

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

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.

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*, *Blechromonas*, *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 descobertos baseado em estudos filogenéticos: *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 tsetse (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 tsetse 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; Papparini 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 metaciclo genese (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 pictipes* 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 cimicídeos) 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 tripanosomas 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 tripanosomas 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 (triplanossomas 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 (*Crocodylus niloticus*), transmitidos por tsé-tsé, como espécie de referência. Na África, *Crocodylus niloticus*, *Crocodylus 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).

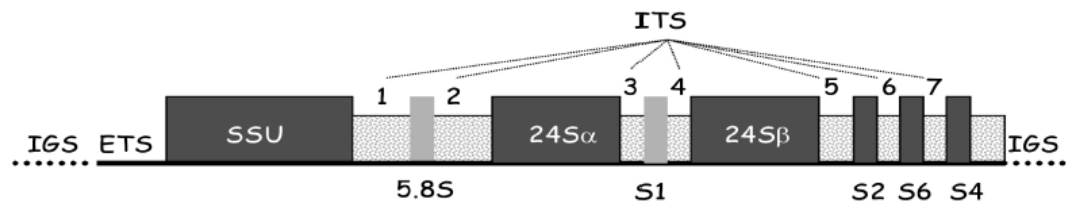


Figura 1. Representação esquemática do cistron ribossômico de rRNAs precursores de tripanossomatídeos.

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.

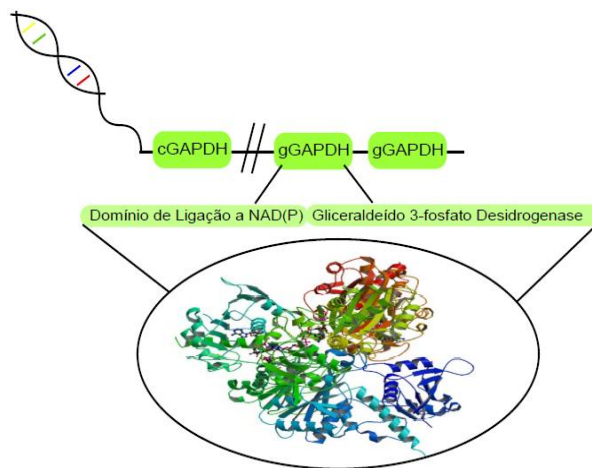


Figura 2. Representação esquemática dos genes GAPDH e modelo estrutural de sua proteína.

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; Opperdoes, 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 (Buschiazzo 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] LEPRGHDDM ^{GA} FLFDPIEEGADLGMVFMDTGGYLNN ^{GHNS} IAAV	[139...265]	NTVDS ^{VEI} YGPPTNPEANY--KNVVI ^{FGNRQADRSP} CGTGS ^{AKM} ATLYAKGQLRIG	[321...393]	
TcPRACB	[1...53] LEPRGHDDM ^{GA} FLFDPIEEGADLGVFMMDTGGYLNN ^{GHNS} IAAV	[100...226]	NTVDS ^{VEI} YGNATNPEAKY--KNVVI ^{FGNRQADRSP} CGTGS ^{AKM} ATLYAKGQLRIG	[282...354]	
<i>C. difficile</i>	[1...53] LEPRGHDDM ^{GS} VMTQPCCPDADFGIIFMDGGGYLNN ^{GHGT} IGAM	[100...221]	KTVD ^{VEI} YDEP TH FEATY--KNVVI ^{FGQGVDRSP} CGTGS ^{AKLA} TLIAKGLKVG	[277...335]	
<i>C. sticklandii</i>	[1...20] HEPRGHDDM ^{GS} IITSNNKEADFGIIFMDGGGYLNN ^{GHGS} IGAA	[67...188]	KTVD ^{VEI} YDEP ^{SN} FEATY--KNVVI ^{FGQGVDRSP} CGTGS ^{AKLA} TLIAKGLKID	[244...299]	
<i>B. abortus</i>	[1...52] FEPRGHDDM ^{GS} ILYPTFRFDCDVAVLF ^{IETS} GCLP ^M GHGTIGTV	[99...219]	NRLS ^H ILWTGKPKHFQAH--RNAVFYGDKA ^{DRSP} CGTGS ^{AKM} QLA ^{AKG} KLKPC	[274...333]	
<i>B. suis</i>	[1...52] FEPRGHDDM ^{GS} ILYPTFRFDCDVAVLF ^{IETS} GCLP ^M GHGTIGTV	[99...219]	NRLS ^H ILWTGKPKHFQAH--RNAVFYGDKA ^{DRSP} CGTGS ^{AKM} QLA ^{AKG} KLKPC	[274...333]	
<i>B. melitensis</i>	[1...52] FEPRGHDDM ^{GS} ILYPTFRFDCDVAVLF ^{IETS} GCLP ^M GHGTIGTV	[99...219]	NRLS ^H ILWTGKPKHFQAH--RNAVFYGDKA ^{DRSP} CGTGS ^{AKM} QLA ^{AKG} KLKPC	[274...333]	
<i>B. pseudomallei</i>	[1...50] LEPRGSDVLM ^{GALL} CEPVSAAGAAVGF ^{IFN} NAGYLM ^{GHGT} IGLV	[97...205]	APID ^H IELFAD--DPEYDS--RSFVLC ^{PGHAYDRSP} CGTGS ^{AKLA} CLADGKLAAG	[257...310]	
<i>F. putida</i>	[1...50] LEPRGSDVLM ^{GALY} CEPVSAADATCGV ^{IFN} NAGYLM ^{GHGT} IGLV	[97...205]	APID ^H VELFAD--DFNADS--RNFVLC ^{PGKAYDRSP} CGTGS ^{AKLA} CLADGTLAEG	[257...308]	
<i>F. fluorescens</i>	[1...50] LEPRGSDVLM ^{GALY} CEPVSPDATCGV ^{IFN} NAGYLM ^{GHGT} IGLV	[97...205]	ALID ^H IELFAD--DAEADS--RNFVLC ^{PGKAYDRSP} CGTGS ^{AKLA} CLADGKLAEP	[257...308]	
<i>F. aeruginosa</i>	[1...50] LEPRGSDVLM ^{GALL} CAPVDPEACAGV ^{IFN} NSGYLM ^{GHGT} IGLV	[97...205]	GAID ^H IELFAD--DPHADS--RNFVLC ^{PGKAYDRSP} CGTGS ^{AKLA} CLADGKLLPG	[257...314]	
<i>F. aeruginosa</i> SC	[1...52] NEPRGCVFRHANLLV ^{PAK} DFRAGMGWII ^{NE} PAITFP ^{FGS} GNLSLVA	[99...220]	DHLS ^{FC} QLA ^{APP} ERDRDVL ^{GANN} AVVIR ^{PGK} DRSP ^{CGTGS} AKM ^{QLA} AKGQLRVG	[278...344]	
<i>B. anthracis</i> 1	[1...53] NEPRGHDDV ^{GA} LLEDFCHFDADIGV ^{IETS} GCLP ^M GHGTIGVC	[100...220]	RGLS ^{VEI} YTFD TH ESAVV--KNVVI ^{FGQGVDRSP} CGTGS ^{AKM} ATLYAKGLEMM	[275...345]	
<i>B. anthracis</i> 2	[1...53] YEPRGHGHMYGCIIT ^{TP} PASAHADFGV ^{IFN} HNEGVS ^{DR} SHGII ^{IAVI}	[100...217]	KGIYGV ^{IF} SDD ^{FG} EGATL--RNVYI ^{FAD} GGV ^{DRSP} CGTGS ^{AKM} ATLYAKGILLQK	[272...331]	
<i>B. cenocepacia</i> CT	[1...53] FEPRGHADMYGGV ^L TEPVSPNADFGV ^{IFN} HNEGVS ^{DR} SHGV ^{IALS}	[100...221]	NHIYGT ^{II} ANAF ^{RH} AGTQ--ANCCV ^{FAD} REVDR ^{SP} FG ^{SGT} TGGRV ^{AG} IQGILL ^{LAAG}	[276...335]	
<i>V. parahaemolyticus</i>	[1...52] FEPRGHSM ^{GS} VVLPCCSDNADAS ^I LFIETS ^{GCLP} MGHGTIGTV	[99...219]	CGVS ^V LW ^{TG} KPTQEGATA--RNAVFYGDKA ^{DRSP} CGTGS ^{AKM} QLA ^{AKG} KLKSG	[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 (Buschiazzo 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 (Buschiazzo 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).

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 *Try*PRAC 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 sintenia 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 *Try*PRAC são proximamente relacionados às sequências PRAC de *Gemella* spp. (Firmicutes: Bacilli).

Nossas análises demonstraram que homólogos *Try*PRAC 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 varias 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 conorrhini*? *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, Holzmuller 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, Ramirez 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 desterrensis* sp. n., isolated from South American bats. *Parasitology.* 2003;127(Pt 3):265-71.

Guhl F, Ramirez 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, Opperdoes 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, Kluczkovski A, Jr., Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansen AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*. 2006;133(Pt 5):603-11.
- Lisboa CV, 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 TCIIa 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, Povoá 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.
- Mkwanzani 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, Gruending 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 Gracas 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, Jittapalpong 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, Demette 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.

Thekiso 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 trypanosomiasis 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, Whittam TS, 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, Suková 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.