 1986). *T. rangeli* is more closely related to *T. conorhini* than to *T. cruzi*, forming the sister clade of *Schizotrypanum*. This relationship has been demonstrated using SSU rRNA, gGAPDH and Cathepsin L- and B-like genes (Hamilton et al., 2007; Lima et al., 2013; Ortiz et al., in preparation).

Previous studies indicated that enzymatic activity is essential for the mitogenic activity of PRAC proteins (Reina-San-Martin et al., 2000; Chamond et al., 2005). Accordingly, *T. rangeli* PRAC should be incapable of B-cell polyclonal activation mediated by PRAC mitogenic activity. It is tempting to speculate that the lack of PRAC enzymes can be associated with very low parasitemias even in the early phase of *T. rangeli* infection and the non-pathogenicity of this species. Moreover, while PRAC activity appears to be important for the differentiation of epimastigotes into infective metacyclic forms of *T. cruzi* in the gut of triatomines (Chamond et al., 2003) it does not appear to be necessary for the metacyclogenesis of *T. rangeli* in the salivary glands. Like *T. cruzi*, the development of *T. conorhini* is restricted to the gut of its triatomine vector; like *T. rangeli*, this species is unable to develop inside mammalian cells (Hoare, 1972). The strategies used by these two species to obtain energy and survive vertebrate host defenses are unknown.

3.8. Genotyping of *T. rangeli* using PRAC sequences

To evaluate the suitability of PRAC polymorphisms as genotyping markers, we compared PRAC sequences from 17 *T. rangeli* isolates from Central and South America of lineages TrA-TrE (Fig. 5A). The genealogy of *T. rangeli* sequences revealed two major clades: TrB, which consists of isolates from the Brazilian Amazonia associated with the *R. brethesi* complex, and a second clade consisting of closely related isolates distributed into three subclades: TrA/D (isolates from Guatemala, Honduras, Venezuela, Colombia and Brazil associated with the *R. prolixus* complex), TrC (isolates from Panama, Costa Rica and Colombia associated with *R. pallescens*) and TrE (so far restricted to Brazil and associated with *R. piticpes*). In contrast to the high similarity (3-5% divergence) among the PRAC sequences from isolates of TrA, C, D and E (TrD and TrA were highly similar), sequences from TrB diverged significantly (33%) from these lineages. Similar topologies were observed using PRAC amino-acid (data not shown) and nucleotide sequences (Fig. 5B).

Although they are pseudogenes, PRAC-like genes from *T. rangeli* also support the established phylogenetic lineages and the relationships among them. The analysis of representatives of overall vertebrate host and vector diversity and the geographic range of *T. rangeli* supports the 5 main lineages (TrA-E), in agreement with results from ribosomal, spliced leader and cathepsin L-like genes (Maia da Silva et al., 2004, 2007, 2008, Ortiz et al., 2009). The phylogeographical concordance between *T. rangeli* lineages and *Rhodnius* complexes is consistent with a long coexistence between the vectors and parasites, with divergence associated with sympatric *Rhodnius* spp. rather than with particular vertebrate hosts (Maia da Silva et al., 2007).

Figure 4. Network genealogy inferred using *TcPRAC* nucleotide sequences from *T. cruzi* isolates of TcI-TcVI and Tcbat. Size of circles correspond to the number of isolates

Figure 5 (A). Amino-acid alignment of PRAC pseudogene sequences from isolates of *T. rangeli* representatives of all phylogenetic lineages (TrA-TrE). PRAC essential motifs in green (MCGH and MIII); active site in red (SPCGT); R1, R2 and R3 residues involved in substrate specificity in blue, and cystein residues (Cys91 and Cys267) in yellow. Asterisks in red indicate stop codons. TcPRACA and TcPRACB = major isoforms of *T. cruzi*; Tconorinh = *T. conorhini*. **(B).** Phylogenetic analysis (Maximum Parsimony) of *T. rangeli* PRAC genes evidencing the lineages TrA-TrE.

3.9. The horizontal transfer of bacterial PRAC was a single and ancient event that occurred in an ancestor of *Trypanosoma*

The acquisition by horizontal gene transfer (HGT) of a large number of foreign genes from viruses, bacteria, eukaryotes, vertebrate hosts and vectors can change genetic and metabolic repertoires and had played important roles in the evolution of parasites (Huang et al., 2004; Andersson et al., 2006; Pombert et al., 2012; Hester et al., 2013; Alves et al., 2013). The PRAC-like family is widely distributed and is considered a virulence factor in highly pathogenic prokaryotes such as *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* (Goytia et al., 2007) and *Brucella abortus* (Spera et al., 2006).

The identification of bacterial PRAC homologs in *T. cruzi* and *T. vivax* and their absence from *T. brucei* and *T. congolense* suggest a complex evolution of PRAC genes in trypanosomes. Increased taxon sampling to represent the full diversity of trypanosomatids and their ancestor bodonids and euglenids provides relevant insights into this process. In our phylogenetic analysis, which included 2,530 eukaryotic and prokaryotic putative PRAC-like genes, all *TryPRAC* homologs were nested in a strongly supported clade formed exclusively of trypanosome sequences, evidencing their common ancestry. No PRAC-like genes besides those encoding putative proline racemase enzymes were found in trypanosomes. The monophyletic *TryPRAC* genes were separated by large distances from fungal and metazoan PRAC-like genes (Fig. 6). The PRAC-like genes detected in eukaryotes were all acquired through HGT from prokaryotes, and their polyphyletic pattern indicates that they originated at different times through multiple HGT events (Fitzpatrick et al., 2011).

The relative timing of the HGT was investigated by increased taxon sampling. No PRAC-like genes were present in bodonids or non-trypanosome trypanosomatids, indicating that the ancestral PRAC gene was transferred after the split between trypanosomes and the other trypanosomatids, but before the divergence of the major groups of trypanosomes (Fig. 1). Therefore, the results strongly suggest that a single HGT into a common ancestor of the trypanosomes gave rise to the *TryPRAC* genes. Important questions include why

PRAC enzymes are not needed in the life cycles of *T. congolense*, *T. brucei* ssp. and *T. rangeli*.

Results of our broad phylogenetic analysis provided new insights into the origin of PRAC homologs in *Trypanosoma*. Accordingly, *TryPRAC* homologs were acquired through a single HGT from a member of the Firmicutes (Hung et al., 2010; Yutin and Galperin, 2013). The closest related Firmicute group comprises 17 species (20 sequences) of Bacilli, most of the order Lactobacillales, plus two species of Negativicutes (obligate anaerobes that live in rivers, lakes, and vertebrate guts; Fig. 6). The Lactobacillales species live in soil, water, plants and animals and were the most common (14 species) among the species of Bacilli with PRAC-like genes closely resembling *TryPRAC*s. Species of *Gemella* (*G. haemolysins*, *G. morbillorum* and *G. sanguinis*) and *Lactobacillus versmoldensis* were the most closely related to *TryPRAC*s (56-57% identity). In previous studies Chamond et al., 2003, 2009), the closest relatives of *TcPRAC* and *TvPRAC* were *Clostridium difficile* and *Clostridium sticklandii* (both recently placed in the genus *Peptoclostridium*);, which are also related to *Gemella* (Hung et al., 2010; Yutin and Galperin, 2013). *Gemella* species are commensals of the oral and gastrointestinal flora of humans and other animals; however, as opportunistic pathogens, these bacteria can cause severe pulmonary and cardiac infections and meningoencephalitis in humans (Godinho et al., 2013; Galen et al., 2014).

Data are scarce in the literature about evolution of genes acquired by HGT in trypanosomes. In a recent study, it was hypothesized that *T. cruzi* acquired genes for calcium mobilization necessary for host-cell invasion via ancient HGT from *Salmonella* lineages. Unlike the acquisition of *TryPRAC* by one common ancestor of the genus *Trypanosoma*, the findings from this study are consistent with the transfer of a *Samonella* gene in the early evolutionary history of *T. cruzi* contributing to its ability for host-cell invasion (Silva et al., 2013).

Figure 6. Proline racemase maximum likelihood phylogeny. **(A)** Comprehensive analysis including 2,530 PRAC-like protein sequences from prokaryotes and eukaryotes available in the non redundant databases – NR. The dotted line indicates the branch submitted to reanalysis in part B. **(B)** Reanalysis of selected branch containing trypanosomes and bacterial PRAC-like genes. The figure shows only tripanosomatids and the two closest related branches. The optimum model of protein substitution was found to be WAG+G. Bootstrap resampling (100 iterations) was undertaken and are displayed. Branches are colored according to their taxonomy.

3.10. Synteny analysis revealed highly conserved gene order around *Try*PRAC homologs

Previous studies revealed high conservation of the gene segment containing the PRAC locus, with a high degree of synteny among *T. cruzi* CL Brener and *T. vivax*, the species with intact PRAC genes (Chamond et al., 2003, 2009). Although the *T. congolense* and *T. b. brucei* genomes lack PRAC genes, the synteny of this genome segment was retained. PCR analysis of this region using primers specific to adjacent genes confirmed the absence of PRAC genes in these species (Chamond et al., 2009). Here, we confirmed the lack of PRAC genes in the available genomes of other strains of *T. brucei* ssp. and *T. evansi*. These species and *T. congolense* form a monophyletic group, in which *T. vivax* is the basal species, suggesting a loss event after the divergence of *T. vivax* from the common ancestor of this clade (Chamond et al., 2009).

To verify that the organization of PRAC genes is conserved in the trypanosome species included in this study, we performed BLAST searches for homologous genes in PRAC loci of their genome databases. The results showed a syntenic block shared by all species (Fig. 7). The adjacent regions of PRAC genes exhibited total synteny in *T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. erneyi*, *T. dionisii*, *T. vivax* and *T. grayi*, with 8 genes arranged in the same order: K39 kinesin; WD domain-containing protein; cold shock domain-containing protein, PRAC, hypothetical protein; zinc-finger protein; poly (A) polymerase; carbohydrate kinase and phosphatidyl serine synthetase. Because the genomic drafts are in progress, synteny was recovered only for downstream adjacent genes in *T. serpentis*, and in *T. rangeli* and *T. conorhini* the upstream genes were found in the same order, although in separate contigs. Synteny analyses suggest a single ancient insertion of the PRAC gene between the cold-shock and hypothetical protein genes (Fig. 7).

Despite showing partially syntenic blocks; in *Leishmania* spp. the PRAC gene was replaced by a Tub superfamily gene (Chamond et al., 2009), while upstream, between the genes encoding the hypothetical and the zinc-finger proteins, there is a putative enolase gene that is absent in trypanosomes (Fig. 7). The genomic organization of this locus was also partially syntenic in trypanosomatids of the genera *Angomonas* and *Strigomonas*. In these species, the genes encoding the hypothetical and cold-shock proteins are not intercalated by PRAC, Tub or any other gene; however, both the zinc-finger protein and the poly (A) polymerase genes are also present. Improved synteny analysis of other species requires larger contigs and

scaffolds not available in the genome drafts. Results showed that PRAC gene gain or loss was not the only event that occurred in this locus during the evolution of the trypanosomatids.

3.10. PRAC homologs from trypanosomes are undergoing purifying selection

To examine positive or negative selection pressures on the evolution of *Try*PRAC, we calculated the dN/dS ratio for putative *Try*PRAC homologs. Finding of dN/dS ratios below 1, indicative of negative or purifying selection, implied that positive selection is not the driving evolutionary force shaping the evolution of *Try*PRAC homologs. To better understand the conservation of *Try*PRAC motifs and residues essential for enzyme activity, codon selection was investigated. The results shows 40 negatively selected codons, 6 of which were relevant to PRAC activity in *T. cruzi* and *T. vivax* (Chamond et al., 2003), although no positively selected codon was found. The discovery in this study of several highly conserved residues under negative selection suggested that other residues besides those reported for *Tc*PRAC and *Tv*PRAC can be important for PRAC activity in trypanosomes.

Conclusions

T. cruzi and *T. vivax* PRAC enzymes are potent host B-cell mitogens that delay specific immune defenses through the generation of non-specific B-cell proliferation, masking the effective response and allowing parasite evasion of host defenses. These enzymes have also been linked to metabolism and disease progression. In this study, besides the known PRAC homologs of the pathogenic *T. cruzi* and *T. vivax*, we identified *Try*PRAC homologs in the genomes of 11 trypanosome species of mammals, reptiles (snake and crocodile) and anurans. *Try*PRAC homologs were identified in both species generalists and human-infective and species showing high vertebrate host restriction, as well as pathogens and non-pathogens, with different life cycles in vertebrate hosts and vectors. *T. brucei* ssp., *T. evansi*, *T. congolense* were the only species with available genomes that lost PRAC genes. An understanding of the diversity and evolutionary history of genes encoding PRAC enzymes in a range of distant and closely related trypanosome species can help understanding of the potential role of PRAC enzymes in vector and vertebrate host-parasite interactions, parasite

Figure 7. Synteny analysis showing the genomic organization of homologous genes arranged in the same order on *TryPRAC* loci in the genomes of trypanosomes showing the lack of PRAC homologs in *T. congolense*, *T. b. brucei* and *T. evansi*. Partially syntenic genomic segment in the genome of *Leishmania major* exhibiting two genes (Tub family and Enolase) absent in this loci of trypanosome genomes

evasion of the host defences and the evolution of virulence and pathogenicity within *Trypanosoma*.

The phylogenetic tree inferred using *TryPRAC* homologs is congruent with the recognized relationships within *Trypanosoma*, with genes sharing a common origin that evolved to become species- and genotype-specific. Due to the presence of a PRAC homolog in an anuran trypanosome, which is basal in the phylogeny of this genus, and the absence of PRAC in other trypanosomatids, bodonids and euglenids, together with the high synteny of PRAC loci, we hypothesized that a common ancestor of *Trypanosoma* gained the prokaryotic gene through a single and ancient horizontal gene transfer from a bacterium. Our comprehensive analysis of prokaryotic and eukaryotic PRAC-like family revealed that *TryPRACs* genes are closely related to the PRAC sequence from *Gemella* spp. (Firmicutes: Bacilli).

Our findings demonstrated that *TryPRAC* homologs are ubiquitous in genus *Trypanosoma*, with all species possessing a single copy per haploid genome in a highly syntenic locus. Polymorphisms on *TcPRAC* genes are valuable for genotyping *T. cruzi* and identifying hybrid

isolates. All putative *TryPRACs* can be expressed as functional racemases, excepting *T. rangeli*, which have only pseudogenes; however, these genes evolved in parallel with lineages with this species as shown for *T. cruzi* DTUs. The results revealed at least one new putative PRAC homolog for each new species of trypanosome included in this study. However, further analyses are required to evaluate the expression of PRAC proteins, enzymatic activity and any involvement of new putative *TryPRAC* enzymes in the life cycles, infection strategies, and mechanisms of pathogenicity, virulence and host immune evasion of the various trypanosome species.

References

- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC. African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends Parasitol.* 2010, 26:324-8.
- Alves JM, Serrano MG, Maia da Silva F, Voegtly LJ, Matveyev AV, Teixeira MM, Camargo EP, Buck GA. Genome evolution and phylogenomic analysis of *Candidatus Kinetoplastibacterium*, the betaproteobacterial endosymbionts of *Strigomonas* and *Angomonas*. *Genome Biol Evol.* 2013, 5:338-50.
- Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas disease in Venezuela--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004, 9:781-7.

- Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*. 2005; 77:397-404.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MMG, Camargo EP. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*. 2013; 164:129-52.
- 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; 31:1218-26.
- Bryan MA, Norris KA. Genetic immunization converts the trypanosoma cruzi B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen. *Infect Immun*. 2010; 78:810-22.
- Bryant D, Moulton V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol*. 2004; 21:255-65.
- Buschiazzo A, Goytia M, Schaeffer F, Degraive W, Shepard W, Grégoire C, Chamond N, Cosson A, Berneman A, Coatnoan N, Alzari PM, Minoprio P. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:1705-10.
- Cardinale GJ, Abeles RH. Purification and mechanism of action of proline racemase. *Biochemistry*. 1968; 7:3970-8.
- Castresana, J.. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 2000; 17, 540-552.
- Cavazzana M Jr, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MMG. 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; 40:345-55.
- Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Minoprio P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a *Trypanosoma vivax* proline racemase. *Mol Biochem Parasitol*. 2009; 165:170-9.
- Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degraive WM, Minoprio P. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*. 2005; 58:46-60.
- Chamond N, Grégoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, Degraive WM, Minoprio P. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem*. 2003; 278:15484-94.
- Coatnoan N, Berneman A, Chamond N, Minoprio P. Proline racemases: insights into *Trypanosoma cruzi* peptides containing D-proline. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:295-300.
- Conti P, Tamborini L, Pinto A, Blondel A, Minoprio P, Mozzarelli A, De Micheli C. Drug discovery targeting amino acid racemases. *Chem Rev*. 2011; 111: 6919-46.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Añez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MM. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitol*. 2006; 133:159-69.
- Coutinho L, Ferreira MA, Cosson A, Batista MM, Batista Dda G, Minoprio P, Degraive WM, Berneman A, Soeiro Mde N. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:1055-62.
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodruigero M, Cardinal MV, Kjos S, Gurgel-Gonçalves R, Blanchet D, De Pablos LM, Tomasini N, da Silva A, Russomando G, Cuba CA, Aznar C, Abate T, Levin MJ, Osuna A, Gürtler RE, Diosque P, Solari A, Triana-Chávez O, Schijman AG. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol*. 2010; 40:1599-607.
- da Costa CT, Porter C, Parry K, Morris A, Quoraishi AH. Empyema thoracis and lung abscess due to *Gemella morbillorum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15:75-7.
- D'Archivio S, Cosson A, Medina M, Lang T, Minoprio P, Goyard S. Non-invasive in vivo study of the *Trypanosoma vivax* infectious process consolidates the brain commitment in late infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(1):e1976.
- Deane LM, Deane MP, Lourenço-de-Oliveira R. Are Asian monkeys the original mammalian hosts of *Trypanosoma conorhini*? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1986; 81:127-9.
- Deane MP, Deane LM. Studies on the life cycle of *Trypanosoma conorhini*. "In vitro" development and multiplication of the bloodstream trypanosomes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1961; 3:149-60.
- Desowitz RS. The development and survival of the bloodstream forms of *Trypanosoma conorhini* in culture. *J Protozool*. 1963; 10:390-1.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32:1792-7.
- Fermio BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CS, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MM. 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; 6:313.
- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MMG. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Eukaryot Microbiol*. 2008; 55:427-35.
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Butler G. Evidence of recent interkingdom horizontal gene transfer between bacteria and *Candida parapsilosis*. *BMC Evol Biol*. 2008; 8:181.
- Flores-López CA, Machado CA. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi*

- lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, 5(8):e1272.
- Galen BT, Banach DB, Gitman MR, Trow TK. Meningoencephalitis due to *Gemella haemolysans*. *J Med Microbiol*. 2014, 63:138-9.
- Goytia M, Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Hermant D, Berneman A, Minoprio P. Molecular and structural discrimination of proline racemase and hydroxyproline-2-epimerase from nosocomial and bacterial pathogens. *PLoS One*. 2007, 2(9):e885.
- 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, 44:15-25.
- Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends Parasitol*. 2012, 28:136-41.
- Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. In: A zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972. 500p.
- Huang J, Mullanpudi N, Lancto CA, Scott M., Abrahamsen MS and Kissinger JC. Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. 2004, *Genome Biology*, 5:R88
- Hung WC, Tseng SP, Chen HJ, Tsai JC, Chang CH, Lee TF, Hsueh PR, Teng LJ. Use of groESL as a target for identification of *Abiotrophia*, *Granulicatella*, and *Gemella* species. *J Clin Microbiol*. 2010, 48:3532-8.
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006, 23:254-67.
- Huson DH, Scornavacca C, Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks, *Systematic Biology* (2012).
- Jan O Andersson JO, Hirt RP, Foster PG, Roger AJ. Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: influx of genes into protist genomes. *BMC Evolutionary Biology* 2006, 6:27
- Keeling PJ, Palmer JD. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* 2008, 9: 605-618.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007, 23:2947-8.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, 5(10):e1363.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg*. 2009, 81:1041-9.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG. *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, Alfieri SC, Buck GA, Teixeira MMG. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38385.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Teixeira MMG. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist*. 2012, 163:856-72.
- Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, Vargas J, Torrico F, Miles MA, Gaunt MW. *Trypanosoma cruzi* Ilc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009,3(9):e510.
- Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, Torrico F, Diosque P, Valente V, Valente SA, Gaunt MW. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog*. 2009, 5(5):e1000410.
- Lukeš J, Skalický T, Týč J, Votýpka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol*. 2014, *in press*.
- Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 2009, 4(2):e4534.
- Maia Da Silva F, Junqueira AC, Campaner M, Rodrigues AC, Crisante G, Ramirez LE, Caballero ZC, Monteiro FA, Coura JR, Añez N, Teixeira MMG. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Mol Ecol*. 2007, 16:3361-73.
- Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, Paiva F, Nunes VL, Camargo EP, Teixeira MMG. *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, 109:199-207
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, Coura JR, Takeda GF, Shaw JJ, Teixeira MMG. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and aspecies-specific marker. *Parasitol*. 2004, 128:283-94.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VL, Teixeira MMG. 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. *Parasitol*. 2009, 136:641-55.
- Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, Souza AI, da Rosa JA, Campaner M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Teixeira MMG. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi*

- TCIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 2009, 9: 1265-74.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MMG. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol.* 2009, 39:615-23.
- Martins LP, Marcili A, Castanho RE, Therezo AL, de Oliveira JC, Suzuki RB, Teixeira MMG, da Rosa JA, Sperança MA. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. *Am J Trop Med Hyg.* 2008, 79:427-34.
- Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun.* 2009, 77:3023-32.
- Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V, Lukeš J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol.* 2013, 29:43-52.
- Minoprio P. Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol.* 2001, 31:588-91.
- Monteiro WM, Margioto Teston AP, Gruendling AP, dos Reis D, Gomes ML, de Araújo SM, Bahia MT, Magalhães LK, de Oliveira Guerra JA, Silveira H, Toledo MJ, Vale Barbosa Md. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, 7(2):e2069.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004, 54:1861-75.
- Ocaña-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010, 4(12):e915.
- Opperdoes FR, Michels PA. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. *Trends Parasitol.* 2007, 23:470-6.
- Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, Alfieri SC, Teixeira MMG. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Trop.* 2009, 112:249-59.
- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 2012, 12:1328-32.
- Pombert JF, Selmanb M, Burkia F, Bardella FT, Farinell L, Solterd LF, Whitmane DW, Weissf LM, Corradib N, Keeling PJ. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. 2012, PNAS, 109: 12638-12643
- Pond SL, Frost SD, Muse SV. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics.* 2005, 21:676-9.
- Ragone PG, Pérez Brandán C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Tomasini N, Cimino RO, Romero NM, Portelli M, Nasser JR, Basombrio MA, Diosque P. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. *Acta Trop.* 2012, 123:196-201.
- Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá Z, Guhl F. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Exp Parasitol.* 2012, 132:487-94.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010, 4(11):e899.
- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, Guhl F. Trypanosome species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol.* 2014, 22:250-6.
- Reina-San-Martín B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, Arala-Chaves M, Coutinho A, Minoprio P. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000, 6:890-7.
- Samudio F, Ortega-Barria E, Saldaña A, Calzada J. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I among Panamanian sylvatic isolates. *Acta Trop.* 2007, 101:178-81.
- Sara E Hester SE, Jihye Park J, Laura L Goodfield LL, Heather A Feaga HA, Preston A, Harvill ET. Horizontally acquired divergent O-antigen contributes to escape from cross-immunity in the classical bordetellae. *BMC Evolutionary Biology* 2013, 13:209
- Sayé M, Miranda MR, di Girolamo F, de los Milagros Cámara M, Pereira CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. *PLoS One.* 2014, 9(3):e92028.
- Segovia M, Carrasco HJ, Martínez CE, Messenger LA, Nessi A, Londoño JC, Espinosa R, Martínez C, Alfredo M, Bonfante-Cabarcas R, Lewis MD, de Noya BA, Miles MA, Llewellyn MS. Molecular epidemiologic source tracking of orally transmitted Chagas disease, Venezuela. *Emerg Infect Dis.* 2013, 19:1098-101.
- Silva DC, Silva RC, Ferreira RC, Briones MR. Examining marginal sequence similarities between bacterial type III secretion system components and *Trypanosoma cruzi* surface proteins: horizontal gene transfer or convergent evolution? *Front Genet.* 2013, 4:143.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006, 22:168-74.
- Spera JM, Herrmann CK, Roset MS, Comerchi DJ, Ugalde JE. A *Brucella* virulence factor targets macrophages to trigger B-cell proliferation. *J Biol Chem.* 2013, 288:20208-16.
- Spera JM, Ugalde JE, Mucci J, Comerchi DJ, Ugalde RA. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103:16514-9.

- Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006, 22:2688-90.
- Swofford, D.L. 2002. *PAUP**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson RJ, Bouwer HG, Portnoy DA, Frankel FR. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth. *Infect Immun*. 1998, 66:3552-61
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop*. 2009, 110:137-47.
- Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomalglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *J Eukaryot Microbiol*. 2009, 56:594-602.
- Visser WF, Verhoeven-Duif NM, de Koning TJ. Identification of a human trans-3-hydroxy-L-proline dehydratase, the first characterized member of a novel family of proline racemase-like enzymes. *J Biol Chem*. 2012, 287:21654-62.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005, 171:527-43.
- Wijayawardena BK, Minchella DJ, DeWoody JA. Hosts, parasites, and horizontal gene transfer. *Trends Parasitol*. 2013, 29:329-38.
- Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011, 5(6):e1049.
- Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ Microbiol*. 2013, 15:2631-41.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012, 12:240-53