

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO  
DA NATUREZA

**Mylena Barros de Lima**

**A história evolutiva de *Trypanosoma*: elucidando as relações filogenéticas do grupo  
por meio de distintos métodos e marcadores**

Juiz de Fora

2022

**Mylena Barros de Lima**

**A história evolutiva de *Trypanosoma*: elucidando as relações filogenéticas do grupo  
por meio de distintos métodos e marcadores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de Concentração: Taxonomia, Sistemática e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Fonseca Rossi

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Barros de Lima, Mylena.

A história evolutiva de Trypanosoma: elucidando as relações filogenéticas do grupo por meio de distintos métodos e marcadores / Mylena Barros de Lima. -- 2022.

98 p.

Orientadora: Mariana Fonseca Rossi

Coorientador: Roberto Júnio Pedroso Dias

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2022.

1. Trypanosoma. 2. Sequência-estrutura. 3. SSU 18S rDNA. 4. gGAPDH. 5. Evolução. I. Fonseca Rossi, Mariana, orient. II. Júnio Pedroso Dias, Roberto, coorient. III. Título.

**Mylena Barros de Lima**

**A história evolutiva de *Trypanosoma*: elucidando as relações filogenéticas do grupo por meio de distintos métodos e marcadores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Taxonomia, Sistemática e Evolução.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Mariana Fonseca Rossi** - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias** - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Maristela Peckle Peixoto**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

**Profa. Dra. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula**

Juiz de Fora, 03/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Fonseca Rossi, Professor(a)**, em 24/02/2022, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARISTELA PECKLE PEIXOTO, Usuário Externo**, em 24/02/2022, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Junio Pedroso Dias, Professor(a)**, em 24/02/2022, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sthefane Davila de Oliveira e Paula, Professor(a)**, em 24/02/2022, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0667469** e o código CRC **8D8AC368**.

Dedico este trabalho para a minha família, em especial meus pais e avós.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me deu, dia após dia, a vontade de continuar e fazer o meu trabalho da melhor forma possível, frente a tantos desafios pessoais. Sem ele, tenho certeza de que tal trabalho não seria possível.

Agradeço também a toda a minha família, em especial meus pais, Adriana Cerqueira Barros de Lima e Mário Cesar Martins de Lima, e às minhas avós Maria do Carmo Cerqueira Barros e Luzia Martins de Lima. Eles me deram força, conselhos e acreditaram em mim, sabendo que em algum momento eu iria perseverar.

Agradeço também aos meus orientadores, Mariana Fonseca Rossi e Roberto Júnio Pedroso Dias, pela ajuda no desenvolvimento de todo o trabalho, palavras de consolo, pela compreensão e paciência diante das minhas falhas, mas acima de tudo, por acreditarem no meu potencial.

Também sou extremamente grata à Alyssa Rossi Borges, com a qual tive grande crescimento nos âmbitos profissional e pessoal. Todas as conversas que tivemos, mesmo de forma online, foram enriquecedoras e inspiradoras, me motivando a continuar melhorando o trabalho.

Também gostaria de agradecer ao professor Mattias Wolf, da Universidade de Wurzburg, Alemanha, que prontamente nos guiou e auxiliou em determinadas partes do desenvolvimento do presente trabalho.

Devo também agradecer à minha banca de Qualificação e Defesa, Bruno Fermino, professora Sthefane D'ávila e professora Maristela Peckle, por terem aceitado em trazer contribuições tão importantes para o melhoramento de meu trabalho.

Sou grata aos amigos que fiz durante o percurso, como a equipe LabProto, que prontamente estavam disponíveis sempre que precisei, seja qual fosse o motivo, mas também àqueles que já estavam presentes em minha vida e reafirmaram a sua bondade e gentileza comigo, Sueli, Pedro, Wellington, Laís Soranço, Lívia Maria e Carolina Brandi. O apoio e leveza frente as situações da vida foi imprescindível durante esta jornada.

Gostaria de agradecer à Andressa, Laís Rossi, Fernanda e Alex por mais uma vez estarem do meu lado, torcendo e me apoiando para que eu não desanimasse diante da rotina exaustiva pela qual passamos.

Muito obrigada a todos que tiveram alguma contribuição para a realização do presente Mestrado. Por fim, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, e à agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por ter cedido e possibilitado este trabalho.



“Em algum lugar, algo incrível está esperando  
para ser descoberto.”(Carl Sagan)

## RESUMO

O presente estudo possui como objetivo aplicar uma metodologia de análise de sequência-estrutura, para estimar a árvore evolutiva do gênero de parasitos flagelados *Trypanosoma*, e realizar a comparação entre métodos de inferência já utilizados pela literatura, como a análise concatenada entre a sub-região V7V8 do marcador molecular SSU 18S rDNA e o gene gGAPDH, além da análise somente com o gene SSU 18S rDNA. Através das análises comparativas, pôde-se perceber que os resultados estão de acordo com as informações prévias geradas pelas análises baseadas em dados com o gene 18S rDNA, corroborando teorias evolutivas e a ordem geral de ramificação das topologias. Assim, a análise de sequência-estrutura possibilitou acessar relações filogenéticas profundas entre as espécies de tripanossomas. A nova metodologia de sequência-estrutura conseguiu acessar todos os subgêneros conhecidos até então utilizando um único marcador molecular (SSU 18S rDNA) com máximo valor de suporte. Além disso, os resultados da análise de sequência-estrutura foram mais robustos do que as demais análises, mais sensíveis a artefatos deixados por táxons Rogue (*id.est. incertae sedis*) e a espécies ligadas ao efeito de atração de ramos. Saber qual foi a real história evolutiva destes parasitos é uma incógnita, mas a utilização de ferramentas que ofereçam maior poder de resolução para as relações filogenéticas pode ser uma saída. Desse modo, o presente estudo indica uma ferramenta altamente eficiente para análises filogenéticas de *Trypanosoma*. Ademais, a utilização de metodologias que permitem análises profundas do agrupamento, exigindo menos marcadores moleculares, são de extrema importância.

**Palavras-chave:** Árvore filogenética; Sequência-estrutura; SSU 18S rDNA; gGAPDH; Evolução.

## ABSTRACT

The present study aims to apply a methodology of sequence-structure analysis to estimate the evolutionary tree of the genus of flagellate parasites *Trypanosoma*, and to compare inference methods already used in the literature, such as the concatenated analysis between the V7V8 subregion of the SSU 18S rDNA molecular marker and the gGAPDH gene, and the analysis only with the SSU 18S rDNA gene. Through the comparative analyses, it could be seen that the results are in agreement with the previous information generated by the analyses based on data with the 18S rDNA gene, corroborating evolutionary theories and the general branching order of the topologies. Thus, sequence-structure analysis made it possible to access deep phylogenetic relationships among trypanosome species. The new sequence-structure methodology was able to access all previously known subgenera using a single molecular marker (SSU 18S rDNA) with maximum support value. Furthermore, the results of the sequence-structure analysis were more robust than the other analyses, more sensitive to artifacts left by Rogue taxa (*id.est. incertae sedis*) and to species linked to branch attraction effect. Knowing what the real evolutionary history of these parasites was is an unknown, but the use of tools that offer greater resolving power for phylogenetic relationships may be a way out. Thus, the present study indicates a highly efficient tool for phylogenetic analysis of *Trypanosoma*. Furthermore, the use of methodologies that allow deep grouping analyses, requiring fewer molecular markers, are of extreme importance.

**Keywords:** Phylogenetic tree. Sequence-structure. SSU 18S rDNA. gGAPDH. Evolution.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo Único

- Figura 1 – Concatenate phylogeny of gGAPDH and V7V8 18S rDNA obtained by Maximum Likelihood with bootstrap values of 150 pseudo-replicates. The tree is rooted at non-Trypanosoma trypanosomatids. The classification by clades, as explained in Hamilton and Stevens (2017), as well as the new classification by subgenera (subg.), of Kostygov et al. (2021), are depicted. The scale bar indicates evolutionary distances.....85
- Figura 2 – 18S rDNA sequence-structure tree obtained by Maximum Likelihood with the same taxon sampling of Fig. 1. Bootstrap values from 100 pseudo-replicates are mapped at the appropriate internodes. The scale bar indicates evolutionary distances. The tree is rooted at non-Trypanosoma trypanosomatids using the same species of Fig. 1. The classification by subgenera (subg.), of Kostygov et al. (2021), is depicted.....86
- Figura 3 – Comparison between 18S rDNA tree topologies. (A) Consensus tree of the sequence-structure method (A) is presented side-by-side with the tree generated based only on long sequences (> 1500 bp) of the same gene (B). Both trees were generated from the same taxon sampling and rooted by non-Trypanosoma trypanosomatids. Trees were estimated by Maximum Likelihood using 100 and 800 pseudo-replicates, respectively. The scale bar indicates evolutionary distances. The classification by subgenera, of Kostygov et al. (2021), is depicted. Subgenera that do not show differences in the inter-specific relationships were collapsed.....88

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo Único

- Tabela 1 – Primers utilizados para a extração via PCR in silico da região V7V8 das sequências de tripanossomas e grupo externo. (\*) Primer reverso distinto utilizado apenas no caso da reação in silico de *Trypanosoma brucei brucei*.....91
- Tabela 2 – Compilado das sequências utilizadas de tripanossomas, seus respectivos hospedeiros, localização geográfica e referência bibliográfica .....92

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
1.1	Família Trypanosomatidae e aspectos gerais .....	13
1.2	Histórico Taxonômico do gênero <i>Trypanosoma</i> .....	16
1.3	A história evolutiva de <i>Trypanosoma</i> .....	19
1.3.1	Gênero <i>Trypanosoma</i> .....	19
1.3.2	Subgêneros atualmente conhecidos de <i>Trypanosoma</i> segundo a classificação de Kostygov et al., (2021).....	20
1.3.2.1	Subgêneros <i>Haematomonas</i> e <i>Trypanosoma</i> .....	22
1.3.2.2	Subgêneros <i>Duttonella</i> , <i>Nannomonas</i> , <i>Trypanozoon</i> e <i>Pycnomonas</i> .....	23
1.3.2.3	Subgênero <i>Squamatripanum</i> .....	24
1.3.2.4	Subgênero <i>Crocotrypanum</i> + <i>Trypanosoma terrestris</i> .....	25
1.3.2.5	Subgênero <i>Australotrypanum</i> + <i>Trypanosoma pestanai</i> .....	25
1.3.2.6	Subgêneros <i>Trypanomorpha</i> e <i>Avitrypanum</i> .....	26
1.3.2.7	Subgêneros <i>Ornithotrypanum</i> + <i>Trypanosoma irwini</i> .....	27
1.3.2.8	Subgênero <i>Megatrypanum</i> .....	28
1.3.2.9	<i>Schizotrypanum</i> , <i>Aneza</i> , potenciais subclados <i>T. livingstonei</i> e <i>T. wauwau</i> , e <i>Herpetosoma</i> .....	28
1.4	Técnicas moleculares e estudos filogenéticos para os representantes do gênero <i>Trypanosoma</i> .....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
2.1	Objetivos específicos.....	34
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
	<b>CAPÍTULO ÚNICO.....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>89</b>
	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Família Trypanosomatidae e aspectos gerais

O Filo Euglenozoa é um amplo agrupamento que compreende microeucariotos flagelados euglenídeos, diplomatóideos e cinetoplastídeos (CAVALIER-SMITH, 1981). Dentre estes, está localizada a classe Kinetoplastea (CAVALIER-SMITH, 1981), definida pela presença de uma organela facilmente identificável e característica destes seres vivos, denominada cinetoplasto, que contém DNA mitocondrial (kDNA) (ADL et al., 2012; VICKERMAN et al., 1976).

Os trabalhos realizados por Vickerman (1990) e Vickerman (2000) trouxeram a definição das possíveis distribuições que o kDNA pode apresentar, conceitos posteriormente resgatados por Moreira, Garcia & Vickerman (2004) e D'Ávila-Levy et al., (2015). De acordo com os mesmos, o kDNA presente nesta classe de flagelados, morfologicamente pode se apresentar em três estados: Eucinetoplasto, Policinetoplasto e Pancinetoplasto. O Eucinetoplasto se refere a massa de kDNA que se encontra compactada e inserida próximo a bolsa flagelar. Já o Policinetoplasto é quando o kDNA se encontra disperso pelo lúmen mitocondrial e agrupado em algumas regiões. E o Pancinetoplasto se refere ao material mitocondrial disperso de forma desigual, como uma massa difusa (D'ÁVILA-LEVY et al., 2015). Diversos membros da classe Kinetoplastea apresentam o kDNA organizado sob diferentes maneiras, demonstrando variação quanto ao grau de concatenação desse material genético (LUKES et al., 2002). Uma das organizações mais conhecidas do DNA mitocondrial, é na forma de uma densa estrutura de rede concatenada, constituída por moléculas dupla-fita e circulares de DNA, os maxicírculos e minicírculos (BREGLIA et al., 2007; LUKES et al., 2002). Os maxicírculos estão encarregados de codificar RNAs ribossomais e proteínas para a produção de energia pela mitocôndria (SIMPSON, 1987), enquanto os minicírculos contém regiões conservadas de RNAs-guia, que irão auxiliar na edição pós-transcricional

dos kDNA localizados no maxicírculo, através da inserção ou deleção de Uridinas em locais específicos dos transcritos (LUKES et al., 2002; VALLEJO, 1998).

Atualmente, os cinetoplastídeos são divididos em duas principais subclasses, baseado em dados filogenéticos: Prokinetoplastina, contendo apenas uma ordem (Prokinetoplastida) e Metakinetoplastina, que se divide em 4 ordens: Eubodonida, Neobodonida, Parabodonida e Trypanosomatida (MOREIRA et al., 2004; KOSTYGOV et al., 2021). Essa última ordem mencionada contém apenas uma família (Trypanosomatidae Doflein, 1901), reunindo espécies de endoparasitos obrigatórios que podem infectar todas as classes de vertebrados, como peixes, anuros, répteis, aves e mamíferos, o que revela o seu sucesso evolutivo (FERMINO et al., 2019; HAMILTON et al., 2009; LEMOS et al., 2015; STEVENS et al., 2001; SPODAREVA et al., 2018; THOMPSON & THOMPSON, 2015; VIOLA et al., 2009).

A família Trypanosomatidae compreende um grupo diverso e importante de protozoários, que podem ser subdivididos em dois grandes grupos baseado no ciclo de vida: dixênicos ou monoxênicos (STEVENS et al., 2001). A maioria dos que possuem o ciclo de vida monoxênico são restritos a um único hospedeiro, geralmente invertebrados (VOTÝPKA et al., 2015). Entretanto, devemos também salientar que existem àqueles que mesmo monoxênicos, foram encontrados em vertebrados, como *Trypanosoma evansi* Ziemann, 1905 e *Trypanosoma equiperdum* Doflein, 1901 (LAI et al., 2008), além do gênero monoxênico recém estabelecido *Porcisia*, cujo foi encontrado parasitando hospedeiros vertebrados (HERRER, 1971; LAINSON & SHAW, 1977). Já os que possuem o ciclo de vida dixênico são transmitidos por algumas ordens de insetos, incluindo os parasitos do gênero *Phytomonas* para plantas (DOLLET, 1984), ou parasitos do gênero *Trypanosoma* a vertebrados, tal como *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 e *Trypanosoma brucei* Plimmer & Bradford, 1899, tendo portanto, dois hospedeiros envolvidos em seu ciclos de vida (LUKES et al., 2018). Durante o seu ciclo de vida, esses parasitos assumem distintas formas evolutivas, de modo a se ajustar ao microambiente ao qual estão expostos. As principais formas que podem ser encontradas no gênero *Trypanosoma* são: amastigota, epimastigota, tripomastigota (MASLOV et al., 2013). Ademais, essa família alberga dois importantes gêneros com grande importância médica, como o gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843, e *Leishmania* Ross, 1903.

É de se destacar o gênero *Trypanosoma*, contendo parasitos que apresentam majoritariamente o ciclo de vida dixênico, mas que também inclui espécies monoxênicas



que foram encontradas em vertebrados, como mencionado anteriormente, e que são facilmente reconhecidos pela forma tripomastigota sanguínea típica, durante o parasitismo em vertebrados (HAMILTON et al., 2004).

O presente gênero de parasitos possui uma enorme diversidade, contendo aproximadamente 500 espécies de parasitos, o que representa mais de 60% de todas as espécies conhecidas até então da família Trypanosomatidae (KOSTYGOV et al., 2021). Algumas das espécies contempladas são de grande relevância para a saúde e economia, como *T. cruzi* causador da doença de Chagas nas Américas (CHAGAS, 1909), e *T. brucei* responsável pela doença do sono e nagana na África. Ademais, podemos citar *Trypanosoma lewisi* Kent, 1880, parasito de ratos que acompanharam a dispersão humana, cuja está esporadicamente associada a infecções em seres humanos, e já é tratada como uma zoonose emergente (CLÉMENT et al., 2019; JANSEN et al., 2020; SCHUSTER et al., 2021; WANG et al., 2021). Por ser dado esse carácter epidemiológico às infecções causadas por *T. lewisi*, a saúde da população está diretamente ligada a saúde dos animais e o ambiente compartilhado, como é preconizado pela abordagem One Health (AUSTEN & BARBOSA, 2021).

Cada espécie de parasito pode apresentar ainda distintos vetores, como sanguessugas, dípteros, hemípteros, pulgas e carrapatos (AUSTEN et al., 2011; GARCIA et al., 2020; HAMILTON et al., 2005; PAPANINI et al., 2014; SGROI et al., 2021). Contudo, algumas espécies fogem do padrão dixênico, apresentando todo o seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados, como *Trypanosoma vivax* Ziemann, 1905, e as subespécies *T. equiperdum* e *T. evansi* (LAI et al., 2008). *T. evansi* e *T. equiperdum* possuem a transmissão mecânica, seja pelos vetores durante a picada, ou pelo coito através dos hospedeiros vertebrados. Já *T. vivax* pode ser transmitido pela via mecânica, além de ser facultativo o ciclo de vida em moscas hospedeiras. Além disto, é importante destacar que, a adaptação de *T. evansi* e *T. equiperdum* a estes estilos de vida é decorrida da perda parcial ou total do kDNA (LAI et al., 2008).

A antiga divergência de aproximadamente 100 milhões de anos de *Trypanosoma* (SIMPSON, STEVENS E LUKES, 2006; STEVENS et al., 1999), possibilitou que esses parasitos desenvolvessem características moleculares únicas em seu DNA (LUKES et al., 2002) sendo alguns desses mecanismos comuns a protozoários e metazoários, como o fenômeno de *splicing* alternativo, que por meio da flexibilidade nos sítios de acoplamento para a transcrição das sequências de DNA, consegue codificar diversos mRNAs a partir do mesmo gene (MANIATIS & TASIC, 2002; SOULETTE, OLIVERIO & ROY, 2019).

Além disso, no caso desses parasitos, a transcrição desses mRNAs codificadores de proteínas é policistrônica, o que significa dizer que a região promotora do mRNA é seguida por diversos genes. Devemos citar também a ausência de promotores para a RNA Polimerase II nos tripanossomas, o que não permite a regulação dos transcritos ao final do processo de síntese proteica (CLAYTON, 2019; GILINGER & BELLOFATTO, 2001; PREUSSER, JAÉ & BINDEREIF, 2012; SIMPSON et al., 2006).

## 1.2 Histórico taxonômico do gênero *Trypanosoma*

Diante da diversidade de espécies, hospedeiros, ciclos de vida e formas evolutivas apresentadas pelos parasitos deste gênero, muitas propostas taxonomicas já foram realizadas, a fim de organizar a biodiversidade de tripanossomas em toda a sua completude.

Primeiramente, foi necessário que as formas que esses parasitos sanguíneos pudessem assumir fossem descritas, para a identificação. Assim sendo, em 1912, Laveran & Mesnil propuseram a primeira classificação dos tripanossomas, através da caracterização das formas de vida categorizando-as por meio de morfotipos específicos, baseados no arranjo e posicionamento do cinetoplasto, presença ou ausência da membrana ondulante, e dimensões da célula (VOTYPKA et al., 2015). Para essa caracterização, foram utilizadas apenas técnicas baseadas em microscopia de luz, único método disponível à época (WALLACE, 1966). Portanto, esta identificação e descrição das formas dos tripanossomas realizada a partir de esfregaços sanguíneos foi a primeira a ser criada (HUTCHINSON & STEVENS, 2018). Ainda, no final do século passado, as descrições foram feitas, majoritariamente, tomando como base caracteres morfológicos de formas sanguíneas dos parasitos (ADAMS et al., 2010; WEINMAN, WHITE & ANTIPA, 1984).

Desde então, inúmeros artigos com descrições de novas espécies de tripanossomas surgiram (FERMINO et al., 2019; FERREIRA et al., 2017; MAROTTA et al., 2018 (a), MAROTTA et al., 2018 (b); PRETORIUS et al., 2021). Contudo, uma das características mais marcantes dos tripanossomas é pleomorfia (diversas morfologias que uma espécie pode apresentar ao longo de seu ciclo de vida), fazendo com que a identificação através da morfologia seja um desafio. Como exemplo comprovado de espécie pleomórfica, podemos citar *T. brucei*, que por meio das diversas morfologias e características biológicas próprias demonstradas por cada morfotipo, consegue se

proliferar e transmitir à mosca tsé-tsé (inseto vetor da doença), mesmo estando em um mesmo hospedeiro (JANELLE et al., 2009; MATTHEWS, 1999). Já um exemplo histórico de confusão criada pelo pleomorfismo de tripanossomas, se deu entre as espécies de tripanossomas de anuros (*Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843, e *Trypanosoma ranarum* Lankester, 1871), as quais inicialmente foram identificadas como pertencentes a amebozoários e ciliados (LANKESTER, 1871; MAYER, 1843; SPODAREVA et al., 2018).

Se por um lado pode não ser possível realizar a identificação de formas destes parasitos em níveis taxonômicos elevados, como ordem ou família, por outro, também pode ocorrer a proposição de novas espécies que, na verdade, já foram descritas anteriormente. Este fato aconteceu entre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 e *Trypanosoma saimirii* Rodhain, 1941, que eram consideradas espécies distintas, mas após análises *T. saimirii* passou a ser considerada como sinônimo junior para *T. rangeli* (ZICCARDI et al., 2005). Outro exemplo intrigante ocorreu com a espécie *Trypanosoma suis* Ochmann, 1905, que já foi considerada como sinônimo de *T. simiae* Bruce et al., 1909, mas recentemente com o apoio de análises moleculares se descobriu que na verdade ambas são espécies distintas (HUTCHINSON & GIBSON, 2015). Além disso, a capacidade de infectar certos hospedeiros ou especificidade de vetores, já foi considerada como um fator diferenciador de *T. evansi*, *T. equiperdum* e *T. brucei*. No entanto, hoje já se sabe que *T. evansi* e *T. equiperdum* são “*petit mutants*”, ou, subespécies de *T. brucei*, originados pela perda de fragmentos de kDNA (LAI et al., 2008).

Apesar do número de novas descrições de espécies de tripanossomas continuar crescendo desde 1912, até 1973 nenhuma outra proposta havia sido publicada. Somente nessa data, uma nova classificação foi proposta por Hoare (1973). Para essa, foram utilizados os seguintes critérios para a divisão dos tripanossomas em duas seções (Stercoraria e Salivaria): local de desenvolvimento no vetor, via de eliminação das formas infectantes, hospedeiro vertebrado em que a forma tripomastigosta foi relatada, e a sua localização geográfica. O agrupamento Stercoraria incluiu os subgêneros *Megatrypanum*, *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*, parasitos de artiodáctilos, roedores, marsupiais e morcegos, transmitidos pelas fezes; enquanto Salivaria incluiu os subgêneros *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas*, parasitos de bovinos, macacos e suínos, transmitidos durante a inoculação das formas sanguíneas pela mosca tsé-tsé (HAAG, O'HUIGIN AND OVERATH, 1998; HOARE, 1973). Ademais, um dos critérios para a descrição de novas espécies, era a especificidade entre parasito-hospedeiro. Entretanto,

essa característica é considerada como um critério inadequado, já que nenhuma espécie de tripanossoma possui especificidade a qualquer hospedeiro.

Sendo assim, além do problema relacionado as identificações feitas incorretamente, também há o fator complicador de que as novas descrições normalmente são baseadas em materiais nos quais não foram realizadas curadorias, e que faltam dados para tal, impossibilitando a catalogação de informações de coleta e identificação do material, gerando uma biodiversidade de tripanosomas ainda desconhecida (D'AVILA-LEVY et al., 2015). Nos últimos 25 anos, a quantidade de dados moleculares disponíveis para o gênero *Trypanosoma* cresceu (HUTCHINSON & STEVENS, 2018). Os métodos moleculares permitiram a identificação de espécies de parasitos por meio da técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos desenhados para as espécies (ADAMS & HAMILTON, 2008).

Demasiado tempo passou desde a elaboração da proposta de classificação feita por Hoare, tornando essa desatualizada. Acrescido da evolução das técnicas moleculares e de sequenciamento genético, métodos de inferências filogenéticas e a descrição de diversas outras espécies de tripanosomas, foi necessário a atualização da classificação, em clados. Desta maneira, Hamilton & Stevens (2017) apresentam de forma sistematizada em seu trabalho, o que até então era consenso na taxonomia, como a divisão dos tripanosomas em clados baseado em dados acumulados de descrições morfológicas e métodos moleculares. A classificação de Hoare ao longo dos seus 44 anos desde a sua descrição, em conjunto com a sua atualização proposta por Hamilton e colaboradores, refletiu de maneira adequada durante todo esse período o que as filogenias atuais demonstram, como o agrupamento das espécies, relações filogenéticas existentes entre si, e até mesmo hipóteses evolutivas relacionadas. Mesmo assim, permaneceu a problemática de que certas espécies permaneciam como incógnitas, em relação ao seu parentesco e posicionamento na árvore filogenética dos tripanosomas. Desta maneira, essa classificação demonstrava propostas parcialmente discordantes em organizar essas espécies, não sendo, portanto, considerada adequada para a taxonomia dos tripanosomas (KOSTYGOV et al., 2021). Ainda, essa classificação traz alguns pontos incoerentes, dando maior importância aos tripanosomas de mamíferos, por meio da sua divisão entre os grupos Salivaria e Stercoraria (que não possuem relação com a sistemática do grupo); e deixou de representar toda a diversidade de espécies, já que não acomoda aquelas transmitidas pelas vias mecânica e inoculativa (Kostygov et al., 2021).

Sendo assim, recentemente Kostygov et al., (2021) apresentou uma revisão

sistemática de todos os tripanossomas, propondo agora que os subgêneros, que categorizavam os tripanossomas na classificação de Hoare (1973) com base em caracteres morfológicos, passem a agrupar as espécies de acordo com características filogenéticas em comum. Para àquelas que não se ajustam a este sistema, foi proposta criação de novos subgêneros, e/ou a divisão desses. E no caso das espécies *Trypanosoma terrestris* Marcili, 2013, *Trypanosoma irwini* McInnes et al., 2009, e *Trypanosoma pestanai* Bettencourt & França, 1905, que ainda não tiveram o seu posicionamento elucidado, foi proposto o título de *incertae sedis* (ACOSTA et al., 2013; BARBOSA et al., 2016; EGAN et al., 2020; HAMILTON et al., 2005; HAMILTON et al., 2007; MCINNES et al., 2009; MOREL et al., 2021; PÉREZ et al., 2019; YAZAKI et al., 2017). Como consequência, o gênero *Trypanosoma* foi dividido 16 subgêneros, dois potenciais subclados e três espécies *incertae sedis* (KOSTYGOV et al., 2021).

### 1.3 A história evolutiva de *Trypanosoma*

#### 1.3.1 Gênero *Trypanosoma*

Considerando todos os grupos de parasitos existentes além dos tripanossomatídeos, em termos evolutivos os cinetoplastídeos se posicionam como basais aos demais tripanossomatídeos, ainda que o seu surgimento e evolução sejam questão de debate (FLEGONTOV et al., 2013; LUKES et al., 2014). Mas, se tratando de *Trypanosoma*, existiram evidências fortemente apoiadas por métodos morfológicos e moleculares, que demonstraram o flagelado de vida livre *Bodo saltans* como o ancestral de vida-livre desse gênero (DESCHAMPS et al., 2011; MASLOV, PODLIPAEV, LUKES, 2001; SIMPSON, STEVENS & LUKES, 2006; STEVENS, 2014). Esse posicionamento dos bodonídeos levantou o questionamento a respeito do surgimento do estilo de vida parasita para os tripanossomas, bem como a evolução e surgimento dos ciclos de vida monoxênicos e dixênicos.

Há a hipótese de que flagelados de ciclo de vida monoxênico tenham sido os ancestrais dos dixênicos, sendo que o ciclo de vida derivado (dixênico) emergiu de forma independente para os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*, ocorrendo diversas vezes na história evolutiva da família Trypanosomatidae (FLEGONTOV et al., 2013; MASLOV et al., 2013; STEVENS et al., 2001; STEVENS,

2008; STEVENS, 2014; VICKERMAN, 1994). Para tal fato, há a hipótese de que teria sido necessário a adaptação ao ambiente intestinal de um inseto por um tripanossoma ancestral de vida livre, após a sua ingestão, fazendo com que este se tornasse monoxênico (TEIXEIRA, 2010). Após a adaptação a insetos fitófagos e hematófagos, os tripanossomas monoxênicos teriam sido inoculados em plantas e tecidos de animais, surgindo desta maneira o estilo de vida dixênico (Hamilton et al., 2004).

No entanto, a descoberta de um flagelado monoxênico da espécie *Paratrypanosoma confusum* Votýpka & Lukes, 2013 de mosquitos, se colocando filogeneticamente como grupo-irmão do gênero *Trypanosoma* (FLEGONTOV et al., 2013; LUKES et al., 2014; LUKES et al., 2018), reforçou a hipótese acima descrita de salto para o estilo de vida dixênico, a partir de um ancestral monoxênico. Embora existam alguns trabalhos que relatam supostos fósseis de tripanossomas presentes no tubo digestivo de insetos preservados em âmbar (POINAR, 2005; POINAR, 2008; POINAR, 2013), nenhum procedimento mais detalhado foi realizado nestas amostras, como a extração do material genético, estando disponível apenas fotografias, que são aquém do necessário para a identificação. Embora a origem evolutiva desse gênero de parasitos ainda seja incerta (STEVENS et al., 1999) devido a ausência de registro fóssil, existem algumas teorias evolutivas que tentam explicar o surgimento dos agrupamentos de espécies de tripanossomas (em subgêneros).

### **1.3.2 Subgêneros atualmente conhecidos de *Trypanosoma* (segundo a classificação de Kostygov et al., 2021)**

Atualmente, duas fortes teorias evolutivas existentes tentam explicar o surgimento e diversificação dos subgêneros de *Trypanosoma*. É importante destacar, que elas foram formuladas a partir dos dados e análises conhecidas até então, sendo ainda desconhecido qual ou quais fatores e eventos realmente ocorreram tal como são retratados pelas teorias. Estas teorias são denominadas “vertebrados primeiro”, e/ou “invertebrados primeiro”.

Segundo a primeira hipótese, é possível que os tripanossomas tenham se diferenciado a partir de um ancestral dixênico que infectava vertebrados, e pelo hábito hematófago dos insetos vetores, como as sanguessugas, os tripanossomas tenham irradiado para as classes de vertebrados aquáticos (HAMILTON et al., 2005; MINCHIN,

1908). Além disto, como provável hospedeiro, suspeita-se que os marsupiais tenham sido os primeiros hospedeiros terrestres a conterem alguns dos gêneros de tripanossomas monoxênicos (*Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*) e dixênicos (*Trypanosoma*, *Leishmania*), já que suas glândulas anais são locais propícios para o desenvolvimento dos ciclos de vida dos parasitos, inclusive permitindo a adaptação dos parasitos monoxênicos a um novo estilo de vida, o dixênico, sem a interferência do sistema imune do hospedeiro e sob temperatura corporal mais baixa (DEANE & JANSEN, 1988).

Por consequência à hipótese apresentada anteriormente (vertebrados primeiro) pode ter ocorrido a segunda hipótese, conhecida como “invertebrados primeiro”. Segundo a mesma, há a hipótese de que os flagelados ancestrais tenham parasitado os invertebrados num primeiro momento (como os insetos), e pelo hábito hematófago destes insetos teriam se irradiado para os hospedeiros vertebrados (HAMILTON et al., 2005). Esta hipótese pode ainda ser apoiada pela descoberta da espécie *P. confusum*, como relatado anteriormente, que apresenta um posicionamento altamente suportado na base da família Trypanosomatidae (FLEGONTOV et al., 2013). Ademais, há vários artigos disponíveis que relatam o fenômeno conhecido como “*small transition*”, ou seja, a presença de tripanossomas monoxênicos ocasionais em hospedeiros mamíferos, incluindo seres humanos, podendo desta maneira serem casos que possibilitariam a mudança entre o estilo de vida monoxênico para o dixênico (DARIO et al., 2021; KALANTARI et al., 2018; KOSTYGOV et al., 2019; LUKES et al., 2014; RANGEL et al., 2019).

A partir do surgimento de *Trypanosoma* de um ancestral em comum, houve a diversificação dos agrupamentos. Como citado anteriormente, estes agrupamentos eram tratados anteriormente pela classificação de Hoare (1973) como clados, contudo, a nova classificação proposta por Kostygov et al., (2021) resgata o conceito de subgêneros, além de criar novos subgêneros para que toda a diversidade de tripanossomas possa ser inclusa. Diante disso, o novo sistema taxonômico apresenta 16 subgêneros: *Haematomonas*, *Trypanosoma*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*, *Pycnomonas*, *Squamatripanum*, *Crocotrypanum*, *Australotrypanum*, *Trypanomorpha*, *Avitrypanum*, *Ornithotrypanum*, *Megatripanum*, *Schizotrypanum*, *Aneza* e *Herpetosoma*. Além disso, três espécies são apresentadas pela nova classificação como *incertae sedis*: *T. terrestris*, *T. pestanai* e *T. iwini*, e duas como potenciais subclados: *T. livingstonei* e *T. wauwau*.

De acordo com cada um desses subgêneros, existem hipóteses evolutivas relacionadas às espécies, ou conjunto de espécies relacionadas ao agrupamento, que

apontam para prováveis caminhos evolutivos que podem ter ajudado a gerar tal diversidade. Assim, nos subtópicos a seguir, será demonstrado as principais hipóteses evolutivas que tangem as espécies contidas em cada um dos subgêneros, considerando a classificação proposta por Kostygov et al., (2021).

### 1.3.2.1 Subgêneros *Haematomonas* e *Trypanosoma*

De acordo com os hospedeiros em que as formas tripomastigostas sanguíneas são encontradas, as espécies de tripanossomas são basicamente divididas em duas linhagens: linhagem aquática e linhagem terrestre. A linhagem aquática compreende espécies que parasitam vertebrados aquáticos ou semi-aquáticos (como os ornitorrincos e crocodilos), enquanto a linhagem terrestre parasita hospedeiros vertebrados terrestres. Diversos trabalhos baseados nas análises filogenéticas com marcadores moleculares concatenados, demonstram a divisão da árvore filogenética dos tripanossomas ainda no primeiro evento de diversificação, entre os representantes das linhagens aquática (subgêneros *Haematomonas* e *Trypanosoma*) e terrestre (todos os demais subgêneros) (DÍAZ et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; HAMILTON et al., 2004; HAMILTON, GIBSON & STEVENS, 2007; LEMOS et al., 2015; SPODAREVA et al., 2018).

O único vetor documentado para o subgênero *Haematomonas* são as sanguessugas. Os hospedeiros vertebrados incluem peixes ósseos marinhos e de água doce, raias, tubarões, tartarugas e uma espécie que parasita um crocodiliano (*Trypanosoma clandestinus* Teixeira & Camargo, 2015). Dentre as espécies que podem ser encontradas neste grupo, está *Trypanosoma abeli* Lemos et al., 2015, uma espécie recém descoberta parasitando cascudos das espécies *Hippostomus luetkeni* e *Hippostomus affinis* no Brasil (LEMOS et al., 2015), *Trypanosoma boissoni* MASLOV, Lukes, Jirku & Simpson, 1996 isolado da raia *Zanobatus atlanticus* (MASLOV, LUKES, JIRKU & SIMPSON, 1996), *Trypanosoma haploblephari* Pretorius et al., 2021, recentemente descrito parasitando *Haploblepharus pictus* (PRETORIUS et al., 2021), e *Trypanosoma granulorum* Poole & Holland, 2003, de *Anguilla anguilla*.

Segundo dados filogenéticos, o subgênero *Haematomonas* pode ser ainda subdividido em três grupos: tripanossomas que parasitam peixes de água doce, tripanossomas de peixes marinhos, e tripanossomas que infectam tartarugas



(KOSTYGOV et al., 2021). Entretanto, não somente peixes ósseos, cartilagosos e anuros estão dentre os possíveis hospedeiros para as linhagens aquáticas, isto porque análises filogenéticas demonstraram que *T. binneyi*, parasito encontrado em *Ornitorrynchus anatinus* (ornitorrinco), se posiciona dentro do subgênero *Haematomonas* (JAKES, O'DONOGHUE & ADLARD, 2003), bem como *Trypanosoma therezieni* Brygoo, 1963, parasito encontrado em camaleões (BRYGOO, 1963). Além disso, recentemente uma nova espécie de tripanossoma transmitida por sanguessugas foi encontrada em um novo hospedeiro, neste caso um mamífero terrestre, e posicionada filogeneticamente distante dos subgêneros aquáticos, mais especificamente no subgênero *Megatrypanum* (SU et al., 2021).

Já o subgênero *Trypanosoma*, inclui algumas espécies que são encontradas em anfíbios como: *T. rotatorium*, encontrado em *Rana catesbiana* (MASLOV et al., 1996), *Trypanosoma fallisi* de *Bufo americanus* (MARTIN et al., 2002), *Trypanosoma mega* em *Bufo regularis* (MARTIN et al., 2002), e o parasito de camaleões, *T. therezieni*.

Ademais, um dos hospedeiros do subgênero *Trypanosoma*, no caso os anuros, possuem relevância evolutiva, por serem considerados como a ponte entre as linhagens aquáticas e terrestres de tripanossomas, tendo possibilitado que houvesse a troca do ambiente aquático para o terrestre, e consequente dispersão para todas as demais classes de hospedeiros, fato este ocasionado pela metamorfose sofrida pelo hospedeiro durante o seu ciclo de vida (SPODAREVA et al., 2018).

### **1.3.2.2 Subgêneros *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas***

Os tripanossomas das espécies *T. brucei*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. suis*, *T. simiae*, *Trypanosoma godfreyi* McNamara, Mohammed & Gibson, 1994 e *Trypanosoma congolense* Broden, 1904, formam em conjunto, o agrupamento conhecido como tripanossomas africanos, já que todos são restritos ao continente africano, são transmitidos por moscas tsé-tsé, e são representados pelos subgêneros *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas* (KOSTYGOV et al., 2021), um agrupamento já consolidado (HAMILTON et al., 2004; HAMILTON et al., 2005; HAMILTON & STEVENS 2017; KOSTYGOV et al., 2021).

Dentre as espécies supracitadas, *T. vivax* é considerada a mais antiga dentre as

demais, e por conta disso é considerada como um bom modelo para a inferência de evolução entre as demais espécies africanas (GREIF et al., 2015, KOSTYGOV et al., 2021). De acordo com estudos filogenéticos, o posicionamento de *T. vivax* ainda não foi solucionado, contudo, o táxon sempre demonstra se posicionar próximo aos tripanossomas africanos (CORTEZ et al., 2006). Ainda, essa espécie apresenta elevada taxa de mutação, fazendo com que seu ramo fique alongado e destacado das demais linhagens (HAAG, O'HUIGIN & OVERATH, 1998; STEVENS & RAMBAUT, 2001). Além disto, esta é uma espécie que já não é restrita ao continente Africano, e pode ser encontrada também no continente Sul Americano (CORTEZ et al., 2006).

Um estudo recente que utilizou o kDNA de cepas americanas e africanas visando entender a resposta adaptativa à transmissão mecânica, comparou essas cepas e elucidou a história evolutiva de *T. vivax* (GREIF et al., 2021). Segundo o mesmo, múltiplos eventos de inserção da espécie por meio do gado na América do Sul e Central, fizeram com que ocorresse uma adaptação, e por seguinte troca vetorial para dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus sp.* e *Stomoxys sp.*, passando a ser transmitida mecanicamente (LOPES et al., 2018). Isto fez com que o ritmo de mutações genéticas no parasito fossem mais elevadas, o que culminou na sua evolução mais rápida demonstrada pelas topologias de árvores filogenéticas (GREIF et al., 2021), já que o material genético do cinetoplasto teve que sofrer degradações, em resposta à adaptação à fisiologia do novo vetor.

Além da peculiaridade apresentada por esta espécie, *T. brucei* também apresenta adaptações para novos hospedeiros, como já mencionado anteriormente, em que *T. evansi* e *T. equiperdum* são subespécies de *T. brucei* (LAI et al., 2008). Para as demais espécies destes subgêneros, nenhuma história evolutiva é conhecida até então.

### **1.3.2.3 Subgênero *Squamatrypanum***

*Squamatrypanum* é um subgênero que reúne as espécies *Trypanosoma varani* Wenyon, 1908, *Trypanosoma lainsoni* Naiff & Barret, 2013, *Trypanosoma cascavelli* Pessoa & De Biasi, 1972, *Trypanosoma freitasi* Rego et al., 1957 e *Trypanosoma gennarii*, que podem infectar lagartos, cobras, marsupiais e roedores. O único vetor confirmado para o presente subgênero são mosquitos flebotomíneos (AYALA, 1970; MINTER-GOEDBLOED et al., 1993).

Dentre os hospedeiros vertebrados que podem ser parasitados por tripanossomas desse subgênero, os marsupiais são hipotetizados como os primeiros hospedeiros terrestres a conterem espécies de tripanossomas, e possibilitarem a adaptação dos parasitos a outros animais de sangue frio, como cobras e lagartos, por meio de características próprias desses hospedeiros (DEANE & JANSEN, 1988; HOLZ, 2014).

#### ***1.3.2.4 Subgênero *Crocotrypanum* + *Trypanosoma terrestris****

O subgênero *Crocotrypanum* inclui as espécies que infectam crocodilos Sul Americanos e Africanos, *Trypanosoma ralphi* Teixeira & Camargo, 2013 e *Trypanosoma grayi* Novy, 1906, respectivamente. Os vetores incluem a mosca tsé-tsé no continente africano, e tabanídeos na América do Sul (FERMINO et al., 2019; HAMILTON & STEVENS, 2017). A hipótese formulada por Fermino et al., (2013) sugere que ambas essas espécies de parasitos se relacionam como próximas filogeneticamente, e durante a separação do continente Gondwana, ocorreu a migração transoceânica de seus hospedeiros acompanhada dos tripanossomas.

A espécie *T. terrestris*, um tripanossoma encontrado em antas (*Tapirus terrestris*) no Brasil (ACOSTA et al., 2013; PÉREZ et al., 2019), é retratada em certos trabalhos presentes na literatura com distintas relações filgenéticas (ACOSTA et al., 2013; PÉREZ et al., 2019). Mas, um estudo filogenético demonstrou que a mesma possui um ancestral em comum com as espécies do subgênero *Crocotrypanum*, e que provavelmente tal fato pode ser explicado pelo fenômeno de *Host-Switching*, ou seja, a troca de hospedeiros (PÉREZ et al., 2019).

#### ***1.3.2.5 Subgênero *Australotrypanum* + *Trypanosoma pestanai****

No subgênero *Australotrypanum*, podem ser encontrados tripanossomas que infectam mamíferos da Austrália, como: marsupiais, roedores, morcegos, monotremados, e fauna introduzida (THOMPSON et al., 2014). No caso desse subgênero, estão incluídos os parasitos de marsupiais e morcegos australianos, como *Trypanosoma copemani* Austen et al., 2009, *Trypanosoma gilletti* McInnes et al., 2011, *Trypanosoma vegrandis* e *T.*

*pestanai*. Atualmente, sabe-se que *Phascolarctos cinereus* (coala) pode ser hospedeiro das três primeiras espécies (MCINNES et al., 2009; MCINNES et al., 2011).

É hipotetizado que os carrapatos sejam os vetores que atuam no ciclo de transmissão dos parasitos contidos neste subgênero, já que existem relatos de casos de ocorrência dos parasitos nesses invertebrados, entretanto, tal fato ainda não foi confirmado (KRIGE, THOMPSON & CLODE, 2019). A espécie *T. copemani* foi encontrada em *Ixodes australiensis* Neumann, 1904 (AUSTEN et al., 2011), e *T. gilletti* nos carrapatos *I. holocyclus* Neumann, 1899 e *I. Tasmani* Neumann, 1899 (BARBOSA et al., 2017). Além disso, a espécie de tripanossoma *T. pestanai* teve o vetor comprovado como sendo pulgas da espécie *Paraceras melis* Walker, 1856, mas igualmente já foi documentada também em carrapatos *I. Ricinus* Linnaeus, 1758 e *I. Canisuga* Neumann, 1899 (SGROI et al., 2021).

Diversas filogenias concatenadas com os marcadores molculares SSU 18S rDNA e gGAPDH, demonstraram que *T. gilletti* se posiciona próximo ao *T. copemani*, tendo estes dois como grupo-irmão a espécie *T. pestanai* (MCINNES et al., 2011). Contudo, *T. pestanai* foi classificado como uma espécie *incertae sedis*, ou seja, de posicionamento ainda não resolvido, não sendo possível confirmar a sua relação de parentesco com outras espécies da árvore filogenética de tripanossomas (KOSTYGOV et al., 2021). Sendo assim, ainda é plausível que o critério biológico que relaciona estas espécies filogeneticamente seja o carrapato como vetor.

#### **1.3.2.6 Subgêneros *Trypanomorpha* e *Avitrypanum***

A primeira espécie de tripanossoma infectando ave foi descrita em 1885, e desde então, diversos outros relatos foram feitos. Entretanto, apesar das diversas descrições existentes, há uma grande lacuna de conhecimento acerca das espécies que foram descritas, daquelas que realmente são espécies novas bem caracterizadas, sendo portanto, a maior parte delas consideradas como *nomina dubia* (APANIUS, 1991; ZÍDKOVÁ et al., 2012). Para as espécies conhecidas (*Trypanosoma avium* Danilewsky, 1885, *Trypanosoma corvi* Stephens & Christophers, 1908, *Trypanosoma thomasbancrofti* Slapeta, 2016, *Trypanosoma culicavium* e *Trypanosoma bennetti* Valkiūnas et al., 2011), os vetores incluem dípteros, moscas, hippoboscídeos, mosquitos e ácaros (BENNET,

1961; BERNOTIENÉ et al., 2020; KATO et al., 2011; SVOBODOVÁ et al., 2017; SVOBODOVÁ & RÁDROVÁ, 2018; VOTYPKA et al., 2002; VOTYPKA & SVOBODOVÁ, 2004).

Diversas filogenias já feitas demonstraram resultados divergentes para o posicionamento dos subgêneros de tripanosomas aviários *Trypanomorpha* e *Avitrypanum* (GALEN et al., 2020). Estudos já demonstraram, que talvez eles possam estar relacionados aos tripanossomas de artiodáctilos, pertencentes ao subgênero *Megatrypanum* (BAKER, 1963; HOARE, 1967), entretanto este posicionamento foi baseado na morfologia e ciclo de vida destes grupos, que sabemos que não são confiáveis para inferir as relações filogenéticas presentes no grupo. Sendo assim, o posicionamento desses parasitos de aves na árvore evolutiva dos tripanossomas ainda permanece sem solução (GALEN et al., 2020), por demonstrarem não possuírem afinidade com nenhum outro subgênero de *Trypanosoma* (ZÍDKOVÁ et al., 2012). Por isso, os subgêneros que contêm tripanossomas que infectam aves são considerados como polifiléticos (HAAG, O'HUIGIN & OVERATH, 1998; VOTYPKA et al., 2004; ZÍDKOVÁ et al., 2012).

#### **1.3.2.7 Subgênero *Ornithotrypanum* + *Trypanosoma irwini***

Um terceiro subgênero que contém uma única espécie de tripanossoma de aves, é *Ornithotrypanum*, com *T. bennetti*, parasito de *Falco sparverius* (KOSTYGOV et al., 2021). Assim como os outros subgêneros de tripanossomas de aves, *Ornithotrypanum* ainda não possui um posicionamento fixo na topologia da árvore filogenética. Entretanto, a espécie *T. irwini*, encontrada parasitando coalas, tem demonstrado posicionamento altamente suportado junto ao subgênero *Ornithotrypanum* (BARBOSA et al., 2016; EGAN et al., 2020; MCINNES et al., 2009). A história de vida dos hospedeiros pode ter influenciado neste caso, já que, por exemplo, pássaros insetívoros capturam culicídeos durante a sua alimentação, o que pode transmitir tripanossomas (VOTYPKÁ et al., 2011), e as aves raptorais podem se contaminar pela alimentação de suas presas (DIRIE et al., 1990; ZÍDKOVÁ et al., 2012). Além disto, o fenômeno de *host-switching* também pode ter ocorrido entre estes hospedeiros, justificando o posicionamento próximo de ambas as espécies de tripanossomas (ARAUJO et al., 2015; MCINNES et al., 2009).

### **1.3.2.8 Subgênero *Megatrypanum***

O subgênero *Megatrypanum* hospeda tripanossomas de artiodáctilos, representados pelas espécies *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902, encontrado em bovinos, *Trypanosoma cyclops* Weinman, 1972, e *Trypanosoma melophagium* Flu, 1908, que parasitam ovinos.

Prováveis vetores conhecidos para este subgênero incluem dípteros, tabanídeos, moscas (CALZOLARI et al., 2018; GIBSON et al., 2010; WERSZKO et al., 2020), e mais recentemente sanguessugas (SU et al., 2021). Aparentemente, a história evolutiva deste subgênero teve início na Ásia, com as espécies *T. cyclops* e *T. theileri* (HAMILTON et al., 2005; MARTINKOVIC et al., 2012; RODRIGUES et al., 2006).

### **1.3.2.9 *Schizotrypanum*, *Aneza*, potenciais subclados *Trypanosoma livingstonei* e *Trypanosoma wauwau*, e *Herpetosoma***

Para os subgêneros *Aneza* e *Schizotrypanum*, há a evidência de que o ancestral flagelado parasitava morcegos na África, e por meio da teoria denominada “bat seeding”, houve a dispersão das linhagens entre os continentes Americano e Africano, seguida pela colonização de novos hospedeiros mamíferos através do fenômeno conhecido como *host switching* (HAMILTON et al., 2012; LIMA et al., 2013). Ainda, a movimentação dos morcegos entre continentes, e consequente dispersão dos tripanossomas entre o Novo e Velho Mundo, parece ter ocorrido recentemente (CLÉMENT et al., 2020; HAMILTON et al., 2012; HAMILTON, TEIXEIRA & STEVENS, 2012). Além disso, os potenciais subclados são demonstrados pela literatura como ocupando uma posição mais basal em relação a estes dois subgêneros.

Diante de tudo exposto, métodos de inferência filogenética mais robustos são necessários, a fim de tentar elucidar as relações filogenéticas existentes entre as espécies que compõem o gênero *Trypanosoma*, bem como os seus agrupamentos formados.

## **4. Técnicas moleculares e estudos filogenéticos para os representantes do gênero *Trypanosoma***

Com o avanço tecnológico, os métodos moleculares se mostraram ferramentas fundamentais no estudo da sistemática de tripanossomas em 1980, ao disponibilizarem sequências de nucleotídeos com centenas de caracteres informativos (VOTÝPKA et al., 2015). A utilização desses dados foi determinante para o diagnóstico e identificação destes parasitos, além de promover maior sensibilidade e acurácia nas identificações de espécies e análises filogenéticas quando comparado com os métodos de microscopia de luz (ENYARU et al., 2010; GIBSON, 2007; HUTCHINSON & STEVENS, 2018). Assim, de acordo com a técnica adotada, a topologia da árvore evolutiva de tripanossomas foi alterada, ainda influenciada por alguns parâmetros que eram adotados, como o número de espécies representativas, distância do *outgroup*, enraizamento e outros.

Inicialmente, houve o desenvolvimento de metodologias de sequenciamento para *barcoding* universal a partir das amostras genéticas retiradas destes parasitos, com a promessa de identificação sensível e confiável de todos os táxons existentes (HUTCHINSON & STEVENS, 2018). Esses sequenciamentos para o *barcoding* se mostraram promissores, por possibilitarem a identificação à nível de subespécie nas infecções por espécies conhecidas ou não, causadas por tripanossomas, bem como as infecções mistas (COISSAC et al., 2016). Entretanto, no caso dos tripanossomas, a tentativa de se utilizar um único marcador molecular que também fosse coincidente com outros eucariotos não obteve êxito, já que uma sequência padrão que se adequasse a todos os pré-requisitos considerados ideais para um marcador genético universal (DNA *barcoding*) não foi encontrado (HUTCHINSON & STEVENS, 2018).

Sendo assim, o marcador molecular SSU 18S rDNA bem como a sua sub-região V7V8 são utilizados no caso dos tripanossomas para *barcoding* (ou, a identificação molecular de espécies), além de inferências filogenéticas, respectivamente. As primeiras análises filogenéticas de *Trypanosoma* utilizavam apenas o SSU 18S rDNA (HUGHES & PIONTKIVSKA, 2003; JAKES, O'DONOGHUE & ADLARD, 2003; MARTIN et al., 2002; STEVENS & RAMBAUT, 2001). Mas posteriormente, vários marcadores moleculares foram utilizados em inferências filogenéticas de tripanossomas, de acordo com a sua utilidade em informar determinadas questões intra e interespecíficas. Como exemplos podemos citar o ITS1, ITS2, Cyt B, e o gene glicossômico Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) (BORGES, ENGSTLER & WOLF, 2021; HAMILTON et al., 2005; MARCILI et al., 2009). Os genes ITS1 e ITS2 são utilizados para diferenciar espécies de acordo com regiões hipervariáveis do genoma dos parasitos,

principalmente na descrição dos parasitos por amplificação de genes específicos. O marcador Cyt B é utilizado para fins de diferenciação genotípica entre linhagens (GARCIA et al., 2012; MARCILI et al., 2009; RAMÍREZ, DUQUE & GUHL, 2011). Já a sub-região V7V8 do gene SSU rDNA tem sido útil para acessar a diversidade genética dos tripanossomas (TEIXEIRA et al., 2011), enquanto o gGAPDH é um marcador molecular muito utilizado para o grupo, obtendo-se grandes vantagens em sua utilização como: economia no sequenciamento, poucos GAPS e informações profundas acerca da filogenia dos tripanossomas (D'AVILA-LEVY et al., 2015), sendo portanto, adequado para reconstruções filogenéticas do grupo por evoluir lentamente e ser relativamente conservado (HAMILTON et al., 2005).

Então, os estudos passaram a incluir análises moleculares concatenadas, a partir das sub-regiões variáveis V7V8 do gene SSU 18S rDNA e (gGAPDH), as quais se consolidaram como técnica de inferência filogenética para o gênero *Trypanosoma* (HAMILTON et al., 2004; HAMILTON & GIBSON, 2010; SEHGAL, JONES & SMITH, 2001; SLAPETA et al., 2016). As análises filogenéticas com sequências concatenadas dos genes SSU 18S rDNA e o gGAPDH são extremamente importantes, por aumentar a acurácia filogenética (ADAMS & HAMILTON, 2008; BARBOSA et al., 2016; D'AVILA-LEVY et al., 2015; DÍAZ et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; HAMILTON et al., 2005; HAMILTON et al., 2008; LEMOS et al., 2015). Sendo assim, a inclusão de mais dados possibilitou que as árvores filogenéticas destes parasitos desenvolvessem as ideias acerca da evolução dos mesmos, com certas questões evolutivas, como: Qual foi o primeiro hospedeiro dos tripanossomas (vertebrado ou invertebrado)? Como foi o modo de diversificação para o ambiente terrestre (por meio de hospedeiros anuros ou marsupiais)? O primeiro evento de diversificação do grupo corresponde às linhagens de tripanossomas aquáticos ou terrestres, ou as linhagens aquáticas surgiram a partir de um evento posterior ao surgimento das linhagens terrestres? Qual o modo de evolução dos subgêneros? (DARIO et al., 2017; DEANE & JANSEN, 1988; DÍAZ et al., 2020; FERREIRA et al., 2017; HAMILTON et al., 2004; SPODAREVA et al., 2018).

Mesmo com o aumento da acurácia filogenética e resolução satisfatória das relações filogenéticas existentes entre as espécies de tripanossomas, utilizando a análise concatenada de marcadores moleculares (SSU 18S rDNA + gGAPDH), ainda não é possível recuperar relações filogenéticas coesas para todas as espécies que compõem os agrupamentos desse gênero (FLEGONTOV et al., 2013; HAMILTON et al., 2004;



HAMILTON & STEVENS, 2017; ORTIZ et al., 2018). Este fato pode ser exemplificado por meio de espécies que se posicionam em ramos que não condizem com as filogenias em geral, ou seja, não se posicionam em nenhum agrupamento conhecido. Em 2009, um estudo realizado a partir de amostras sanguíneas de coalas, presentes em um zoológico da Austrália, descreveu uma nova espécie de tripanossoma: *T. irwini*. No entanto, a partir de análises filogenéticas, a nova linhagem demonstrou se posicionar junto a um tripanossoma aviário, compondo assim um clado parafilético (MCINNES et al., 2009). Além disso, também podemos citar uma importante espécie cuja colocação é problemática, *T. vivax* (HAMILTON et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006).

É importante salientar que a topologia da árvore filogenética e a história evolutiva de *Trypanosoma* também são sensíveis ao método filogenético, ao marcador molecular empregado nas análises, e à quantidade de representantes de tripanossomas utilizados nas análises. Por exemplo, a parafilia de *Trypanosoma* evidenciada por diversos trabalhos, demonstrou ser ocasionada pela utilização de apenas um marcador molecular (SSU 18S rDNA), somado à utilização de poucas sequências, e ao enraizamento em outgroups distantes do grupo de interesse (FERNANDES, NELSON & BEVERLEY, 1993; GOMEZ et al., 1991; LANDWEBER & GILBERT, 1994; STEVENS & GIBSON, 1999; STEVENS & RAMBAUT, 2001). Desta forma, a adoção de distintos parâmetros nas análises filogenéticas pode alterar significativamente a história evolutiva do presente gênero. Este fato pode ser mais uma vez evidenciado pela proposta de utilização concatenada entre os genes SSU 18S rDNA e gGAPDH, proporcionada pelo trabalho de Hamilton et al., (2005). Neste, foi suportado a monofilia do gênero *Trypanosoma*, que já havia sido apontada por outros autores (LUKES et al., 1997; SEHGAL, JONES & SMITH, 2001; STEVENS & GIBSON, 1999). Além disso, este método de inferência filogenética baseado em sequências concatenadas também evidenciou a falta de suporte filogenético para a seção Stercoraria, proposta pela classificação de Hoare (HAMILTON & STEVENS, 2017).

Apesar da melhoria nas inferências filogenéticas construídas para o grupo, a história evolutiva destes parasitos contém certas espécies que ainda não possuem um posicionamento filogenético dentro dos subgêneros condizente com as filogenias em geral. A fim de exemplificar, podemos citar *T. terrestris*, *T. irwini* e *T. pestanai*, que inclusive na taxonomia mais atual foram nomeadas como incertae sedis, devido este seu carácter (KOSTYGOV et al., 2021). Ainda, há a existência de táxons que estão inseridos em subgêneros conhecidos, mas com relações filogenéticas desconhecidas entre estes e

os demais do agrupamento, como *T. rotatorium*, *Trypanosoma mega* Dutton & Todd, 1903, *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902, *Trypanosoma wauwau* Teixeira & Camargo, 2016, e outras (ACOSTA et al., 2013; BARBOSA et al., 2017; EGAN et al., 2020; HAMILTON et al., 2005; HAMILTON et al., 2007; MCINNES et al., 2009; MOREL et al., 2021; PÉREZ et al., 2019; YAZAKI et al., 2017).

Desde a primeira vez, em que a metodologia de biologia molecular foi utilizada para tripanossomas, em 1980, o número de trabalhos que a utilizam deu um salto, sendo que a maioria destas utilizam os genes 18S rDNA e gGAPDH (HUTCHINSON & STEVENS, 2017). Com este aumento expressivo no número de sequências de tripanossomas disponíveis nos bancos de dados, como GenBank e TriTryp DB, há a possibilidade e necessidade de utilização de ferramentas mais modernas para análises filogenéticas.

Neste sentido, o emprego de outros métodos pode ser uma alternativa no processamento de informações genéticas. Por isto, métodos mais robustos, ou seja, que possuem uma melhor capacidade de explicar a disposição dos seus dados (no caso, sequências genéticas), e portanto, resultarão em filogenias mais precisas, têm sido adotados no intuito de abranger todas as novas informações recentes obtidas para o grupo. Com o avanço da Bioinformática, é certo que as moléculas de RNA possuem informações adicionais valiosas, que podem ser utilizadas no processamento da informação genética, em vez de se utilizar unicamente a sequência primária de nucleotídeos.

O conhecimento de sequências e das suas respectivas estruturas secundárias do RNA para a construção de alinhamentos para filogenias, é pré-requisito para entender a evolução destas estruturas secundárias (SEIBEL et al., 2006). Isto porque, as sequências nucleotídicas evoluem mais rápido do que a estrutura secundária, mas mesmo assim, moléculas de RNA diferentes terão estruturas semelhantes, o que pode ser um fator decisivo para inferências filogenéticas por conservar as informações de homologia (BAUER, KLAU & REINERT, 2007; KELLER et al., 2010; WOLF, KOETSCHAN & MULLER, 2014).

O método de sequência-estrutura consiste na utilização simultânea de sequências do gene SSU 18S rRNA e suas estruturas secundárias (WOLF, KOETSCHAN & MULLER, 2014). A utilização de sequência-estrutura traz certas vantagens, como estender a aplicabilidade do marcador empregado, e melhor poder de resolução de conflitos filogenéticos (SCHULTZ & WOLF, 2009). Isto porque, este método promove o aproveitamento de informações que antes não eram consideradas, adicionando assim,

novas informações à análise (SCHULTZ & WOLF, 2009). Ademais, com dados mais robustos, a confiabilidade da árvore gerada é maior (KELLER et al., 2010). Mesmo assim, a técnica ainda possui algumas limitações, como: ao considerar um alinhamento de sequência-estrutura sob uma matriz 4x3, requer maior tempo computacional para estimar a topologia por Máxima-Verossimilhança; conter apenas duas representações de estruturas secundárias disponíveis no banco de dados (respectivas às espécies *T. cruzi* e *T. brucei*), conseqüentemente sendo necessário a modelagem por homologia para todos os demais representantes; e inexistência de um protocolo de inferência filogenética baseado na inferência Bayesiana. Mesmo assim, essa ferramenta vem sendo empregada para alguns grupos, como Tunicados, Euglenophytas, e inclusive pela primeira vez em parasitos do gênero *Trypanosoma* (BORGES, ENGSTLER & WOLF, 2021; MARIN et al., 2003; TSAGKOGEOGA et al., 2009).

Além disso, podemos enfatizar que as probabilidades das inferências de parentesco e ancestralidade entre os grupos feitas para Bilateria, foram significativamente melhores (TELFORD, WISE & GOWRI-SHANKAR, 2005), sendo capaz de realizar a discriminação ao nível intraespecífico de linhagens evolutivas (GRAJALES, AGUILAR & SANCHÉZ, 2007; HEGEWALD et al., 2010; KELLER et al., 2010; MARIN et al., 2003; SAMANTA 2021; SHETH et al., 2019; TSAGKOGEOGA et al., 2009; WIEMERS, KELLER & WOLF, 2009). Portanto, a utilização deste recurso pode ser considerado como um mecanismo extremamente útil de inferência filogenética no gênero *Trypanosoma*, aumentando a robustez por adicionar novas informações (estruturas secundárias) ao alinhamento e análises filogenéticas principalmente para marcadores moleculares únicos (WIEMERS et al., 2009; HEGEWALD et al., 2010; KELLER et al., 2010; BUCHHEIM et al., 2011; MARKERT et al., 2012; KOETSCHAN et al., 2014; WOLF et al., 2014; HEEG & WOLF, 2015; LIM et al., 2016; PLIEGER & WOLF, 2022), além de utilizar três estados possíveis de alinhamento, possibilitando a definição com mais clareza das relações filogenéticas existentes entre os subgêneros. Além disso, essa metodologia possui como perspectiva atuar em conjunto com as análises filogenéticas concatenadas já atualmente aceitas nas inferências para o tripanossoma.

## **2. Objetivos**

Neste sentido, o presente estudo de forma geral objetivou verificar se diferentes metodologias de inferência filogenética podem afetar as relações evolutivas estimadas até o momento em *Trypanosoma*, com ênfase no método de sequência-estrutura do marcador 18S rDNA.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Tivemos como principais objetivos estimar a filogenia do grupo por meio do alinhamento concatenado entre sequências da região hipervariável V7V8 do gene 18S rDNA e gGAPDH; inferir a estrutura secundária do 18S rRNA de *Trypanosoma*, utilizando a modelagem por homologia do marcador 18S rDNA (>1500 pb) em sequências de espécies disponíveis em bancos de dados públicos; estimar a filogenia do grupo por meio do alinhamento de sequência-estrutura do gene 18S rDNA; e comparar os impactos dos métodos utilizados em relação aos posicionamentos evolutivos, e suporte de ramos usando como base a classificação taxonômica vigente para *Trypanosoma*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, I.C; DA COSTA, A.P.; NUNES, NUNES, P. H.; GONDIM, M.F.; GATTI, A.; ROSSI, J.L. GENNARI, S.M., MARCILI, A. Morphological and molecular characterization and phylogenetic relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 349, 2013.

ADAMS, E.; HAMILTON, P. New molecular tools for the identification of trypanosome species. **Future Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 167–176, 2008.

ADAMS, E.R.; HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C. African trypanosomes: celebrating diversity. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 324–328, 2010.

ADL, Sina M.; SIMPSON, Alastair G. B.; LANE, Christopher E.; LUKES, J., BASS, D., BOWSER, S., BROWN, M., BURKI, F., DUNTHORN, M., HAMPL, V., HEISS, A.A., HOPPENRATH, M., LARA, E., GALL, L.L., LYNN, D.H., MCMANUS, H., MITCHELL, E.A.D., MOZLEY-STANRIDGE, S.E., PARFREY, L.W., PAWLOWSKI, J., RUECKERT, S., SHADWICK, L., SCHOCH, C., SMIRNOV, A., SPIEGEL, F.W. The Revised Classification of Eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429–514, 2012.

APANIUS, V. Avian trypanosomes as models of hemoflagellate evolution. **Parasitology Today**, v. 7, n. 4, p. 87–90, 1991.

ARAUJO, S.B.L.; BRAGA, M.P.; BROOKS, D.R.; AGOSTA, S.J.; HOBERG, E.P.; HARTENTHAL, F.W.; BOEGER, W.A. Understanding Host-Switching by Ecological Fitting. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139225, 2015.

AUSTEN, J. M.; RYAN, U. M.; FRIEND, J. A.; DITCHAM, W.G.F; REID, S.A. Vector of *Trypanosoma copemani* identified as *Ixodes* sp. **Parasitology**, v. 138, n. 7, p. 866–872, 2011.

AUSTEN, J.M.; BARBOSA, A.D. Diversity and Epidemiology of Bat Trypanosomes: A One Health Perspective. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1148, 2021.

AYALA, S.C. Two New Trypanosomes from California Toads and Lizards. **The Journal of Protozoology**, v. 17, n. 3, p. 370–373, 1970.

BAKER, J. R. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae doflein, 1901. **Experimental Parasitology**, v. 13, n. 2, p. 219–233, 1963.

BARBOSA, A.D.; GOFTON, A.W.; PAPARINI, A.; CODELLO, A., GREAY, T., GILLET, A., WARREN, K., IRWIN, P., RYAN, U. Increased genetic diversity and prevalence of co-infection with *Trypanosoma spp.* in koalas (*Phascolarctos cinereus*) and their ticks identified using next-generation sequencing (NGS). **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181279, 2017.

BARBOSA, A.D.; MACKIE, J.T.; STENNER, R.; GILLET, A., IRWIN, P. RYAN, U. *Trypanosoma teixeirae*: A new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomosis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 214–221, 2016.

BAUER, M.; KLAU, G., W.; REINERT, K. Accurate multiple sequence-structure alignment of RNA sequences using combinatorial optimization. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 271, 2007.

BENNETT, G.F. On the specificity and transmission of some avian trypanosomes. **Can. J. Zool**, v. 39, p. 17–33, 1961.

BERNOTIENĖ, R.; IEZHOVA, T.A.; BUKAUSKAITĖ, D.; CHAGAS, C.R.F., KAZAK, M., VALKIUNAS, G. Development of *Trypanosoma everetti* in Culicoides biting midges. **Acta Tropica**, v. 210, p. 1-10, 2020.

BORGES, A.R.; ENGSTLER, M.; WOLF, M. 18S rRNA gene sequence-structure phylogeny of the Trypanosomatida (Kinetoplastea, Euglenozoa) with special reference to *Trypanosoma*. **European Journal of Protistology**, v. 81, p. 125824, 2021.

BREGLIA, S.A.; SLAMOVITS, C.H.; LEANDER, B.S. Phylogeny of Phagotrophic Euglenids (Euglenozoa) as Inferred from Hsp90 Gene Sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 86–92, 2007.

BRYGOO, E.R. Haematozoa of Madagascan Reptiles. I. *Trypanosoma therezieni* n.sp., a Parasite of Chameleons. **Arch. Inst. Pasteur Madagascar**, v. 31, n. 2, p. 133–41, 1963.

BUCHHEIM, M. A., KELLER, A., KOETSCHAN, C., FORSTER, F., MERGET, B., WOLF, M. Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. **PLOS ONE**, v.6, n.2, p.1-10, 2011.

CALZOLARI, M., RUGNA, G., CLEMENTI, E., CARRA, E., PINNA, M., BERGAMINI, F., FABBI, M., DOTTORI, M., SACCHI, L., VOTÝPKA, J. Isolation of a Trypanosome Related to *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: Psychodidae). **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-9, 2018.

CAVALIER-SMITH, T. Eukaryote kingdoms: Seven or nine? **Biosystems**, v. 14, n. 3, p. 461–481, 1981.

CLAES, F.; BÜSCHER, P.; TOURATIER, L.; GODDEERIS, B.M. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 7, p. 316–321, 2005.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, p. 1-24, 2019.

CLÉMENT, L.; DIETRICH, M.; MARKOTTER, W.; FASEL, N.J., MONADJEM, A., SCARAVELLI, D., THÉOU, P., PIGEULT, R., RUEDI, M., CHRISTE, P. Out of Africa: The origins of the protozoan blood parasites of the *Trypanosoma cruzi* clade found in bats from Africa. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 145, p. 106705, 2020.

COISSAC, E.; HOLLINGSWORTH, P.M.; LAVERGNE, S.; TABERLET, P. From

barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 7, p. 1423–1428, 2016.

CORTEZ, A.P., VENTURA, R.M., RODRIGUES, A.C., BATISTA, J.S., PAIVA, F., AÑEZ, N., MACHADO, R.Z., GIBSON, W.C., TEIXEIRA, M.M.G. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 159-169, 2006.

D'AVILA-LEVY, C.M.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, H.L.C., MORELLI, K.A., GRYBCHUK-LEREM, A. DUVAL, L., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V., GRELLIER, P., LUKES, J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 956–965, 2015.

DARIO, M.A.; LISBOA, C.V.; COSTA, L.M.; MORATELLI, R., NASCIMENTO, M.P., COSTA, L.P. LEITE, Y.L.R., LLEWELLYN, M.S., XAVIER, S.C., ROQUE, A.L.R., JANSEN, A.M.. High *Trypanosoma spp.* diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. 2017.

DARIO, M.A.; PAVAN, M.G.; RODRIGUES, M.S.; LISBOA, C.V., KLUYBER, D., DESBIEZ, A.L.J., HERRERA, H.M., ROQUE, A.L.R., LIMA, L., TEIXEIRA, M.M.G., JANSEN, A.M. *Trypanosoma rangeli* Genetic, Mammalian Hosts, and Geographical Diversity from Five Brazilian Biomes. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 736, 2021.

DEANE, M.P., JANSEN, A.M. From mono a digenetic life-cycle: how was the jump, for flagellates of the Family Trypanosomatidae? Mem. Int. Oswaldo Cruz, v. 83, n. 3, p. 273-275, 1988.

DESCHAMPS, P.; LARA, E.; MARANDE, W.; LÓPEZ-GARCÍA, P., EKELUND, F., MOREIRA, D. Phylogenomic Analysis of Kinetoplastids Supports That Trypanosomatids Arose from within Bodonids. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 53–58, 2011.

DÍAZ, A.G.; RAGONE, P.G.; RUSMAN, F.; FLORIDIA-YAPUR, N., BARQUEZ, R.,



DÍAZ, M.M., TOMASINI, N., DIOSQUE, P.. A Novel Genotype and First Record of *Trypanosoma lainsoni* in Argentina. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 731, 2020.

DIRIE, M.F.; BORNSTEIN, S.; WALLBANKS, K.R.; STILES, J.K., MOLYNEUX, D.H. Zymogram and life-history studies on trypanosomes of the subgenus *Megatrypanum*. **Parasitology Research**, v. 76, n. 8, p. 669–674, 1990.

DOLLET, M. Plant Diseases Caused by Flagellate Protozoa (Phytomonas). **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 115–132, 1984.

EGAN, S.L., TAYLOR, C.L., AUSTEN, J.M., BANKS, P.B., AHLSTROM, L.A., RYAN, U.M., IRWIN, P.J., OSKAM, C.L. Molecular identification of the *Trypanosoma* (Herpetosoma) lewisi clade in black rats (*Rattus rattus*) from Australia. **Parasitology Research**, v. 119, n. 5, p. 1691–1696, 2020.

ENYARU, J.C.; OUMA, J.O.; MALELE, I.I.; MATOVU, E., MASIGA, D.K. Landmarks in the evolution of technologies for identifying trypanosomes in tsetse flies. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 388–394, 2010.

FERMINO, B.R.; PAIVA, F.; VIOLA, L.B.; RODRIGUES, C.M.F., GRACIA, H.A., CAMPANER, M., TAKATA, C.S.A., SHEFERAW, D., KISAKYE, J.J., KATO, A., JARED, C.A.G.S., TEIXEIRA, M.M.G., CAMARGO, E.P. Shared species of crocodylian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South America, including the description of a new species from caimans, *Trypanosoma kaiowa* n. sp. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 225, 2019.

FERMINO, B.R.; VIOLA, L.B.; PAIVA, F.; GARCIA, H.A., DE PAULA, C.D., BOTERO-ARIAS, R., TAKATA, C.S.A., CAMPANER, M., HAMILTON, P.B., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodylids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 313, 2013.

FERNANDES, A.P.; NELSON, K.; BEVERLEY, S.M. Evolution of nuclear ribosomal

RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11608–11612, 1993.

FERREIRA, J.I.G.S.; DA COSTA, A.P.; NUNES, P.H.; RAMIREZ, D., FOURNIER, G.F.R., SARAIVA, D., TONHOSOLO, R., MARCILI, A. New Trypanosoma species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from South American marsupial in Brazilian Cerrado. **Acta Tropica**, v. 176, p. 249–255, 2017.

FLEGONTOV, P.; VOTÝPKA, J.; SKALICKÝ, T.; LOGACHEVA, M.D., PENIN, A.A., TANIFUJI, G., ONODERA, N.T., KONDRASHOV, A.S., VOLF, P., ARCHIBALD, J.M., LUKES, J. *Paratrypanosoma* Is a Novel Early-Branching Trypanosomatid. **Current Biology**, v. 23, n. 18, p. 1787–1793, 2013.

GALEN, S.C.; BORNER, J.; PERKINS, S.L.; WECKSTEIN, J.D. Phylogenomics from transcriptomic “bycatch” clarify the origins and diversity of avian trypanosomes in North America. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, 2020.

GARCIA, H.A.; BLANCO, P.A.; RODRIGUES, A.C.; RODRIGUES, C.M.F., TAKATA, C.S.A., CAMPANER, M., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. Pan-American *Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei* n. sp. in the white-tailed deer *Odocoileus virginianus* Zimmermann and its deer ked *Lipoptena mazamae* Rondani, 1878: morphological, developmental and phylogeographical characterisation. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 308, 2020.

GARCÍA, L.; ORTIZ, S.; OSORIO, G.; TORRICO, F., SOLARI, A. Phylogenetic Analysis of Bolivian Bat Trypanosomes of the Subgenus *Schizotrypanum* Based on Cytochrome b Sequence and Minicircle Analyses. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-7, 2012.

GIBSON, W. Resolution of the species problem in African trypanosomes. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 8, p. 829–838, 2007.

GIBSON, W.; PILKINGTON, J.G.; PEMBERTON, J.M. *Trypanosoma melophagium* from the sheep ked *Melophagus ovinus* on the island of St Kilda. **Parasitology**, v. 137, n. 12, p. 1799–1804, 2010.

GILINGER, G.; BELLOFATTO, V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 7, p. 1556–1564, 2001.

GRAJALES, A.; AGUILAR, C.; SÁNCHEZ, J.A. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, n. 1, p. 90, 2007.

GREIF, G.; RODRIGUEZ, M.; REYNA-BELLO, A.; ROBELLO, C., ALVAREZ-VALIN, F. Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 773, p. 69–82, 2015.

HAAG, J.; O’HUGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 37–49, 1998.

HAMILTON, P. B.; ADAMS, E. R.; NJIOKOU, F.; GIBSON, W.W., CUNY, G., HERDER, S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 81–86, 2009.

HAMILTON, P.B., STEVENS, J.R., HOLZ, P., BOAG, B., COOKE, B., GIBSON, W.C. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 10, p. 3167-3175, 2005.

HAMILTON, P.B.; GIBSON, W.C.; STEVENS, J.R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 1, p. 15–25, 2007.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: TELLERIA, Jenny; TIBAYRENC, Michel (Orgs.). **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. 2. ed. London: Elsevier, 2017, p. 321–344, 2008.

HAMILTON, P.B.; STEVENS, J.R.; GAUNT, M.W.; GIDLEY, J., GIBSON, W.C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393–1404, 2004.

HAMILTON, P.B.; TEIXEIRA, M.M.G.; STEVENS, J.R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 4, p. 136–141, 2012.

HEEG, J.S., WOLF, M. ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). **PLANT GENE**, v.4, p.1-9, 2015.

HEGEWALD, E.; WOLF, M.; KELLER, A.; FRIEDL, T., KRIENITZ, L. ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. **Phycologia**, v. 49, n. 4, p. 325–335, 2010.

HERRER, A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the Tropical Porcupine, *Coendou rothschildi* Thomas. **The Journal of Parasitology**, v. 57, n. 3, p. 626–629, 1971.

HOARE, C. A. "Trypanosoma erace/nsubgroup ". **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 3, p. 421–2, 1973.

HOARE, C.A. Evolutionary Trends in Mammalian Trypanosomes. In: DAWES, Ben (Org.). **Advances in Parasitology**. [s.l.]: Academic Press, 1967, v. 5, p. 47–91.

HOLZ, P. Marsupials. In: **Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia**. [s.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2014, p. 521–528.

HUGHES, A.L.; PIONTKIVSKA, H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) Based on 18S rRNA: Evidence for Paraphyly of *Trypanosoma* and Six Other Genera. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 4, p. 644–652, 2003.

HUTCHINSON, R.; GIBSON, W. Rediscovery of *Trypanosoma (Pycnomonas) suis*, a tsetse-transmitted trypanosome closely related to *T. brucei*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 381–388, 2015.

HUTCHINSON, R.; STEVENS, J.R. Barcoding in trypanosomes. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 563–573, 2018.

JAKES, K.A., O'DONOGHUE, P.J., ADLARD, R.D. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. **Parasitology**, v. 123, n. 5, p. 483–487, 2003.

JANELLE, J.; KOFFI, M.; JAMONNEAU, V.; PATREL, D., CUNY, G., RAVEL, S. Monitoring the pleomorphism of *Trypanosoma brucei* gambiense isolates in mouse: Impact on its transmissibility to *Glossina palpalis* gambiensis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1260–1264, 2009.

JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 10, 2020.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CÁCERES, A.G.; VARGAS, F., MIMORI, T., YAMAMOTO, K., IWATA, H., KORENAGA, M., VELEZ, L., HASHIGUCHI, Y. Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 5, p. 515–521, 2011.

KELLER, A.; FÖRSTER, F.; MÜLLER, T.; DANDEKAR, T., SCHULTZ, J., WOLF, M. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in

reconstruction of phylogenetic trees. **Biology Direct**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2010.

KOETSCHAN, C., KITTELMANN, S., LU, J., AL-HALBOUNI, D., JARVIS, G.N., MÜLLER, T., WOLF, M., JANSSEN, P.H. Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core throughout the anaerobic fungi (Neocallimastigomycota). **PLOS ONE**, v.9, n.3, p.1-10, 2014.

KOSTYGOV, A.Y.; KARNKOWSKA, A.; VOTÝPKA, J.; TASHYREVA, D., MACISZEWSKI, K., YURCHENKO, V., LUKES, J. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, v. 11, n. 3, p. rsob.200407, 200407, 2021.

KRIGE, A.S.; THOMPSON, R.C.A.; CLODE, P.L. ‘Hang on a Tick’ – Are Ticks Really the Vectors for Australian Trypanosomes? **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 596–606, 2019.

LAI, D.H.; HASHIMI, H.; LUN, Z.R.; AYALA, F.J., LUKES, J. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 1999–2004, 2008.

LAINSON. R., SHAW. T.L. Leishmanias of neotropical porcupines : *Leishmania hertigi deanei* nov. subsp. **Acta Amazonica**, v. 7, p. 51-57, 1977.

LANDWEBER, L.F.; GILBERT, W. Phylogenetic analysis of RNA editing: a primitive genetic phenomenon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 3, p. 918–921, 1994.

LANKESTER ER. On Undulina, the type of a new group of Infusoria. **Q J Microsc Sci**, v. 11, p. 387–389, 1871.

LEMOS, M., FERMINO, B.R., SIMAS-RODRIGUES, C., HOFFMANN, L., SILVA, R., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G., SOUTO-PADRÓN, T. Phylogenetic and

morphological characterization of trypanosomes from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a new fish trypanosome species. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 573, p. 1-17, 2015.

LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; HAMILTON, P.B.; NEVES, L., TAKATA, C.S.A., CAMPANER, M., ATTIAS, M., DE SOUZA, W., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 221, 2013.

LIM, H.C., TENG, S.T., LIM, P.T., WOLF, M., LEAW, C.P. 18S rDNA phylogeny of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) inferred from sequence-structure information. **PHYCOLOGIA**, v.55, p.134–146, 2016.

LOPES, S.T. P.; PRADO, B.S.; MARTINS, G.H. C.; BESERRA, H.E.A., SOUSA FILHO, M.A.C., EVANGELISTA, L.S.M., CARDOSO, J.F.S., MINEIRO, A.L.B.B., SOUZA, J.A.T. *Trypanosoma vivax* in Dairy Cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 1-5, 2018.

LUKEŠ, J.; BUTENKO, A.; HASHIMI, H.; MASLOV, D.A., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V. Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 466–480, 2018.

LUKEŠ, J.; GUILBRIDE, D.L.; VOTÝPKA, J.; ZIKOVÁ, A., BENNE, R., ENGLUND, P.T. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 4, p. 1-8, 2002.

LUKEŠ, J.; SKALICKÝ, T.; TÝČ, J.; VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115–122, 2014.

MACINNES, L.M., HANGER, J., SIMMONS, G., REID, S.A., RYAN, U.M. Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctoscinereus*). **Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 1-12, 2010.

MANIATIS, T.; TASIC, B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 236–243, 2002.

MARCILI, A., LIMA, L., CAVAZZANA, J.R., JUNQUEIRA, C.V., VELUDO, H.H., MAIA DA SILVA, F., CAMPANER, M., PAIVA, F., NUNES, V.L.B., TEIXEIRA, M.M.G. 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**, v. 136, n. 6, p. 641-655, 2009.

MARIN, B.; PALM, A.; KLINGBERG, M.A.X.; MELKONIAN, M. Phylogeny and Taxonomic Revision of Plastid-Containing Euglenophytes based on SSU rDNA Sequence Comparisons and Synapomorphic Signatures in the SSU rRNA Secondary Structure. **Protist**, v. 154, n. 1, p. 99–145, 2003.

MAROTTA, C.R.; SANTOS, P.N.D.; CORDEIRO, M.D.; BARROS, J.H.S., BELL-SAKYI, L., FONSECA, A.H. *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Open**, v. 4, p. 1-7, 2018.

MAROTTA, C.R.; SANTOS, P.N.D.; CORDEIRO, M.D.; MATOS, P.C.M., BARROS, J.H., MADEIRA, M.F., BELL-SAKYI, L., FONSECA, A.H. *Trypanosoma rhipicephalis* sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Open**, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2018.

MARKERT, S. M., MÜLLER, T., KOETSCHAN, C., FRIEDL, T., WOLF, M. 'Y' Scenedesmus (Chlorophyta, Chlorophyceae): the internal transcribed spacer 2 rRNA secondary structure re-revisited. **PLANT BIOL**, v.14, p.987–996, 2012.

MARTIN, D.S.; WRIGHT, A.D.G.; BARTA, J.R.; DESSER, S.S. Phylogenetic position of the giant anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*, *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred



from 18S rRNA gene sequences. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 566–571, 2002.

MARTINKOVIĆ, F.; MATANOVIĆ, K.; RODRIGUES, A.C.; GARCIA, H.A., TEIXEIRA, M.M.G. *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the sheep ked *Melophagus ovinus* from organic farms in Croatia: phylogenetic inferences support restriction to sheep and sheep keds and close relationship with trypanosomes from other ruminant species. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 134–144, 2012.

MASLOV, D. A.; LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 197–205, 1996.

MASLOV, D.A.; PODLIPAEV, S.A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397–402, 2001.

MASLOV, D.A.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; LUKES, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 43–52, 2013.

MATTHEWS, K.R. Developments in the Differentiation of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 2, p. 76–80, 1999.

MAYER A.F.J.C. Spicilegium observationum anatomicarum de organo electrico in raiis anelectricis et de haematozois. Bonnae: Caroli Georgii; 1843.

MCINNES, L. M.; GILLET, A.; RYAN, U. M.; AUSTEN, J., CAMPBELL, R.S.F., HANGER, J., REID, S.A. *Trypanosoma irwini* n. sp (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae) from the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Parasitology**, v. 136, n. 8, p. 875–885, 2009.

MCINNES, L.M.; HANGER, J.; SIMMONS, G.; REID, S.A., RYAN, U.M. Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctoscinereus*). **Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 59–70, 2011.

MINCHIN, E. A. Memoirs: Investigations on the Development of Trypanosomes in Tsetse-Flies and other Diptera. **Journal of Cell Science**, v. s2-52, n. 206, p. 159–260, 1908.

MINTER-GOEDBLOED, E.; LEAKE, C.J.; MINTER, D.M.; MCNAMARA, J., KIMBER, C., BASTIEN, P., EVANS, D.A., RAY, D. L. *Trypanosoma varani* and *T. grayi*-like trypanosomes: Development in vitro and in insect hosts. **Parasitology Research**, v. 79, n. 4, p. 329–333, 1993.

MOREIRA D, LÓPEZ-GARCÍA P, VICKERMAN K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, p. 1861-1875, 2004.

MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. Pt 5, p. 1861–1875, 2004.

MOREL, N.; THOMPSON, C.S.; ROSSNER, M.V.; MANGOLD, A.J., NAVA, S. A *Trypanosoma* species detected in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 1, p. 101573, 2021.

ORTIZ, P.A.; GARCIA, H.A.; LIMA, L.; DA SILVA, F.M., CAMPANER, M., PEREIRA, C.L., JITTAPALAPONG, S., NEVES, L., DESQUESNES, M., CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. Diagnosis and genetic analysis of the worldwide distributed Rattus-borne *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* and its allied species in blood and fleas of rodents. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology**

**and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 63, p. 380–390, 2018.

ORTIZ-BAEZ, A.S., COUSINS, K., EDEN, J.S., CHANG, W.S., HARVEY, R., PETTERSSON, J.H.O., CARVER, S., POLKINGHORNE, A., SLAPETA, J., ROSE, K., HOLMES, E. Meta-transcriptomic identification of *Trypanosoma spp.* in native wildlife species from Australia. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 447, p. 1-10, 2020.

PAPARINI, A.; MACGREGOR, J.; IRWIN, P.J.; WARREN, K., RYAN, U.M. Novel genotypes of *Trypanosoma binneyi* from wild platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*) and identification of a leech as a potential vector. **Experimental Parasitology**, v. 145, p. 42–50, 2014.

PÉREZ, S.D.; GRUMMER, J.A.; FERNANDES-SANTOS, R.C.; JOSÉ, C.T., MEDICI, E.P., MARCILI, A. Phylogenetics, patterns of genetic variation and population dynamics of *Trypanosoma terrestris* support both coevolution and ecological host-fitting as processes driving trypanosome evolution. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 473, 2019.

PLIEGER, T., WOLF, M. 18S and ITS2 rDNA sequence-structure phylogeny of Prototheca (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **BIOLOGIA**, v.77, p.569–582, 2022.

POINAR G.J.R. *Leptoconops nosopheris* sp. n. (Diptera: Ceratopogonidae) and *Paleotrypanosoma burmanicus* gen. n., sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a biting midge - trypanosome vector association from the Early Cretaceous. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 468–471, 2008.

POINAR, G. *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. **Paleodiversity**, v. 6, p. 1-8, 2013.

POINAR, G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 1, p. 72–81, 2005.

PORNPANOM, P., SALAKIJ, C., PRASOPSOM, P., LERTWATCHARASARAKUL, P., KASORNDORKBLUA, C., SANTAVAKUL, M. Morphological and molecular characterization of avian trypanosomes in raptors from Thailand. **Protozoology**, v.118, p.2419-2429, 2019.

PRETORIUS, C., SMIT, N.J., SCHAEFFNER, B., COOK, C.A. The neglected diversity: Description and molecular characterisation of *Trypanosoma haploblephari* Yeld and Smit, 2006 from endemic catsharks (Scyliorhinidae) in South Africa, the first trypanosome sequence data from sharks globally. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 15, p. 143-152, 2021.

PREUSSER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4, p. 221–224, 2012.

RAMÍREZ, J.D.; DUQUE, M. C.; GUHL, F. Phylogenetic reconstruction based on Cytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 61–65, 2011.

RANGEL, D.A.; LISBOA, C.V.; NOVAES, R.L. M.; SILVA, B.A., SOUZA, R.F., JANSEN, A.M., MORATELLI, R., ROQUE, R. Isolation and characterization of trypanosomatids, including *Crithidia mellificae*, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1-17, 2019.

RODRIGUES, A. C.; PAIVA, F.; CAMPANER, M.; STEVENS, J.R., NOYES, H.A., TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeny of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 2, p. 215–224, 2006.

SAMANTA, B. Structural evolution of SLA promoter in mosquito-borne flaviviruses: A sequence-structure based phylogenetic framework. **Virology**, v. 562, p. 110–120, 2021.

SBODAREVA, V.V., GRYBCHUK-EREMENKO, A., LOSEV, A., VOTÝPKA, J., LUKES, J., YURCHENKO, V., KOSTYGOV, A.Y. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of European species. **Parasites & Vectors**, v. 11,

n. 447, p. 1–12, 2018.

SCHULTZ, J.; WOLF, M. ITS2 sequence–structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 520–523, 2009.

SCHUSTER, S.; LISACK, J.; SUBOTA, I.; ZIMMERMANN, H.; REUTER, C., MUELLER, T., MORRISWOOD, B., ENGSTLER, M. Unexpected plasticity in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **ELife**, v. 10, p. e66028, 2021.

SEHGAL, R.N.M.; JONES, H.I.; SMITH, T.B. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 9, p. 2319–2327, 2001.

SEIBEL, P.N.; MÜLLER, T.; DANDEKAR, T.; SCHULTZ, J., WOLF, M. 4SALE: a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 498, 2006.

SGROI, G.; IATTA, R.; LIA, R.P.; LATROFA, M.S., SAMARELLI, R., CAMARDA, A., OTRANTO, D. *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* in Eurasian badgers (*Meles meles*) and Ixodidae ticks, Italy. **Parasitology**, v. 148, n. 12, p. 1516–1521, 2021.

SHETH, B.P.; PUNIA, S.; DHEER, M.; RAKHASHIYA, P.M., PATEL, P.P., THAKER, V.S. Phylogenetic implications and secondary structure analyses of *Vigna mungo* (L.) Hepper genotypes based on rDNA ITS2 sequences. **Computational Biology and Chemistry**, v. 78, p. 389–397, 2019.

SIMPSON, A.G.B.; STEVENS, J.R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–174, 2006.

ŠLAPETA, J.; MORIN-ADELINÉ, V.; THOMPSON, P.; MCDONELL, D., SHIELS, M., GILCHRIST, K., VOTÝPKA, J., VOGELNEST, L. Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). **Parasitology**, v. 143, n. 8, p. 1012–1025, 2016.

ŠLAPETA, J.; MORIN-ADELINE, V.; THOMPSON, P.; MCDONELL, D., SHIELS, M., GILCHRIST, K., VOTÝPKA, J., VOGELNEST, L. Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). **Parasitology**, v. 143, n. 8, p. 1012–1025, 2016.

SOULETTE, C.M; OLIVERIO, O.; ROY, S.W. On the Function of Trans-Splicing: No Evidence for Widespread Proteome Diversification in Trypanosomes. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 10, p. 3014–3021, 2019.

STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226–232, 2008.

STEVENS, J. R.; NOYES, H. A.; DOVER, G. A.; GIBSON, W.C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**, v. 118 ( Pt 1), p. 107–116, 1999.

STEVENS, J.; RAMBAUT, A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 143–150, 2001.

STEVENS, J.R. Free-living bodonids and derived parasitic trypanosomatids: but what lies in between? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 113–114, 2014.

STEVENS, J.R.; GIBSON, W. The Molecular Evolution of Trypanosomes. **Parasitology Today**, v. 15, n. 11, p. 432–437, 1999.

SU, B.X.; WANG, J.F.; YANG, T.B.; HIDE, G., LAI, D.H., LUN, Z.R. A new species of mammalian trypanosome, *Trypanosoma (Megatrypanum) bubalisi* sp. nov., found in the freshwater leech *Hirudinaria manillensis*. **International Journal for Parasitology**, 2021.

SVOBODOVÁ, M., RÁDROVÁ, J. Phlebotomine Sandflies – Potential Vectors of Avian Trypanosomes. *Acta Protozoologica*, v. 57, p. 53-59, 2018.

SVOBODOVÁ, M.; DOLNIK, O.V.; ČEPIČKA, I.; RÁDROVÁ, J. Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 224, 2017.

TELFORD, M.J; WISE, M.J; GOWRI-SHANKAR, V. Consideration of RNA Secondary Structure Significantly Improves Likelihood-Based Estimates of Phylogeny: Examples from the Bilateria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 1129–1136, 2005.

THOMPSON, C.K., THOMPSON, R.C.A. Trypanosomes of Australian Mammals: Knowledge Gaps Regarding Transmission and Biosecurity. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 11, p. 553-562, 2015.

THOMPSON, C.K.; WAYNE, A.F.; GODFREY, S.S.; THOMPSON, A.R.C. Temporal and spatial dynamics of trypanosomes infecting the brush-tailed bettong (*Bettongia penicillata*): a cautionary note of disease-induced population decline. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 169, 2014.

TSAGKOGEOGA, G.; TURON, X.; HOPCROFT, R.R.; TILAK, M.K., FELDSTEIN, T., SHENKAR, N., LOYA, Y., HUCHON, D., DOUZERY, E.J.P., DELSUC, F. An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 187, 2009.

VALLEJO, G.A. Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana. **Actualidades Biológicas**, v. 20, n. 68, p. 43–56, 1998.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1317–1331, 1994.

VICKERMAN, K.W.H.R., PRESTON, T.M., LUMSDEN, W.H.R., EVANS, D.A. Biology of the Kinetoplastida. **Comparative cell biology**, 1976.

VIOLA, L.B.; ATTIAS, M.; TAKATA, C.S.A.; CAMPANER, M., DE SOUZA, W.,

CAMARGO, E.P., TEIXEIRA, M.M.G. 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*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 594–602, 2009.

VOTÝPKA, J.; D'AVILA-LEVY, C.M.; GRELLIER, P.; MASLOV, D.A., LUKES, J., YURCHENKO, V. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 460–469, 2015.

VOTÝPKA, J.; LUKEŠ, J.; OBORNÍK, M. Phylogenetic Relationship of *Trypanosoma corvi* with Other Avian Trypanosomes. **Acta Protozoologica**, v. 43, p. 225-231, 2004.

VOTÝPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M., LUKES, J. *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology**, v. 125, n. 3, p. 253–263, 2002.

WALLACE, F.G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 124–193, 1966.

WALLACE, F.G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids

WANG, W.; PENG, D.; BAPTISTA, R.P.; LI, Y., KISSINGER, J.C., TARLETON, R.L. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. 1-30, 2021.

WEINMAN, D.; WHITE, E.A.; ANTIPA, G.A. *Trypanosoma lucknowi*, a New Species of Trypanosome from *Macaca mulatta* with Observations on Its Fine Structure<sup>1</sup>. **The Journal of Protozoology**, v. 31, n. 3, p. 429–433, 1984.

WERSZKO, J.; STEINER-BOGDASZEWSKA, Ź.; JEŻEWSKI, W.; SZWCZYK, T., KURYLO, G., WOLKOWYCKI, M., WRÓBLEWSKI, P., KARBOIAK, G. Molecular detection of *Trypanosoma* spp. in *Lipoptena cervi* and *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) and their potential role in the transmission of pathogens. **Parasitology**, v. 147, n. 14, p. 1629–1635, 2020.



WIEMERS, M.; KELLER, A.; WOLF, M. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 300, 2009.

WOLF, M.; KOETSCHAN, C.; MÜLLER, T. ITS2, 18S, 16S or any other RNA - simply aligning sequences and their individual secondary structures simultaneously by an automatic approach. **Gene**, v. 546, n. 2, p. 145–149, 2014.

YAZAKI, E.; ISHIKAWA, S.A.; KUME, K.; KUMAGAI, A., KAMAISHI, T., TANIFUJI, G., HASHIMOTO, T., INAGAKI, Y. Global Kinetoplastea phylogeny inferred from a large-scale multigene alignment including parasitic species for better understanding transitions from a free-living to a parasitic lifestyle. **Genes & Genetic Systems**, v. 92, n. 1, p. 35–42, 2017.

ZÍDKOVÁ, L.; CEPICKA, I.; SZABOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, M. Biodiversity of avian trypanosomes. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 102–112, 2012.

## **CAPÍTULO ÚNICO**

**An evolutionary story of *Trypanosoma*: contrasting sequence-only analyses with a sequence-structure approach in inferring phylogenetic relationships**

1 **An evolutionary story of *Trypanosoma*: contrasting sequence-only analyses with a sequence-**  
2 **structure approach in inferring phylogenetic relationships**

3 Mylena B. Lima<sup>a, 1</sup>, Alyssa R. Borges<sup>b, 1</sup>, Markus Engstler<sup>b</sup>, Matthias Wolf<sup>c</sup>, Roberto Júnio Pedrosa  
4 Dias<sup>a</sup>, Mariana F. Rossi<sup>a, \*</sup>

5  
6 <sup>a</sup> Protozoology Laboratory (LabProto), Biodiversity and Nature Conservation Post-Graduation  
7 Program, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

8 <sup>b</sup> Department of Cell and Developmental Biology, Biocenter, University of Würzburg, Am  
9 Hubland, 97074 Würzburg, Germany

10 <sup>c</sup> Department of Bioinformatics, Biocenter, University of Würzburg, Am Hubland, 97074  
11 Würzburg, Germany

12 \* Corresponding author at: Protozoology Laboratory (LabProto), LAZ, Biodiversity  
13 and Nature Conservation Post-Graduation Program, Biological Sciences Institute,  
14 Federal University of Juiz de Fora, Campus University, CEP 36036-900 Juiz de Fora,  
15 Minas Gerais, Brazil.

16 E-mail address: mfonsecarossi@gmail.com (M. Fonseca Rossi)

17 <sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

18

19 **Abstract**

20 Trypanosomes are broadly diverse organisms, some of which have medical and economic  
21 relevance. Studying this diversity has been the goal of the scientific community for decades. In spite  
22 of advances made in reconstructing the phylogeny of trypanosomes, several evolutionary questions  
23 remain unsolved. Thus, the use of different approaches to assess the phylogeny of the group could  
24 be of advantage. This work compares three tree topologies obtained by different analyses: (1)  
25 concatenation of sequence-only data of gGAPDH and the V7V8 region of the 18S rDNA, (2)  
26 simultaneous use of the sequence and the secondary structure information of the 18S rDNA, and (3)

27 sequence-only data from long, i.e., more or less complete sequences of the 18S rDNA. In this way,  
28 we aim to investigate whether the sequence-structure method can contribute to elucidate the  
29 phylogenetic relationships of trypanosomes. The sequence-structure analysis was able to accurately  
30 recover monophyletic subgenera as well as broaden our perspective on the evolution of  
31 trypanosomes. This analysis also showed a good capacity of evidencing instabilities in the trees  
32 caused by rogue taxa in the dataset.

33

34 Keywords: Evolution; gGAPDH; rDNA; Secondary Structure; Trypanosomatidae; V7V8

35

## 36 **1. Introduction**

37 Trypanosomatidae is composed of monoxenous and dixenous parasites of plants and  
38 animals (Votýpka et al., 2014, 2015; Kaufer et al., 2019; Kostygov et al., 2021; Yurchenko et al.,  
39 2021). *Trypanosoma* Gruby, 1843 is the type-genus and harbors the highest species richness with  
40 ~500 nominal species identified (Kostygov et al., 2021). The first work about trypanosomatids  
41 trying to catalog such a variety of organisms is dated from 1912 when a series of morphological  
42 aspects of bloodstream trypomastigotes were used to classify trypanosome species (Laveran and  
43 Mesnil, 1912). Over the decades, similar efforts on trypanosome classification were done for  
44 distinct groups of vertebrate hosts (Wenyon, 1926; Lehmann, 1954; Hoare, 1973). Despite these  
45 attempts, the taxonomy of the group remained controversial. The observed pleomorphism of  
46 trypanosome species (Vickerman, 1965; Nantulya et al., 1978; Spodareva et al., 2018), the  
47 concurrent infection of hosts by multiple species of *Trypanosoma* (i.e., mixed infections)  
48 (Jamonneau et al., 2004; Lemos et al., 2015) that could be misidentified as the same pleomorphic  
49 species (Spodareva et al., 2018), and the morphological similarities of distinct trypanosome species  
50 (Davies et al., 2005; Ferreira et al., 2007) have contributed to the taxonomical problem of  
51 *Trypanosoma*. Thus, it is clear that morphology cannot be used as a prime character for the  
52 identification of trypanosome species.

53 In this context, phylogenetics became a valuable tool for allowing species identification and  
54 contributing to a better comprehension of the evolution of trypanosomes (Hamilton et al., 2004;  
55 Lukeš et al., 2014; Lemos et al., 2015; Hamilton and Stevens, 2017; Fermino et al., 2019). Initially,  
56 phylogenetic studies were mainly focused on 18S rDNA sequences (Maslov et al., 1996; Jakes et  
57 al., 2001; Stevens and Rambaut, 2001; Martin et al., 2002; Hughes and Piontkivska, 2003).  
58 Throughout the years, the need for an increased resolution to resolve internal relationships of  
59 *Trypanosoma* has encouraged the use of other markers, such as glyceraldehyde-3-phosphate  
60 dehydrogenase (gGAPDH) (Hamilton et al., 2004, 2005), heat shock protein-70 (Hsp70) (Fraga et  
61 al., 2016), and cathepsin (Ortiz et al., 2018). Currently, the combined use of the hypervariable  
62 V7V8 region of 18S rDNA and gGAPDH is the main approach used in inferring trypanosome  
63 phylogenies (Viola et al., 2009; Lemos et al., 2015; Fermino et al., 2013, 2015, 2019). The  
64 “barcoding” of trypanosomes promoted by the use of these two markers allowed the identification  
65 of many new species and lineages (Lemos et al., 2015; Fermino et al., 2013, 2015, 2019; Riana et  
66 al., 2022) as well as helped to resolve the relationships among distinct clades (Hamilton and  
67 Stevens, 2017).

68 Despite the progress promoted by the use of gGAPDH and V7V8 18S rDNA for  
69 trypanosome classification, some inconsistencies remained. This issue is exemplified by the  
70 grouping of organisms in artificial clades, such as the polyphyletic “Avian clade” (Zidková et al.,  
71 2012; Šlapeta et al., 2016; Kostygov et al., 2021). The persistence of such conflicts motivated the  
72 elaboration of a new taxonomic proposal that reorganized the former *Trypanosoma* clades into  
73 monophyletic subgenera. As a result, the current classification presents 16 subgenera (*Aneza*,  
74 *Australotrypanum*, *Avitrypanum*, *Crocotrypanum*, *Duttonella*, *Haematomonas*, *Herpetosoma*,  
75 *Megatrypanum*, *Nannomonas*, *Ornithotrypanum*, *Pycnomonas*, *Schizotrypanum*, *Squamatrypanum*,  
76 *Trypanomorpha*, *Trypanosoma*, and *Trypanozoon*), three potential subgenera – still designated as  
77 “species clades” (*Trypanosoma livingstonei* Teixeira and Camargo, 2013, *Trypanosoma noyesi*  
78 Botero et al., 2016 and *Trypanosoma wauwau* Teixeira and Camargo, 2016), and three *incertae*

79 *sedis* species (*Trypanosoma irwini* McInnes et al., 2009, *Trypanosoma pestanai* Bettencourt and  
80 França, 1905, and *Trypanosoma terrestris* Marcili, 2013) (Kostygov et al., 2021).

81 By combining the traditional taxonomy, based on morphological and biological features  
82 (such as life cycle), and the propositions on the evolution of the group, based on molecular  
83 phylogenetics (Kostygov et al., 2021), the new classification shows a positive impact in our  
84 understanding of *Trypanosoma*. In addition, by evidencing the existence of potential subgenera and  
85 *incertae sedis* species, the new classification highlights the pitfalls of our current knowledge of  
86 trypanosome evolution. Thus, the development and use of different phylogenetic approaches could  
87 contribute to fill-in these gaps.

88 Recently, a method combining the information of 18S rDNA sequences and their respective  
89 secondary structures (mentioned as sequence-structure) was used to infer the phylogeny of  
90 Trypanosomatidae (Borges et al., 2021a). The sequence-structure method has proven to increase the  
91 resolution of trees by extracting more information from a single marker (Keller et al., 2010; Wolf et  
92 al., 2014; Heeg and Wolf, 2015; Lim et al., 2016; Buchheim et al., 2017; Pliieger and Wolf, 2022)  
93 and resulted in well-supported trees of *Trypanosoma* (Borges et al., 2021). However, it is known  
94 that phylogenetic analyses are influenced by the genetic marker of choice, the method of inference,  
95 as well as the dataset used for the analysis (Haag et al., 1998; Stevens et al., 1999; Stevens and  
96 Rambaut, 2001; Hamilton et al., 2004, 2007; Lukeš et al., 2018). Thus, this work uses a single  
97 dataset (with the same trypanosome lineages and non-*Trypanosoma* outgroups) and similar  
98 algorithms and substitution models for phylogenetic inferences. We compare the topologies  
99 obtained with sequence-only data (concatenation of gGAPDH and the V7V8 region of the 18S  
100 rDNA and non-concatenated long 18S rDNA, i.e., more or less complete sequences) and the  
101 sequence-structure of long 18S rDNA. By minimizing the influence of the dataset and the inference  
102 methods, we aim to analyze how the sequence-structure could contribute to the study of  
103 trypanosomes and present new perspectives on the evolutionary story of *Trypanosoma*. In addition,  
104 the sensibility of this method to rogue taxa (i.e., taxa with uncertain positions) (Aberer et al., 2013)

105 opens an interesting discussion about the resolution of the trees and our current knowledge of the  
106 relationships inside *Trypanosoma*.

107

## 108 **2. Material and methods**

### 109 *2.1. Dataset's structure*

110 Long sequences (>1500 bp) of 18S rDNA and gGAPDH of *Trypanosoma* were assembled  
111 from GenBank (Benson et al., 2018) and TriTrypDB databases (Aslett et al., 2010). The assembled  
112 data were screened to contain only nominal species with sequences available for both markers. A  
113 second refinement was performed to filter data obtained from the same species lineage. From the  
114 final 18S rDNA dataset the V7V8 sub-regions were extracted by *in silico* PCR using SnapGene  
115 (Insightful Science; available on [snapgene.com](http://snapgene.com)). The primers used for this task were 609F  
116 (CACCCCGCGGTAATTCCAGC), 706R (TCTGAGACTGTAACCTCAA), and 561R  
117 (CTGAGACTGTAACCTCAAAGC) (Noyes et al., 1999; Lemos et al., 2015). *Crithidia fasciculata*  
118 Léger, 1902, *Blechnomonas pulexsimulantis* (Beard et al., 1989), *Blechnomonas wendygibsoni*  
119 Votýpka and Sukov, 2013, and *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor, 1914 were used as  
120 outgroups. In this way, each dataset contained 54 sequences in total (Supplementary Table S1). It is  
121 important to note that our data assembling strategy did not allow the inclusion of *Trypanosoma suis*  
122 Ochmann, 1905 due to the lack of long 18S rDNA sequences available. Thus, the subgenus  
123 *Pycnomonas* was not represented in our dataset.

124

### 125 *2.2. Concatenate phylogenetic analyses: gGAPDH and V7V8 - 18S rDNA*

126 Nucleotide sequences of gGAPDH and V7V8 18S rDNA were individually aligned in  
127 MAFFT (Kato and Standley, 2013), using the default options, and visually inspected. Then both  
128 datasets were concatenated into a single supermatrix in SeaView 4.5.4 (Gouy et al., 2010). Missing  
129 genes were treated as missing data. After removing poorly aligned positions with Gblocks  
130 (Castresana, 2000), a matrix with 1670 bp was obtained. The phylogenetic analysis was inferred by

131 the maximum likelihood (ML) framework as implemented in RAxML (Stamatakis, 2014). The  
132 model GTR + G + I (Kimura, 1980; Tavaré, 1986; Yang, 1994) was chosen as the best substitution  
133 model in MEGA7 (Kumar et al., 2016). Clade support was assessed with the bootstrap convergence  
134 criterion of RAxML (Stamatakis, 2014) with 150 pseudo-replicates.

135

### 136 2.3. Sequence-structure phylogenetic analysis of 18S rDNA

137 The secondary structures of the 18S rRNA of *Trypanosoma brucei* Plimmer and Bradford,  
138 1899 and *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 were retrieved from the Comparative RNA Web Site  
139 (CRW) (Cannone et al., 2002). These data were used for homology modeling, using the ‘model’  
140 option as implemented in the ITS2 database (Ankenbrand et al., 2015) to obtain the secondary  
141 structures for each and all of our long 18S rDNA sequences. For our sequence-structure alignment,  
142 the four RNA nucleotides, which were multiplied by three states (unpaired, paired left, and paired  
143 right), are encoded by a 12-letter alphabet (Wolf et al., 2014). Using a specific 12x12 sequence-  
144 structure scoring matrix (Seibel et al., 2006), a global alignment of multiple sequence-structure data  
145 was automatically generated in ClustalW2 1.83 (Larkin et al., 2007) as implemented in 4SALE  
146 1.7.1 (Seibel et al., 2006, 2008). The flanking regions of the entire alignment block were trimmed in  
147 4SALE based on the gaps at the beginning and end of the shortest sequence, resulting in a 2366 bp  
148 array. The 12-letter encoded alignment (Wolf et al., 2014) obtained from 4SALE was used for  
149 phylogenetic analysis. An ML tree was estimated using phangorn as implemented in R (R Core  
150 Team, 2014; Schliep, 2011). The substitution model was GTR + G + I and the consensus tree was  
151 obtained from 100 pseudo-replicates. The R script used is available online  
152 (<http://4sale.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/mlseqstr.html>).

153

154 2.4. Phylogenetic analysis based on long sequences of 18S rDNA the long sequences of 18S rDNA  
155 were aligned individually in MAFFT (Katoh and Standley, 2013), with default options, and visually  
156 inspected. Poorly aligned positions were removed using Gblocks (Castresana, 2000) resulting in a



157 matrix with 2072 bp. The phylogeny was inferred by ML implemented in RAxML (Stamatakis,  
158 2014). The substitution model TN93 + G + I (Kimura, 1980; Tavaré, 1986; Yang, 1994) was chosen  
159 in MEGA7 (Kumar et al., 2016). Clade support was assessed with the bootstrap convergence  
160 criterion of RAxML (Stamatakis, 2014) with 800 pseudo-replicates.

161

### 162 3. Results

163 Our dataset assembled representatives of all former *Trypanosoma* clades, which appear,  
164 according to the new classification, as 15 subgenera, two potential subgenera (subclades), and three  
165 taxa *incertae sedis* (Fig. 1). The concatenated analysis shows the divergence of aquatic and  
166 terrestrial lineages of trypanosomes as the deepest split in the group (Fig. 1). As a matter of interest  
167 for further discussion, African trypanosomes (*Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*) are placed in  
168 an internal branch of terrestrial trypanosomes. The potential subgenera (*T. livingstonei* and *T.*  
169 *wauwau*) appeared in the internal branches of *Schizotrypanum* and *Aneza*. In addition, it is  
170 important to note the close relationship between *incertae sedis* species and certain subgenera: *T.*  
171 *terrestris* and *Crocotrypanum* (ML = 81), *T. pestanai* and *Australotrypanum* (ML = 100), and *T.*  
172 *irwini* and *Ornithotrypanum* (ML = 100) (Fig. 1).

173 The sequence-structure topology (Fig. 2) also recovered the same number of subgenera,  
174 potential subgenera/subclades, and *incertae sedis* (according to the current classification). However,  
175 the deepest split of this tree was observed between the group of African trypanosomes (*Duttonella*,  
176 *Nannomonas*, and *Trypanozoon*) and all other trypanosomes of both terrestrial and aquatic lineages  
177 (Fig. 2). As a consequence, the relationships between all other subgenera were altered. In this  
178 scenario, *Squamotrypanum* appears as the first to diverge (ML = 100) followed by a split between  
179 aquatic lineage (*Haematomonas* and *Trypanosoma*) (ML = 99) and other terrestrial trypanosomes  
180 (*Crocotrypanum*, *Australotrypanum*, *Megatrypanum*, *Trypanomorpha*, *Avitrypanum*,  
181 *Schizotrypanum*, *Aneza*, *Herpetosoma*, *Ornithotrypanum*). The potential subgenera *T. livingstonei*  
182 and *T. wauwau* are still placed close to *Schizotrypanum* and *Aneza*. However, in this topology, *T.*

183 *livingstonei* diverges earlier than *Schizotrypanum* while this branch (*T. livingstonei* +  
184 *Schizotrypanum*) is shown as a sister group of *Aneza* + *Herpetosoma* + *T. wauwau* (Fig. 2). Inside  
185 this sister group, *T. wauwau* is the first to diverge. It is important to note that these alterations are  
186 not strongly supported, with the whole group showing a bootstrap value of 49 (Fig. 2), which will  
187 be further discussed. The *incertae sedis* *T. pestanai* still appears in a close relationship to  
188 *Australotrypanum* (ML = 100) as well as *T. irwini* and *Ornithotrypanum* (ML = 100). However, the  
189 positioning of *T. terrestris* was altered. This species is shown in the fourth branching point of the  
190 tree, assuming an earlier divergence than the other trypanosomes of terrestrial lineage  
191 (*Crocotrypanum*, *Megatrypanum*, *Australotrypanum*, *Ornithotrypanum*, *Avitrypanum*,  
192 *Schizotrypanum*, *Aneza*, *Herpetosoma*, *Trypanomorpha*, *T. wauwau*, *T. livingstonei*, *T. pestanai*,  
193 and *T. irwini*) (Fig. 2).

194 In comparison to the sequence-structure tree, the inference based on long sequences of the  
195 18S rDNA does not show any difference in the number of subgenera, potential subgenera, and taxa  
196 *incertae sedis* recovered (Fig. 3A, B). Three subgenera (*Megatrypanum*, *Schizotrypanum*, and  
197 *Trypanosoma*) show differences in the inter-specific relationships while the collapsed ones do not  
198 differ in both topologies (Fig. 3A, B). In general, the alterations inside the subgenera are related to  
199 the early-branching species in each group, which, consequently, cause alterations in other internal  
200 relationships. In *Megatrypanum* we can observe the internal branch occupied by *Trypanosoma*  
201 *cyclops* Weinman, 1972 in the sequence-structure tree (Fig. 3A) while *Trypanosoma theileri*  
202 Laveran, 1902 is placed in this position by the sequence-only tree (Fig. 3B). In *Schizotrypanum*, the  
203 basal positioning was occupied by either *Trypanosoma dionisii* Bettencourt and França, 1905 in the  
204 sequence-structure tree (Fig. 3A) or *Trypanosoma erneyi* Lima and Teixeira, 2012 in the sequence-  
205 only tree (Fig. 3B). The first species to diverge in *Trypanosoma* is either *Trypanosoma mega*  
206 Dutton and Todd, 1903 (Fig. 3A) or *Trypanosoma rotatorium* (Mayer, 1843) (Fig. 3B). Looking at  
207 the big picture, we see the divergence of the aquatic and terrestrial lineages as the first event in the  
208 sequence-only tree (Fig. 3B). However, the support for the monophyly of this lineage is low (ML =

209 59) when compared to the sequence-structure tree (ML = 99) (Fig. 3A). The subgenera  
210 *Trypanomorpha* and *Avitrypanum* are placed as sister groups in the sequence-structure tree (Fig.  
211 3A) while the topology of the sequence-only tree suggests the early branching of *Trypanomorpha*  
212 (Fig. 3B). The potential subgenera *T. wauwau* diverges before *Aneza* and *Schizotrypanum* (Fig. 3B).  
213 However, *T. livingstonei* assumes a closer relationship to *Herpetosoma*, *Australotrypanum*, African  
214 trypanosomes (*Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*), and *T. pestanai* (Fig. 3B). Regarding the  
215 *incertae sedis* taxa, while *T. pestanai* still branches together with *Australotrypanum* and *T. irwini*  
216 with *Ornithotrypanum*, *T. terrestris* now appears in a speciation event anterior to *Squamotrypanum*,  
217 *T. irwini*, and *Ornithotrypanum* (Fig. 3B).

218

## 219 **4. Discussion**

### 220 *4.1. Trypanosome evolution: inferences from the concatenated analysis*

221 Due to the lack of fossil evidence, the evolutionary story of *Trypanosoma* must be inferred  
222 by phylogenetics. The scenarios proposed by these studies can be taken together with biological  
223 features of trypanosomes and biogeography in an attempt to reconstruct the likely speciation route  
224 of these parasites (Hamilton et al., 2007; Lukeš et al., 2014; Hamilton and Stevens, 2017). Thus, our  
225 understanding of trypanosome evolution comes from propositions that take into consideration the  
226 common points of different studies along with the least cost speciation path.

227 Considering the wide use and acceptance of concatenated analysis of gGAPDH and the  
228 V7V8 region of 18S rDNA for the phylogeny and taxonomy of trypanosomes, we used this method  
229 to represent the scenario of trypanosome evolution inferred from our dataset. Of the 16 existent  
230 subgenera (Kostygov et al., 2021), 15 had representative species in our dataset and could be  
231 recovered as monophyletic groups. The deepest branch of the tree is the split between the aquatic  
232 and terrestrial lineages, which is largely documented in the literature (Hamilton et al., 2007; Lemos  
233 et al., 2015; Lima et al., 2015; Spodareva et al., 2018; Fermino et al., 2019). The monophyletic  
234 group formed by *Crocotrypanum* and the *incertae sedis* *T. terrestris* is presented as the first to

235 diverge among terrestrial trypanosomes. Although robustly supported in our tree, this scenario is  
236 still uncertain. In our topology, these trypanosomes would represent the most ancient group of  
237 terrestrial lineage. This proposition is not supported by estimations of divergence times (Pérez et al.,  
238 2019) or phylogenomics (Kelly et al., 2014; Galen et al., 2020). In addition, previous studies  
239 suggested either their monophyly (Ferreira et al., 2017; Pérez et al., 2019) or the divergence of  
240 *Crocotrypanum* before *T. terrestris* (Acosta et al., 2013). Thus, whether *Crocotrypanum* and *T.*  
241 *terrestris* form a monophyletic group and how they are related to other trypanosomes is still under  
242 debate.

243 The independent evolutionary stories of the human pathogens *T. brucei* and *T. cruzi* are  
244 shown in our tree and are extensively documented in the literature (Stevens et al., 1999; Hamilton et  
245 al., 2004; Hamilton and Stevens, 2017; Kostygov et al., 2021). This independency is highlighted by  
246 the internal split of terrestrial trypanosomes resulting in two big subgroups. The first is formed by  
247 African trypanosomes (*Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*), *Ornithotrypanum*,  
248 *Squamatrypanum*, *Megatrypanum*, *Avitrypanum*, and *Trypanomorpha*, and the second by  
249 *Schizotrypanum*, *Aneza*, *Herpetosoma*, and *Australotrypanum*. Phylogenomic analyses do not  
250 support these relationships (REFs). Instead, these analyses presented African trypanosomes as a  
251 sister group of other subgenera, named *Aneza*, *Avitrypanum*, *Crocotrypanum*, *Megatrypanum*, and  
252 *Schizotrypanum* (Kelly et al., 2014; Galen et al., 2020). Thus, it is possible to suggest that more  
253 studies are necessary to fully comprehend the events that culminated in the divergence of African  
254 trypanosomes and how their story is connected to other subgenera.

255 Some subgenera of terrestrial lineage are known to have a close relationship. They are  
256 represented in our concatenated tree and also documented in the literature as sister groups, such as  
257 *Avitrypanum* and *Trypanomorpha* (Votýpka et al., 2012; Šlapeta et al., 2016; Borges et al., 2021a;  
258 Kostygov et al., 2021), or as supergroups, such as the members of the former *T. cruzi* clade  
259 (*Schizotrypanum*, *Aneza*, and the potential subgenera *T. wauwau* and *T. livingstonei*) (Hamilton et  
260 al., 2005; Acosta et al., 2013; Ferreira et al., 2017; Riana et al., 2022). In addition, our tree

261 corroborates the suggested monophyly of the *incertae sedis* species *T. pestanai* and *T. irwini* with  
262 *Australotrypanum* and *Ornithotrypanum*, respectively (McInnes et al., 2009; Acosta et al., 2013;  
263 Botero et al., 2013; Barbosa et al., 2016; Kostygov et al., 2021).

264

#### 265 4.2. Contrasting the sequence-structure topology and the concatenated tree

266 The sequence-structure tree generated from the same dataset shows congruencies to the  
267 concatenated topology. All 15 subgenera were properly recovered as monophyletic groups, there  
268 was a solid branching of aquatic trypanosomes as well as African trypanosomes, *T. brucei* and *T.*  
269 *cruzi* showed independent evolutionary stories, *Avitrypanum* and *Trypanomorpha* were recovered  
270 as sister groups, and the *incertae sedis* *T. pestanai* and *T. irwini* were respectively grouped with  
271 *Australotrypanum* and *Ornithotrypanum*. Therefore, the sequence-structure analysis corroborates  
272 many points on *Trypanosoma* evolution that are largely accepted by the scientific community.

273 Nevertheless, the first three events of the sequence-structure tree are intriguing. The tree  
274 presents African trypanosomes (*Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*) in the first divergence  
275 event of *Trypanosoma*. As a consequence, all other trypanosomes, from terrestrial and aquatic  
276 lineages, are placed in the other branch of the tree. *Squamatrypanum* is placed in the second  
277 divergence event, assuming a deeper position than all other trypanosomes, followed by the  
278 appearance of the aquatic lineage (*Haematomonas* and *Trypanosoma*). Our topology agrees with a  
279 previous study using the same method (Borges et al., 2021a). However, it does not agree with  
280 analyses based solely on the sequence information presented here or in previous publications  
281 (Stevens et al., 1999; Hamilton et al., 2004, 2007; Lemos et al., 2015; Spodareva et al., 2018).

282 It is largely accepted that African trypanosomes (*Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*,  
283 and *Pycnomonas*) have their origins confined to Africa (Rodrigues et al., 2008; Silva Pereira et al.,  
284 2020). The isolation of some parasites inside Africa after continental separation (~165 million years  
285 ago) (Rabinowitz et al., 1983) could have contributed to speciation and shaped many biological  
286 characteristics, such as the transmission by tsetse flies and the cell surface coated with variant

287 surface glycoproteins (VSGs) (Vickerman, 1969; Cross, 1975; Borges et al., 2021b). These aspects  
288 help to explain the solid branch formed by African trypanosomes in many phylogenetic analyses  
289 (Stevens et al., 1999; Hamilton et al., 2004; Votýpka et al., 2012; Hamilton and Stevens, 2017;  
290 Borges et al., 2021a; Kostygov et al., 2021). It is known that the inclusion of African trypanosomes  
291 in the dataset subjects the tree to a phenomenon called “long-branch attraction” (Maslov and Lukes,  
292 1998; Noyes, 1998), which pulls the group with higher substitution rates, i.e., African  
293 trypanosomes, towards the outgroup. This phenomenon can be counterbalanced, for example, by  
294 increasing the number of species in the dataset, choosing close related outgroups, and using  
295 conserved regions of the rDNA (Lukes et al., 1997; Maslov, 1998). Although our dataset has  
296 followed these criteria, the nature of our analyses does not allow us to rule out the influence of the  
297 “long-branch attraction” in our results. Nevertheless, it is important to note that our scenario is  
298 supported by phylogenomic studies which have shown a deep branching of African trypanosomes  
299 (Kelly et al., 2014; Galen et al., 2020).

300         The subgenus *Squamatrypanum* is composed of trypanosomes of marsupials, rodents,  
301 snakes, and lizards (Kostygov et al., 2021) and there is still no consensus about its relationship with  
302 other subgenera. Studies using concatenated analyses of gGAPDH and 18S rDNA suggest the  
303 divergence of this subgenus in recent events (Viola et al., 2009; Ferreira et al., 2017; Fermino et al.,  
304 2019). However, these analyses proposed distinct sister groups for *Squamatrypanum*:  
305 *Megatrypanum* (Viola et al., 2009), *Australotrypanum* + *T. pestanai* + African trypanosomes  
306 (*Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*) (Ferreira et al., 2017), and trypanosomes of birds  
307 (Fermino et al., 2019). In addition, our concatenated analysis displays *Squamatrypanum* as a sister  
308 group of *Ornithotrypanum* + *T. irwini*. The dataset and the outgroup used in all of these different  
309 analyses may have impacted the distinct scenarios presented by them. This suggests that the  
310 concatenated analysis of gGAPDH and 18S rDNA cannot resolve the evolutionary relationships of  
311 *Squamatrypanum* while the sequence-structure method seems to be less influenced by these aspects  
312 (Borges et al., 2021a).

313 It is accepted that the accidental transmission and survival of a monoxenous trypanosomatid  
314 in a vertebrate host would have allowed the origin of *Trypanosoma* (Lukeš et al., 2014; Hamilton  
315 and Stevens, 2017). This likely occurred around 283-231 million years ago (Lukeš et al., 2014), in  
316 the Late Cretaceous, which is much earlier than the first appearance of marsupials, ~86 million  
317 years ago, or even metatherians, ~160 million years ago (Pascual, 2006; Mitchell et al., 2014;  
318 Williamson et al., 2014). Thus, our sequence-structure phylogeny, allows us to hypothesize the  
319 radiation of trypanosomes through marsupials. In this scenario, infected animals could have carried  
320 trypanosomes during migration from South America to Australia (Pascual, 2006; Mitchell et al.,  
321 2014). This dispersion subjected the parasites to different ecological pressures that could have  
322 influenced the divergence of three subgenera that are still recorded in marsupials  
323 (*Australotrypanum*, *Schizotrypanum*, and *Aneza*) as well as one potential subgenus (*T. noyesi*) and  
324 one *incertae sedis* taxon (*T. irwini*) (Silva et al., 2004; Lima et al., 2015; Botero et al., 2016;  
325 Barbosa et al., 2017; Hamilton and Stevens, 2017).

326

## 327 **5. Conclusions**

328 Although largely used in phylogenetic studies, the 18S rDNA is not always able to resolve  
329 the positioning of taxa, especially when the inter-specific distance is small (Tang et al., 2012;  
330 Hamilton and Stevens, 2017). Because the concatenation of this marker with gGAPDH increased  
331 the resolution of phylogenetic trees, this approach became the most common method for  
332 trypanosome phylogeny and taxonomy (Hamilton and Stevens, 2017). However, careful curation of  
333 the data retrieved from repositories will show that some species lineages do not have the  
334 information for both sequences available. This is potentially problematic if we take into  
335 consideration the discrepancies in *Trypanosoma* taxonomy. In this way, finding alternatives to infer  
336 phylogenetic relationships with high resolution from the 18S rDNA would benefit the study of  
337 trypanosomes.

338 Overall, the sequence-structure analysis represents a suitable method for phylogenetic  
339 inferences of *Trypanosoma*. The low influence of the dataset on subgenera recovery advocates its  
340 use as an alternative method for taxonomical studies, especially when a concatenated analysis is not  
341 possible. By allowing the investigation of species that cannot be studied by concatenated analysis,  
342 the sequence-structure method can increase our knowledge of the evolution of such an important  
343 group of parasites.

344

#### 345 **CRedit authorship contribution statement**

346 **Mylena B. Lima:** Investigation, Writing - original draft. **Alyssa R. Borges:** Conceptualization,  
347 Investigation, Supervision, Writing - original draft. **Markus Engstler:** Writing - Review & Editing.  
348 **Matthias Wolf:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing – original draft. **Roberto**  
349 **Júnio Pedroso Dias:** Investigation, Supervision, Writing - Review & Editing. **Mariana F. Rossi:**  
350 Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing - original draft.

351

#### 352 **Acknowledgments**

353 We thank Dr. Sthefane D'ávila for her advice and scientific discussion. A Ph.D. scholarship  
354 was granted to AB by the Brazilian agency CAPES (program: CAPES/DAAD - Call No. 22/2018;  
355 process 88881.199683/2018-01). ME is supported by DFG grants EN305, SPP1726, GIF grant I-  
356 473-416.13/2018, and GRK2157. ME is a member of the Wilhelm Conrad Röntgen Center for  
357 Complex Material Systems (RCCM).

358

#### 359 **References**

360 Acosta, I. da C., da Costa, A.P., Nunes, P.H., Gondim, M.F.N., Gatti, A., Rossi Jr, J.L., Gennari,  
361 S.M., Marcili, A., 2013. Morphological and molecular characterization and phylogenetic  
362 relationships of a new species of trypanosome in *Tapirus terrestris* (lowland tapir), *Trypanosoma*



363 *terrestris* sp. nov., from Atlantic Rainforest of southeastern Brazil. Parasit Vectors 6, 349.  
364 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-349>

365 Ankenbrand, M.J., Keller, A., Wolf, M., Schultz, J., Förster, F., 2015. ITS2 database V: twice as  
366 much. Mol. Biol. Evol. 32, 3030–3032. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv174>

367 Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge,  
368 D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M.J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M.,  
369 Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W.,  
370 Logan, F.J., Miller, J.A., Mitra, S., Myler, P.J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D.F.,  
371 Ramasamy, G., Rogers, M.B., Roos, D.S., Ross, C., Sivam, D., Smith, D.F., Srinivasamoorthy, G.,  
372 Stoeckert, C.J., Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G., Wang, H.,  
373 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. Nucleic Acids Res 38,  
374 D457-462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>

375 Austen, J.M., Ryan, U.M., Friend, J.A., Ditcham, W.G.F., Reid, S.A., 2011. Vector of  
376 *Trypanosoma copemani* identified as *Ixodes* sp. Parasitology 138, 866–872.  
377 <https://doi.org/10.1017/S0031182011000497>

378 Barbosa, A.D., Gofton, A.W., Paparini, A., Codello, A., Greay, T., Gillett, A., Warren, K., Irwin,  
379 P., Ryan, U., 2017. Increased genetic diversity and prevalence of co-infection with *Trypanosoma*  
380 spp. in koalas (*Phascolarctos cinereus*) and their ticks identified using next-generation sequencing  
381 (NGS). PLOS ONE 12, e0181279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181279>

382 Barbosa, A.D., Mackie, J.T., Stenner, R., Gillett, A., Irwin, P., Ryan, U., 2016. *Trypanosoma*  
383 *teixeirae*: a new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomosis in an Australian  
384 little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). Vet Parasitol 223, 214–221.  
385 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.002>

386 Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., Sayers, E.W.,  
387 2018. GenBank. Nucleic Acids Res 46, D41–D47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1094>

388 Borges, A.R., Engstler, M., Wolf, M., 2021a. 18S rRNA gene sequence-structure phylogeny of the  
389 Trypanosomatida (Kinetoplastea, Euglenozoa) with special reference to *Trypanosoma*. Eur. J.  
390 Protistol. 81, 125824. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125824>

391 Borges, A.R., Link, F., Engstler, M., Jones, N.G., 2021b. The glycosylphosphatidylinositol anchor:  
392 a linchpin for cell surface versatility of trypanosomatids. Front Cell Dev Biol 9, 720536.  
393 <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.720536>

394 Botero, A., Cooper, C., Thompson, C.K., Clode, P.L., Rose, K., Thompson, R.C.A., 2016.  
395 Morphological and phylogenetic description of *Trypanosoma noyesi* sp. nov.: an Australian wildlife  
396 trypanosome within the *T. cruzi* clade. Protist 167, 425–439.  
397 <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.07.002>

398 Botero, A., Thompson, C.K., Peacock, C.S., Clode, P.L., Nicholls, P.K., Wayne, A.F., Lymbery,  
399 A.J., Thompson, R.C.A., 2013. Trypanosomes genetic diversity, polyparasitism and the population  
400 decline of the critically endangered Australian marsupial, the brush tailed bettong or woylie  
401 (*Bettongia penicillata*). Int J Parasitol Parasites Wildl 2, 77–89.  
402 <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.03.001>

403 Buchheim, M.A., Keller, A., Koetschan, C., Förster, F., Merget, B., Wolf, M., 2011. Internal  
404 transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated  
405 reconstruction of the green algal tree of life. PLOS ONE 6, e16931.  
406 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016931>

407 Buchheim, M.A., Müller, T., Wolf, M., 2017. 18S rDNA sequence-structure phylogeny of the  
408 Chlorophyceae with special emphasis on the Sphaeropleales. Plant Gene 10, 45–50.  
409 <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.05.005>

410 Buchheim, M.A., Sutherland, D.M., Schleicher, T., Förster, F., Wolf, M., 2012. Phylogeny of  
411 Oedogoniales, Chaetophorales and Chaetopeltidales (Chlorophyceae): inferences from sequence-  
412 structure analysis of ITS2. *Ann Bot* 109, 109–116. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr275>

413 Cannone, J.J., Subramanian, S., Schnare, M.N., Collett, J.R., D’Souza, L.M., Du, Y., Feng, B., Lin,  
414 N., Madabusi, L.V., Müller, K.M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., Gutell, R.R., 2002. The  
415 Comparative RNA Web (CRW) Site: an online database of comparative sequence and structure  
416 information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics* 3, 2.  
417 <https://doi.org/10.1186/1471-2105-3-2>

418 Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in  
419 phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.  
420 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>

421 Cross, G.A., 1975. Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens  
422 constituting the surface coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* 71, 393–417.  
423 <https://doi.org/10.1017/s003118200004717x>

424 Dario, M.A., Lisboa, C.V., Costa, L.M., Moratelli, R., Nascimento, M.P., Costa, L.P., Leite, Y.L.R.,  
425 Llewellyn, M.S., Xavier, S.C. das C., Roque, A.L.R., Jansen, A.M., 2017. High *Trypanosoma* spp.  
426 diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. *PLOS One* 12,  
427 e0188412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188412>

428 Deane, M., Jansen, A., 1988. From a mono to a digenetic life-cycle: how was the jump for  
429 flagellates of the family Trypanosomatidae? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83, 273–275.  
430 <https://doi.org/10.1590/s0074-02761988000300002>

431 Fermino, B.R., Paiva, F., Soares, P., Tavares, L.E.R., Viola, L.B., Ferreira, R.C., Botero-Arias, R.,  
432 de-Paula, C.D., Campaner, M., Takata, C.S.A., Teixeira, M.M.G., Camargo, E.P., 2015. Field and  
433 experimental evidence of a new caiman trypanosome species closely phylogenetically related to fish

434 trypanosomes and transmitted by leeches. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 4, 368–378.  
435 <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.10.005>

436 Fermino, B.R., Paiva, F., Viola, L.B., Rodrigues, C.M.F., Garcia, H.A., Campaner, M., Takata,  
437 C.S.A., Sheferaw, D., Kisakye, J.J., Kato, A., Jared, C.A.G.S., Teixeira, M.M.G., Camargo, E.P.,  
438 2019. Shared species of crocodylian trypanosomes carried by tabanid flies in Africa and South  
439 America, including the description of a new species from caimans, *Trypanosoma kaiowa* n. sp.  
440 *Parasit Vectors* 12, 225. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3463-2>

441 Fermino, B.R., Viola, L.B., Paiva, F., Garcia, H.A., de Paula, C.D., Botero-Arias, R., Takata,  
442 C.S.A., Campaner, M., Hamilton, P.B., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2013. The  
443 phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodylids is  
444 consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal  
445 of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasit Vectors* 6, 313. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-313>

446 Ferreira, J.I.G.S., da Costa, A.P., Nunes, P.H., Ramirez, D., Fournier, G.F.R., Saraiva, D.,  
447 Tonhosolo, R., Marcili, A., 2017. New *Trypanosoma* species, *Trypanosoma gennarii* sp. nov., from  
448 South American marsupial in Brazilian Cerrado. *Acta Trop* 176, 249–255.  
449 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.018>

450 Fraga, J., Fernández-Calienes, A., Montalvo, A., Maes, I., Deborggraeve, S., Büscher, P., Dujardin,  
451 J., Van der Auwera, G., 2016. Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-  
452 shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol.* 43, 165–172.  
453 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.016>

454 Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user  
455 interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27, 221–224.  
456 <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>

457 Haag, J., O’Uigin, C., Overath, P., 1998. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for  
458 an early divergence of the Salivaria. *Mol Biochem Parasitol* 91, 37–49.  
459 [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00185-0)

460 Hamilton, P.B., Gibson, W.C., Stevens, J.R., 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes  
461 and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Mol.*  
462 *Phylogenet. Evol.* 44, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.023>

463 Hamilton, P.B., Stevens, J.R., 2017. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*, in:  
464 Telleria, J., Tibayrenc, M. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier, London,  
465 pp. 321–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00015-0>

466 Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., Gibson, W.C., 2004. Trypanosomes are  
467 monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit  
468 ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 34, 1393–1404. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.011>

469 Heeg, J.S., Wolf, M., 2015. ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and  
470 allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). *Plant Gene* 4, 20–28.  
471 <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.08.001>

472 Hegewald, E., Wolf, M., Keller, A., Friedl, T., Krienitz, L., 2010. ITS2 sequence-structure  
473 phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta,  
474 Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycologia* 49, 325–  
475 335. <https://doi.org/10.2216/09-61.1>

476 Hoare, C.A., 1973. *The trypanosomes of mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

477 Hughes, A.L., Piontkivska, H., 2003. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae  
478 (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera.  
479 *Mol Biol Evol* 20, 644–652. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg062>

480 Jakes, K.A., O'Donoghue, P.J., Adlard, R.D., 2001. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma*  
481 *chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small  
482 subunit rRNA analyses. *Parasitology* 123, 483–487. <https://doi.org/10.1017/s0031182001008721>

483 Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7:  
484 improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30, 772–780.  
485 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

486 Kaufer, A., Stark, D., Ellis, J., 2019. Evolutionary insight into the Trypanosomatidae using  
487 alignment-free phylogenomics of the kinetoplast. *Pathogens* 8, 157.  
488 <https://doi.org/10.3390/pathogens8030157>

489 Keller, A., Förster, F., Müller, T., Dandekar, T., Schultz, J., Wolf, M., 2010. Including RNA  
490 secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees.  
491 *Biol. Direct* 5, 4. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-4>

492 Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through  
493 comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111–120.  
494 <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

495 Koetschan, C., Kittelmann, S., Lu, J., Al-Halbouni, D., Jarvis, G.N., Müller, T., Wolf, M., Janssen,  
496 P.H., 2014. Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core  
497 throughout the anaerobic fungi (Neocallimastigomycota). *PLOS ONE* 9, e91928.  
498 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091928>

499 Kostygov, A.Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V.,  
500 Lukeš, J., 2021. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biol*  
501 11, 200407. <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>

502 Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis  
503 version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870–1874.  
504 <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

505 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H.,  
506 Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G.,  
507 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.  
508 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

509 Laveran, A., Mesnil, F., 1912. *Trypanosomes et trypanosomiasés*, 2nd ed. Masson, Paris.

510 Lemos, M., Fermino, B.R., Simas-Rodrigues, C., Hoffmann, L., Silva, R., Camargo, E.P., Teixeira,  
511 M.M.G., Souto-Pradón, T., 2015. Phylogenetic and morphological characterization of trypanosomes  
512 from Brazilian armoured catfishes and leeches reveal high species diversity, mixed infections and a  
513 new fish trypanosome species. *Parasit Vectors* 8, 573. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1193-7>

514 Lim, H.C., Teng, S.T., Lim, P.T., Wolf, M., Leaw, C.P., 2016. 18S rDNA phylogeny of *Pseudo-*  
515 *nitzschia* (Bacillariophyceae) inferred from sequence-structure information. *Phycologia* 55, 134–  
516 146. <https://doi.org/10.2216/15-78.1>

517 Lima, L., Silva, F.M. da, Neves, L., Attias, M., Takata, C.S.A., Campaner, M., de Souza, W.,  
518 Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G., 2012. Evolutionary insights from bat trypanosomes:  
519 morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma*  
520 (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*)  
521 *cruzi* and allied species. *Protist* 163, 856–872. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.12.003>

522 Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Hamilton, P.B., Neves, L., Takata, C.S.A., Campaner, M., Attias,  
523 M., de Souza, W., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2013. *Trypanosoma livingstonei*: a new  
524 species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade.  
525 *Parasit Vectors* 6, 221. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-221>

526 Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J.A., Carranza, J.C., Pinto, C.M.,  
527 Serrano, M.G., Buck, G.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2015. Genetic diversity of  
528 *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting  
529 Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* 151, 166–177.  
530 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>

531 Lizundia, R., Newman, C., Buesching, C.D., Ngugi, D., Blake, D., Sin, Y.W., Macdonald, D.W.,  
532 Wilson, A., McKeever, D., 2011. Evidence for a role of the host-specific flea (*Paraceras melis*) in  
533 the transmission of *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* to the European badger. *PLOS ONE* 6,  
534 e16977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016977>

535 Lukeš, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D.A., Votýpka, J., Yurchenko, V., 2018.  
536 Trypanosomatids are much more than just trypanosomes: clues from the expanded family tree.  
537 *Trends Parasitol.* 34, 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.03.002>

538 Lukeš, J., Skalický, T., Týč, J., Votýpka, J., Yurchenko, V., 2014. Evolution of parasitism in  
539 kinetoplastid flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 115–122.  
540 <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.05.007>

541 Markert, S.M., Müller, T., Koetschan, C., Friedl, T., Wolf, M., 2012. 'Y' Scenedesmus  
542 (Chlorophyta, Chlorophyceae): the internal transcribed spacer 2 rRNA secondary structure re-  
543 revisited. *Plant Biol (Stuttg)* 14, 987–996. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00576.x>

544 Martin, D.S., Wright, A.-D.G., Barta, J.R., Desser, S.S., 2002. Phylogenetic position of the giant  
545 anuran trypanosomes *Trypanosoma chattoni*, *Trypanosoma fallisi*, *Trypanosoma mega*,  
546 *Trypanosoma neveulemairei*, and *Trypanosoma ranarum* inferred from 18S rRNA gene sequences.  
547 *J. Parasitol.* 88, 566–571. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0566:PPOTGA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0566:PPOTGA]2.0.CO;2)

548 Maslov, D.A., Lukes, J., Jirku, M., Simpson, L., 1996. Phylogeny of trypanosomes as inferred from  
549 the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the



550 trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 75, 197–205. <https://doi.org/10.1016/0166->  
551 6851(95)02526-x

552 McInnes, L.M., Gillett, A., Ryan, U.M., Austen, J., Campbell, R.S.F., Hanger, J., Reid, S.A., 2009.  
553 *Trypanosoma irwini* n. sp (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae) from the koala (*Phascolarctos*  
554 *cinereus*). *Parasitology* 136, 875–885. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006313>

555 McInnes, L.M., Hanger, J., Simmons, G., Reid, S.A., Ryan, U.M., 2011. Novel trypanosome  
556 *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of  
557 *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctos cinereus*). *Parasitology* 138, 59–70.  
558 <https://doi.org/10.1017/S0031182010000971>

559 Mitchell, K.J., Pratt, R.C., Watson, L.N., Gibb, G.C., Llamas, B., Kasper, M., Edson, J., Hopwood,  
560 B., Male, D., Armstrong, K.N., Meyer, M., Hofreiter, M., Austin, J., Donnellan, S.C., Lee, M.S.Y.,  
561 Phillips, M.J., Cooper, A., 2014. Molecular phylogeny, biogeography, and habitat preference  
562 evolution of marsupials. *Mol Biol Evol* 31, 2322–2330. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu176>

563 Nabhan, A.R., Sarkar, I.N., 2012. The impact of taxon sampling on phylogenetic inference: a  
564 review of two decades of controversy. *Brief Bioinform* 13, 122–134.  
565 <https://doi.org/10.1093/bib/bbr014>

566 Noyes, H. a, Stevens, J.R., Teixeira, M., Phelan, J., Holz, P., 1999. A nested PCR for the *ssrRNA*  
567 gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos  
568 in Australia<sup>1</sup>. *Int. J. Parasitol.* 29, 331–339. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00167-2)

569 Ortiz, P.A., Garcia, H.A., Lima, L., da Silva, F.M., Campaner, M., Pereira, C.L., Jittapalapong, S.,  
570 Neves, L., Desquesnes, M., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2018. Diagnosis and genetic analysis  
571 of the worldwide distributed *Rattus*-borne *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *lewisi* and its allied species  
572 in blood and fleas of rodents. *Infect. Genet. Evol.* 63, 380–390.  
573 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.001>

574 Pascual, R., 2006. Evolution and geography: the biogeographic history of south american land  
575 mammals. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 93, 209–230. [https://doi.org/10.3417/0026-](https://doi.org/10.3417/0026-6493(2006)93[209:EAGTBH]2.0.CO;2)  
576 [6493\(2006\)93\[209:EAGTBH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/0026-6493(2006)93[209:EAGTBH]2.0.CO;2)

577 Pérez, S.D., Grummer, J.A., Fernandes-Santos, R.C., José, C.T., Medici, E.P., Marcili, A., 2019.  
578 Phylogenetics, patterns of genetic variation and population dynamics of *Trypanosoma terrestris*  
579 support both coevolution and ecological host-fitting as processes driving trypanosome evolution.  
580 *Parasit Vectors* 12, 473. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3726-y>

581 Plieger, T., Wolf, M., 2022. 18S and ITS2 rDNA sequence-structure phylogeny of *Prototheca*  
582 (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Biologia* 77, 569–582. [https://doi.org/10.1007/s11756-021-](https://doi.org/10.1007/s11756-021-00971-y)  
583 [00971-y](https://doi.org/10.1007/s11756-021-00971-y)

584 R Core Team, 2014. R: a language and environment for statistical computing.

585 Rabinowitz, P.D., Coffin, M.F., Falvey, D., 1983. The separation of Madagascar and Africa.  
586 *Science* 220, 67–69. <https://doi.org/10.1126/science.220.4592.67>

587 Reddy, S., Kimball, R.T., Pandey, A., Hosner, P.A., Braun, M.J., Hackett, S.J., Han, K.-L.,  
588 Harshman, J., Huddleston, C.J., Kingston, S., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon,  
589 F.H., Witt, C.C., Yuri, T., Braun, E.L., 2017. Why do phylogenomic data sets yield conflicting  
590 trees? Data type influences the avian tree of life more than taxon sampling. *Syst Biol* 66, 857–879.  
591 <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx041>

592 Rodrigues, A.C., Neves, L., Garcia, H.A., Viola, L.B., Marcili, A., Da Silva, F.M., Sigauque, I.,  
593 Batista, J.S., Paiva, F., Teixeira, M.M.G., 2008. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax*  
594 supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T.*  
595 *vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. *Parasitology* 135, 1317–1328.  
596 <https://doi.org/10.1017/S0031182008004848>

597 Schliep, K.P., 2011. Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics* 27, 592–593.  
598 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>

599 Seibel, P.N., Müller, T., Dandekar, T., Schultz, J., Wolf, M., 2006. 4SALE – A tool for  
600 synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 7,  
601 498. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-498>

602 Seibel, P.N., Müller, T., Dandekar, T., Wolf, M., 2008. Synchronous visual analysis and editing of  
603 RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Res Notes* 1, 91.  
604 <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-91>

605 Sgroi, G., Iatta, R., Paolo Lia, R., Latrofa, M.S., Samarelli, R., Camarda, A., Otranto, D., 2021.  
606 *Trypanosoma (Megatrypanum) pestanai* in Eurasian badgers (*Meles meles*) and Ixodidae ticks,  
607 Italy. *Parasitology* 148, 1516–1521. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001190>

608 Silva, F.M.D., Noyes, H., Campaner, M., Junqueira, A.C.V., Coura, J.R., Añez, N., Shaw, J.J.,  
609 Stevens, J.R., Teixeira, M.M.G., 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli*  
610 isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based  
611 on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129, 549–561.  
612 <https://doi.org/10.1017/S0031182004005931>

613 Silva Pereira, S., de Almeida Castilho Neto, K.J.G., Duffy, C.W., Richards, P., Noyes, H., Ogugo,  
614 M., Rogério André, M., Bengaly, Z., Kemp, S., Teixeira, M.M.G., Machado, R.Z., Jackson, A.P.,  
615 2020. Variant antigen diversity in *Trypanosoma vivax* is not driven by recombination. *Nat.*  
616 *Commun* 11, 844. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14575-8>

617 Šlapeta, J., Morin-Adeline, V., Thompson, P., McDonell, D., Shiels, M., Gilchrist, K., Votýpka, J.,  
618 Vogelnest, L., 2016. Intercontinental distribution of a new trypanosome species from Australian  
619 endemic Regent Honeyeater (*Anthochaera phrygia*). *Parasitology* 143, 1012–1025.  
620 <https://doi.org/10.1017/S0031182016000329>

621 Spodareva, V.V., Grybchuk-Ieremenko, A., Losev, A., Votýpka, J., Lukeš, J., Yurchenko, V.,  
622 Kostygov, A.Y., 2018. Diversity and evolution of anuran trypanosomes: insights from the study of  
623 European species. *Parasit Vectors* 11, 447. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3023-1>

624 Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large  
625 phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

626 Stevens, J., Rambaut, A., 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect. Genet. Evol.*  
627 1, 143–150. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(01\)00018-1](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(01)00018-1)

628 Stevens, J.R., Noyes, H.A., Dover, G.A., Gibson, W.C., 1999. The ancient and divergent origins of  
629 the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118, 107–116.  
630 <https://doi.org/10.1017/s0031182098003473>

631 Tang, C.Q., Leasi, F., Obertegger, U., Kieneker, A., Barraclough, T.G., Fontaneto, D., 2012. The  
632 widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity  
633 surveys of the meiofauna. *PNAS* 109, 16208–16212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209160109>

634 Tavaré, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences.  
635 *Lect. math. life sci.* 57–86.

636 Vickerman, K., 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J Cell Sci* 5, 163–  
637 193.

638 Viola, L.B., Attias, M., Takata, C.S.A., Campaner, M., De Souza, W., Camargo, E.P., Teixeira,  
639 M.M.G., 2009. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal  
640 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake  
641 Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli*  
642 from *Crotalus durissus terrificus*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56, 594–602.  
643 <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00444.x>

644 Votýpka, J., Szabová, J., Rádřová, J., Zídková, L., Svobodová, M., 2012. *Trypanosoma culicavium*  
645 sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62,  
646 745–754. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032110-0>

647 Votýpka, J., Kostygov, A.Y., Kraeva, N., Grybchuk-Ieremenko, A., Tesařová, M., Grybchuk, D.,  
648 Lukeš, J., Yurchenko, V., 2014. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing  
649 trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist* 165, 825–838.  
650 <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.09.002>

651 Votýpka, J., d'Avila-Levy, C.M., Grellier, P., Maslov, D.A., Lukeš, J., Yurchenko, V., 2015. New  
652 approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re)description. *Trends*  
653 *Parasitol.* 31, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015>

654 Keller, A., Wolf, M., 2009. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation  
655 of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*). *BMC*  
656 *Evol Biol* 9, 300. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-300>

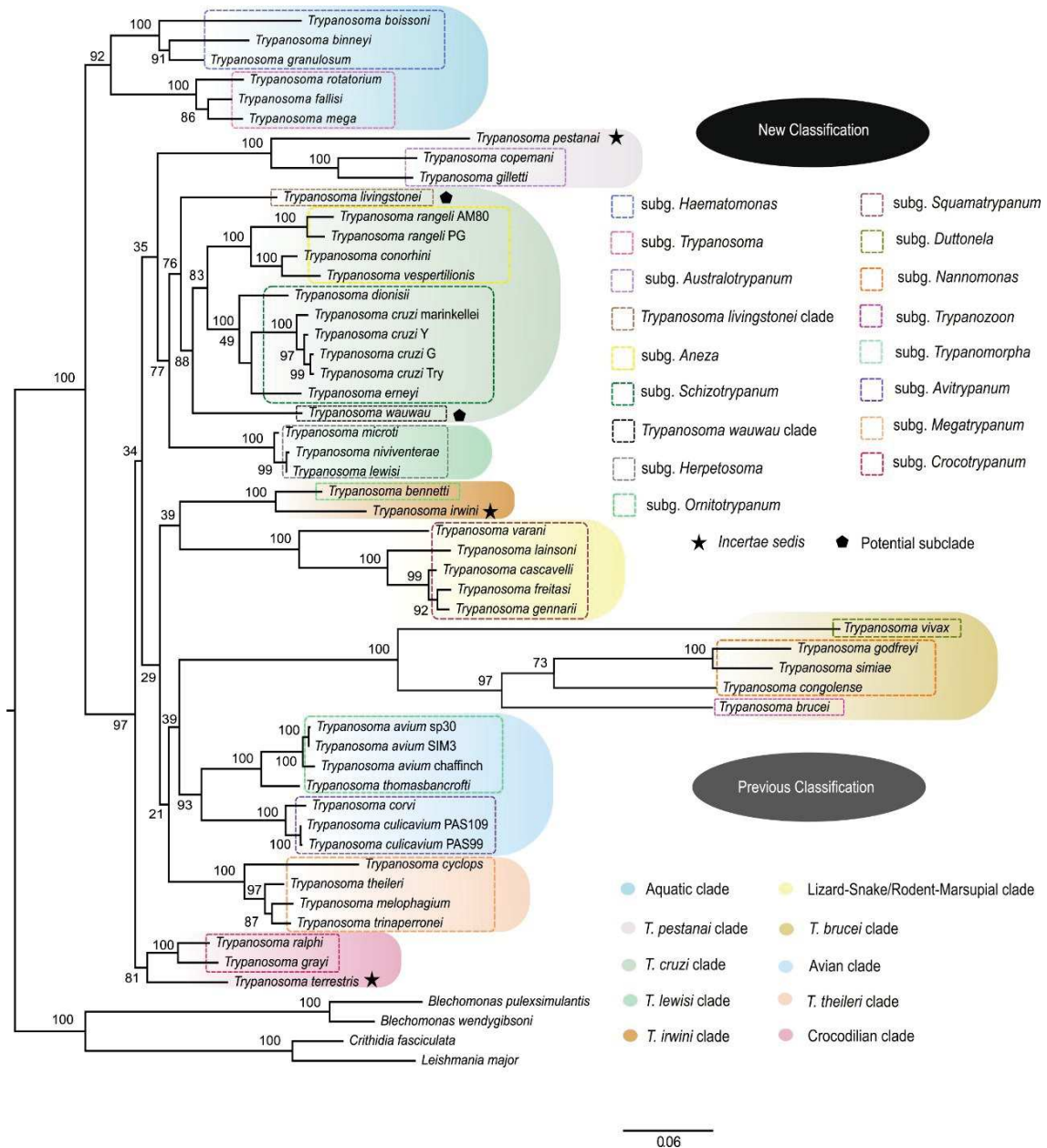
657 Williamson, T.E., Brusatte, S.L., Wilson, G.P., 2014. The origin and early evolution of metatherian  
658 mammals: the Cretaceous record. *Zookeys* 1–76. <https://doi.org/10.3897/zookeys.465.8178>

659 Wolf, M., Koetschan, C., Müller, T., 2014. ITS2, 18S, 16S or any other RNA - simply aligning  
660 sequences and their individual secondary structures simultaneously by an automatic approach. *Gene*  
661 546, 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.065>

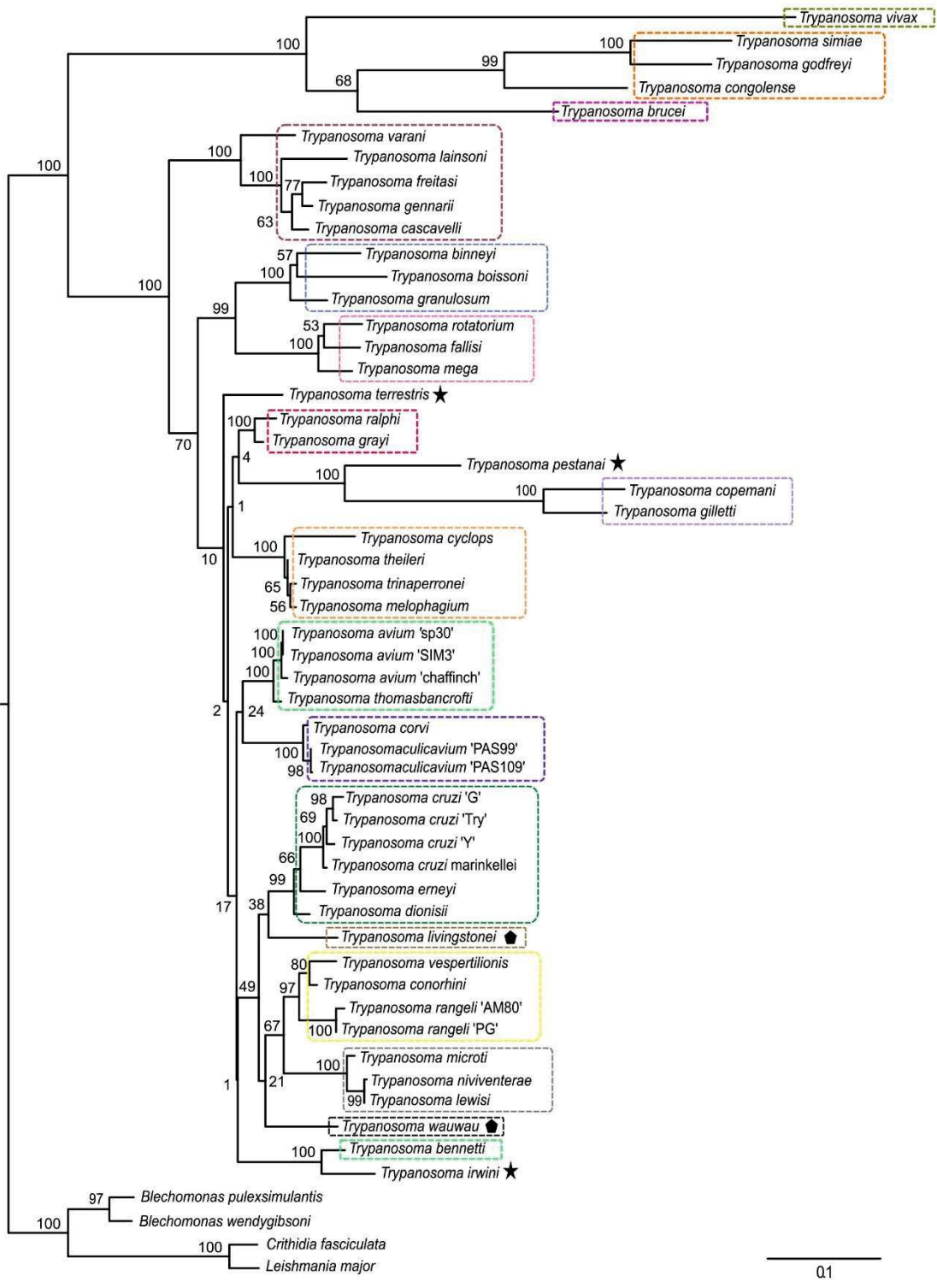
662 Yang, Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable  
663 rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol* 39, 306–314.  
664 <https://doi.org/10.1007/BF00160154>

665 Yurchenko, V., Butenko, A., Kostygov, A.Y., 2021. Genomics of Trypanosomatidae: where we  
666 stand and what needs to be done? *Pathogens* 10, 1124. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091124>

- 667 Zídková, L., Cepicka, I., Szabová, J., Svobodová, M., 2012. Biodiversity of avian trypanosomes.
- 668 *Infect Genet Evol* 12, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.022>
- 669



**Fig. 1.** Concatenate phylogeny of gGAPDH and V7V8 18S rDNA obtained by Maximum Likelihood with bootstrap values of 150 pseudo-replicates. The tree is rooted at non-*Trypanosoma* trypanosomatids. The classification by clades, as explained in Hamilton and Stevens (2017), as well as the new classification by subgenera (subg.), of Kostygov et al. (2021), are depicted. The scale bar indicates evolutionary distances.

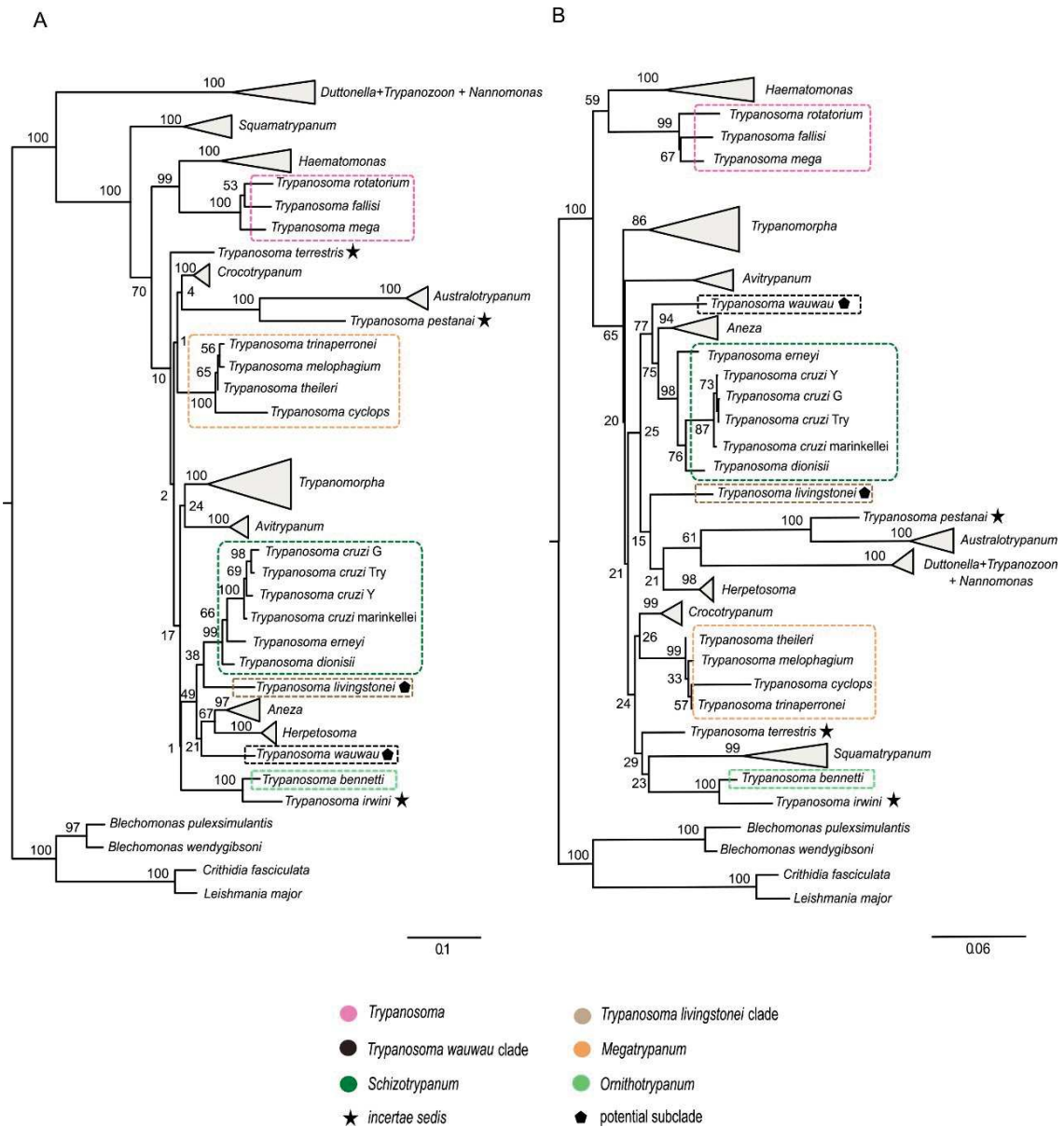


- subg. *Haematomonas*
- subg. *Trypanosoma*
- subg. *Australotrypanum*
- *Trypanosoma livingstonei* clade
- subg. *Aneza*
- subg. *Schizotrypanum*
- *Trypanosoma wauwau* clade
- subg. *Herpetosoma*
- subg. *Ornithotrypanum*
- subg. *Squamotrypanum*
- subg. *Duttonella*
- subg. *Nannomonas*
- subg. *Trypanozoon*
- subg. *Trypanomorpha*
- subg. *Avitrypanum*
- subg. *Megatrypanum*
- subg. *Crocotrypanum*

★ *Incertae sedis*      ◆ Potential subclade



**Fig. 2.** 18S rDNA sequence-structure tree obtained by Maximum Likelihood with the same taxon sampling of Fig. 1. Bootstrap values from 100 pseudo-replicates are mapped at the appropriate internodes. The scale bar indicates evolutionary distances. The tree is rooted at non-*Trypanosoma* trypanosomatids using the same species of Fig. 1. The classification by subgenera (subg.), of Kostygov et al. (2021), is depicted.



**Fig. 3.** Comparison between 18S rDNA tree topologies. (A) Consensus tree of the sequence-structure method (A) is presented side-by-side with the tree generated based only on long sequences (> 1500 bp) of the same gene (B). Both trees were generated from the same taxon sampling and rooted by non-*Trypanosoma* trypanosomatids. Trees were estimated by Maximum Likelihood using 100 and 800 pseudo-replicates, respectively. The scale bar indicates evolutionary distances. The classification by subgenera, of Kostygov et al. (2021), is depicted. Subgenera that do not show differences in the inter-specific relationships were collapsed.

### 3. CONCLUSÃO

1. A análise de sequência-estrutura demonstrou ser uma importante ferramenta para acessar relações filogenéticas profundas entre as espécies de tripanossomas.
2. A análise de sequência-estrutura foi sensível a táxons que geram artefatos ou considerados como *incertae sedis*
3. A metodologia conseguiu resgatar todos os subgêneros conhecidos, com máximo valor de suporte, mesmo utilizando apenas um marcador molecular (SSU 18S rDNA)
4. O presente trabalho revelou uma abordagem confiável e robusta da metodologia de sequência-estrutura, sendo uma proposta viável às análises filogenéticas em *Trypanosoma*.

**MATERIAL SUPPLEMENTAR**

**Tabela 1:** Primers utilizados para a extração via PCR *in silico* da região V7V8 das sequências de tripanossomas e grupo externo. (\*) Primer reverso distinto utilizado apenas no caso da reação *in silico* de *Trypanosoma brucei brucei*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' para 3')</b>	<b>Referências</b>
609F	CACCCCGCGGTAATTCCAGC	Lemos et al., (2015)
706R	TCTGAGACTGTAACCTCAA	Lemos <i>et al.</i> , (2015)
561R*	CTGAGACTGTAACCTCAAAGC	Noyes et al., (1999)

**Tabela 2:** Compilado das sequências utilizadas de tripanossomas, seus respectivos hospedeiros, localização geográfica e referência bibliográfica.

<b>Espécies de Tripanossomas</b>	<b>Linhagens</b>	<b>SSU rDNA</b>	<b>gGAPDH</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Localização</b>	<b>Referência</b>
	chaffinch				República	
<i>Trypanosoma avium</i>	(LSHTM)	AJ009140	AJ620263	<i>Fringilla coelebs</i>	Tcheca	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
					República	
<i>Trypanosoma avium</i>	SIM3	AF416563	FJ649487	<i>Eusimulium securiforme</i>	Tcheca	Votýpka et al., (2002)
<i>Trypanosoma avium</i>	sp30	FJ649482	FJ649490	NI	Austrália	McInnes et al., (2009)
<i>Trypanosoma bennetti</i>	KT-2	AJ223562	FJ649486	Ácaros	NI	Haag, O'hUigin, and Overath (1998)
<i>Trypanosoma binney</i>	AAW	AJ620565	AJ620266	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Austrália	Hamilton et al., (2005)
				<i>Glossina morsitans</i> <i>submorsitans</i> (mosca		
<i>Trypanosoma godfreyi</i>	KEN7	AJ009155	AM50335	Tsésésé)	Gâmbia	Stevens, Noyes and Gibson (1998)

<i>Trypanosoma mega</i>	ATCC 30038	AJ009157	AJ620253	<i>Bufo regularis</i>	África	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma cascavelli</i>	TryCC 425	EU095837	FJ236511	<i>Crotalus durissus</i>	Brasil	Viola et al., (2008)
				<i>Corvus frugilegus</i>		
<i>Trypanosoma corvi</i>	ITMAP 180795	AY461665	FJ649496	<i>frugilegus</i>	Reino Unido	Votýpka, Lukes and Obornik (2004)
					República	
<i>Trypanosoma culicavium</i>	PAS109	HQ107966	HQ906659	<i>Ficedula albicollis</i>	Tcheca	Votýpka et al., (2012)
					República	
<i>Trypanosoma culicavium</i>	PAS99	HQ107969	HQ906658	<i>Ficedula albicollis</i>	Tcheca	Votýpka et al., (2012)
<i>Trypanosoma cyclops</i>	LV492	AJ131958	FJ649493	NI	NI	NI
<i>Trypanosoma freitasi</i>	TCC09	MF401951	MF401952	<i>Monodelphis brevicaudata</i>	Brasil	Ortiz et al., (2018)
<i>Trypanosoma gennarii</i>	CBT 160	KT343360	KT343368	<i>Monodelphis domestica</i>	Brasil	Ferreira et al., (2017)
<i>Trypanosoma gilletti</i>	Lanie	GU966589	GU966587	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Austrália	McInnes et al., (2011)
<i>Trypanosoma</i>						
<i>melophagium</i>	TmHR1	HQ664912	HQ664807	<i>Melophagus ovinus</i>	Croácia	Garcia et al., (2011)
<i>Trypanosoma microti</i>	TRL132	AJ009158	AJ620273	<i>Microtis agrestis</i>	Inglaterra	Stevens, Noyes and Gibson (1998)

<i>Trypanosoma pestanai</i>	LEM110	AJ009159	AJ620275	<i>Meles meles</i>	França	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma ralphi</i>	TCC1829	KF546521	KF546511	<i>Caiman crocodilus</i>	Brasil	Fermino et al., (2013)
<i>Trypanosoma</i>						
<i>vespertilionis</i>	P14	AJ009166	AJ620283	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Inglaterra	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma boissoni</i>	ITMAP 2211	U39580	AJ620245	<i>Zanobatus atlanticus</i>	Senegal	Maslov et al., (1996)
<i>Trypanosoma conorhini</i>	USP	AJ012411	AJ620267	<i>Rattus rattus</i>	Brasil	Stevens et al., (1999)
<i>Trypanosoma copemani</i>	koala Charlton	GU966588	GU966584	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Austrália	McInnes et al., (2011)
<i>Trypanosoma granulosum</i>	UK	AJ620551	AJ620247	<i>Anguilla anguilla</i>	NI	Hamilton (2003)
				<i>Glossina palpalis</i>		
<i>Trypanosoma grayi</i>	ANR4	AJ005278	AM503352	<i>gambiensis</i>	Gâmbia	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma irwini</i>		FJ649479	FJ649485	<i>Phascolarctos cinereus</i>	Austrália	McInnes et al., (2009)
<i>Trypanosoma lainsoni</i>	TCC948	MF403111	MF406153	<i>Oryzomys russatus</i>	Brasil	Ortiz et al., (2018)
<i>Trypanosoma</i>						
<i>trinaperronei</i>	WTD2268	MN752212	MN756794	<i>Odocoileus virginianus</i>	Venezuela	Garcia et al., (2020)
<i>Trypanosoma varani</i>	V54	AJ005279	AJ620261	<i>Varanus exanthematicus</i>	Senegal	Stevens et al., (1999)



<i>Trypanosoma congolense</i>	Kilifi WG 5	AJ009144	AJ620288	<i>Capra sp</i>	Quênia	Stevens et al., (1999)
<i>Trypanosoma dionisii</i>	P3	AJ009151	FJ649494	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	Inglaterra	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma erneyi</i>	TCC1293	JN040987	JN040964	<i>Tadarida sp.</i>	Moçambique	Lima et al., (2012)
<i>Trypanosoma livingstonei</i>	TCC1270	KF192979	KF192958	<i>Rhinolophus landeri</i>	Moçambique	Lima et al., (2013)
<i>Trypanosoma</i>						
<i>niviventerae</i>		AB242274	LC369598	<i>Niviventer confucianus</i>	China	Mafie et al., (2019)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	AM80	AY491766	JN040973	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	Silva et al., (2004)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	PG	AJ012416	KT368805	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	Stevens et al., (1999)
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	B2-II	AJ009161	AJ620256	<i>Rana catesbiana</i>	Canadá	Stevens et al., (1999)
<i>Trypanosoma simiae</i>	KEN2	AJ009162	AJ620293	<i>G.m. submorsitans</i>	Gâmbia	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma terrestris</i>	CTB 61	KF586848	KF586845	<i>Tapirus terrestris</i>	Brasil	Acosta et al., (2013)
<i>Trypanosoma</i>						
<i>thomasbancrofti</i>	(genotype 1)	KT728373	KU323392	<i>Xanthomyza phrygia</i>	Austrália	Slapeta et al., (2016)
<i>Trypanosoma vivax</i>	TviMzNy	EU477537	FM876218	<i>Tragelaphus angasii</i>	África Oriental	Rodrigues et al., (2008)
<i>Trypanosoma wauwau</i>	CBT 68	KR653210	KR653217	<i>Pteronotus parnellii</i>	Brasil	Da Costa et al., (2016)

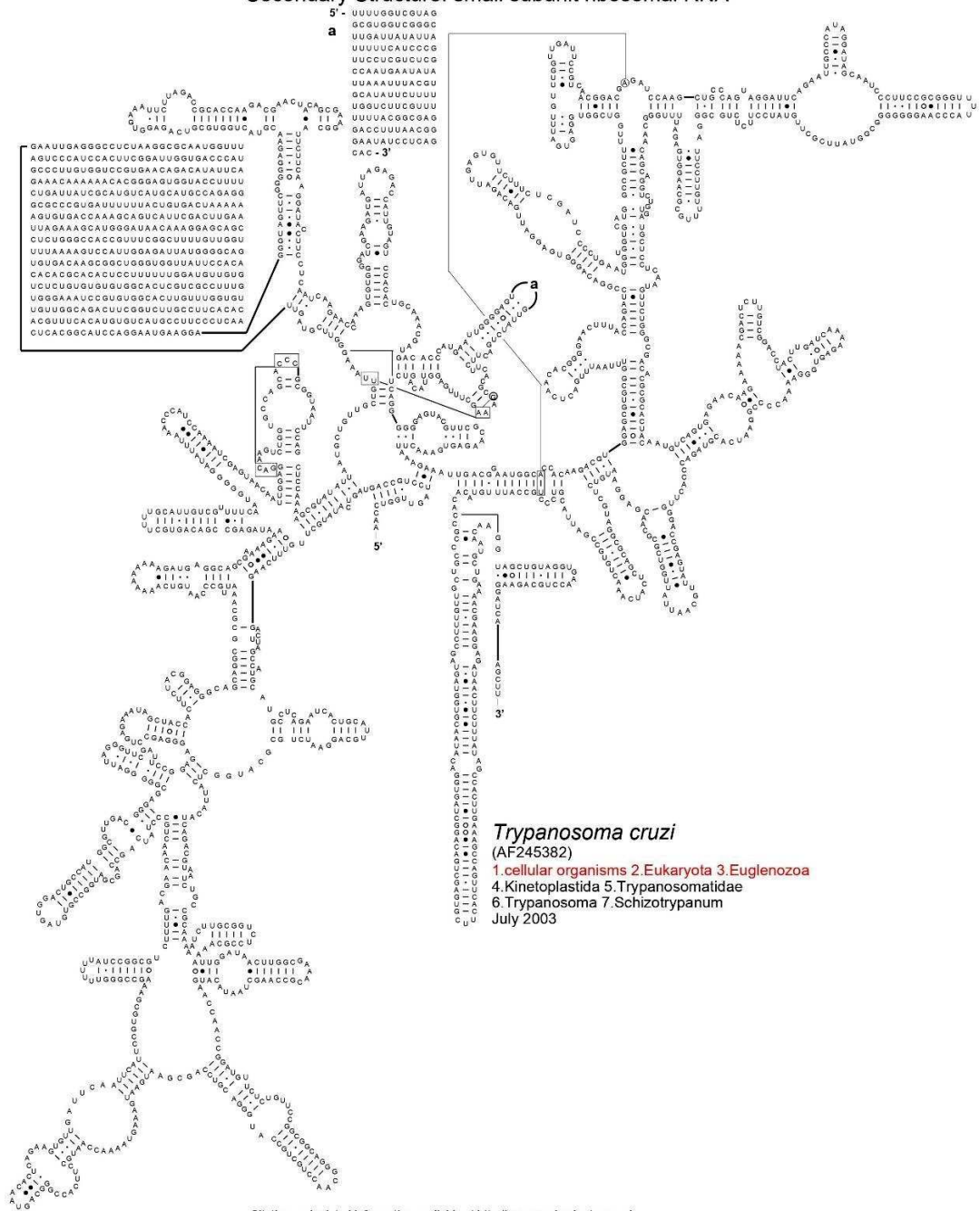
<i>Trypanosoma theileri</i>	TREU 124	AJ009163	HQ664800	<i>Bos taurus</i>	Escócia	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma brucei</i>						
<i>brucei</i>	TREU 927	<b>Tb927.2452</b>	<b>Tb927.6.4280</b>	NI	NI	Berriman et al., (2005)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	G	AF239981	GQ140351	<i>Didelphidae (Gambá)</i>	Brasil	Kawashita et al., (2001)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Y	AF301912	AB362560	<i>Didelphidae (Gambá)</i>	Brasil	Kawashita et al., (2001)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TryCC 793	FJ900241	GQ140358	<i>Myotis levis</i>	Brasil	Cavazzana et al., (2010)
<i>Trypanosoma cruzi</i>						
<i>marinkellei</i>	B7	AJ009150	AJ620270	<i>Phyllostomum discolor</i>	Brasil	Stevens, Noyes and Gibson (1998)
<i>Trypanosoma fallisi</i>		AF119806	AJ620254	<i>Bufo americanus</i>	Canadá	Martin et al., (2002)

---

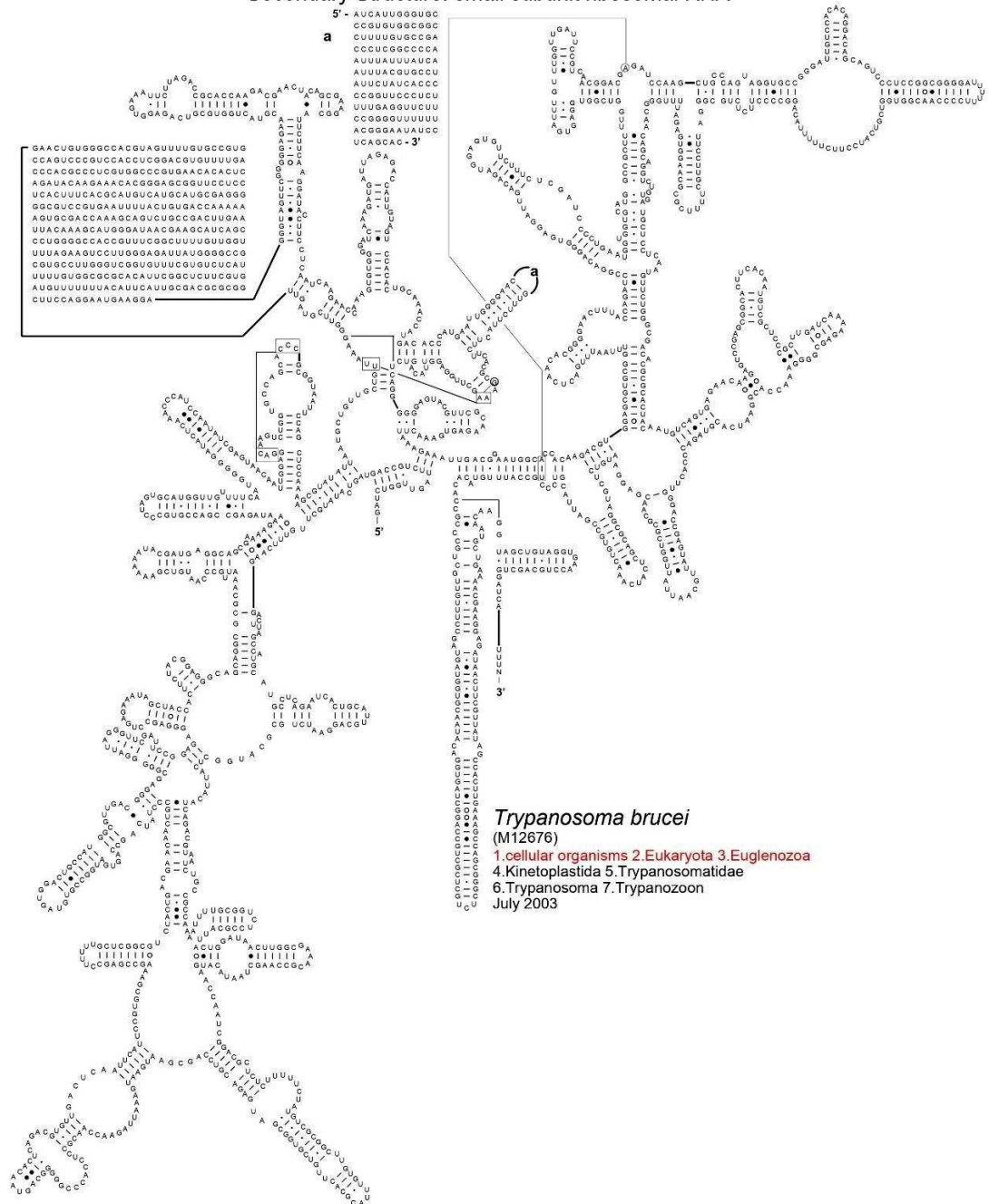
\*Sequências demarcadas em negrito foram retiradas do banco de dados TriTrypDB

\*\*NI: não informado

Secondary Structure: small subunit ribosomal RNA



Secondary Structure: small subunit ribosomal RNA



Citation and related information available at <http://www.rna.icmb.utexas.edu>