TARCILLA CORRENTE BORGHESAN

Diversidade e Filogenia de tripanosomatídeos parasitas de dípteros

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

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Geraldine Teixeira

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

Borghesan TC. Diversidade e Filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A família Trypanosomatidae compreende parasitas obrigatórios de invertebrados, principalmente insetos, plantas e de todas as classes de vertebrados, incluindo o homem. Tripanossomatídeos exclusivos de insetos, principalmente dípteros e hemípteros, foram descritos em mais de 400 espécies em todo o mundo. Os tripanossomatídeos de insetos são distribuídos nos gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Wallaceina*. Esses gêneros não foram corroborados por análises filogenéticas e estudos mais abrangentes são necessários para uma análise contemporânea da taxonomia desses tripanossomatídeos. Os principais objetivos deste estudo foram rever a taxonomia do gênero *Herpetomonas* e dos tripanossomatídeos de insetos que abrigam simbiossomas (SHT), que são dois grupos de parasitas comuns em dípteros. Para avaliar a diversidade genética e selecionar isolados para inclusão em árvores filogenéticas cerca de 130 tripanossomatídeos de moscas capturadas na América do Sul (Brasil, Venezuela e Colômbia) e África (Moçambique, Guiné Bissau e Madagascar) foram comparados (V7V8 SSU rRNA – *DNA barcoding*) nesse estudo.

Para o primeiro estudo de SHTs, 4 espécies de referência e nove novos isolados foram incluídos em filogenias (SSU rRNA e gGAPDH) que apoiaram a monofilia de todos os SHTs e sua partição em dois subclados correspondentes aos gêneros *Strigomonas* e *Angomonas*. Estes gêneros foram posicionados distantes de *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* e *Crithidia*. Dados morfológicos e análises filogenéticas foram empregados para a revalidação de *Angomonas*, contendo 10 flagelados incluindo *A. deanei* e *A. desouzai* e a nova espécie *Angomonas ambiguus*, e *Strigomonas* incluindo *S. oncopelti*, *S. culicis* e a nova espécie *Strigomonas galati*. As análises de 16S rRNA e ITS1rDNA revelaram três novas espécies de endossimbiontes (TPE- *trypanosomatid proteobacterial endosymbiont*), com congruência de filogenias inferidas apoiando evolução por co-divergência para a maioria das espécies dos tripanossomatídeos hospedeiros e seus simbiossomas, com exceção de *A. ambiguus* que compartilha o simbiote com *A. deanei*.

A comparação (*DNA barcoding*) de 364 culturas de moscas coletadas na América do Sul e África permitiu identificar 70 culturas (20%) do gênero *Angomonas*, 50 (71%) delas de moscas da família Calliphoridae. Análises realizadas por PCR de amostras de tubo digestivo de moscas revelaram ~51% das moscas infectadas por *Angomonas*. Das 83 caracterizadas, 70 de cultura e 13 não cultivadas, 61 foram identificadas como *A. deanei*, 16 como *A. desouzai* e 6 como *A. ambiguus*. Análises filogenéticas (gGAPDH) dos SHTs corroborou três clados principais liderados por *A. deanei*, *A. desouzai* e *A. ambiguus*, e revelou uma diversidade intra-específica representada por quatro genótipos de *A. deanei* e dois de *A. desouzai*. As filogenias dos SHTs e TPEs foram congruentes, com 4 genótipos de *A. deanei* congruentes com 4 de "*Ca. K. crithidii*" e dois de *A. desouzai* congruentes com dois de "*Ca. K. desouzaii*" corroborando a co-divergência dos SHTs e seus respectivos TPEs. *A. deanei* e *A. ambiguus* compartilharam o mesmo TPE. A congruência parcial entre SHTs e TPEs sugere uma predominância de propagação clonal com raros eventos de recombinação. Moscas dos gêneros *Chrysomya* e *Lucilia* (Calliphoridae) originaram 73% dos isolados, seguido por Muscidae com 14%. Apesar da forte

associação entre *Angomonas* e califorídeas, essas moscas também são frequentes hospedeiras de tripanossomatídeos de outros gêneros. Os principais hospedeiros de *Angomonas* são moscas do gênero *Chrysomya* e *Lucilia* (51%), ambos originários do Velho Mundo, enquanto *Cochliomya*, nativo da região neotropical, apresentou menores taxas de infecção (33%). A análise da associação *Angomonas*-TPE-califorídeos permitiu formular a hipótese de que a recente dispersão dessas moscas desempenhou um papel importante na dispersão de *Angomonas* no Neotrópico e na distribuição mundial das espécies/genótipos de *Angomonas*.

O gênero *Herpetomonas* foi criado para acomodar flagelados com formas opistomastigotas. No entanto, este parâmetro mostrou-se insuficiente levando a classificação de *Herpetomonas* como *Leptomonas* e *Phytomonas* ou a classificação como *Herpetomonas* de flagelados de outros gêneros. Para rever a taxonomia de *Herpetomonas* com base em análises filogenéticas, foram codificados (*DNA barcoding*) 527 tripanossomatídeos de insetos e 52 foram selecionados para inferências filogenéticas (gGAPDH e SSU rRNA). Os flagelados formaram um clado correspondente ao gênero *Herpetomonas*, que agora compreende 13 espécies válidas, 6 já conhecidas e 5 novas espécies. Estruturas primárias e secundárias de ITSrDNA foram comparadas para avaliação da variabilidade inter- e intra-específica. Microscopias de luz e eletrônica revelaram grande polimorfismo de *Herpetomonas*. Os resultados mostraram que algumas espécies de *Herpetomonas* são parasitas generalistas de moscas e parecem ser tão cosmopolitas quanto seus hospedeiros. Os táxons que definimos nesse estudo podem ser revistos dependendo de novas evidências resultantes da análise de amostras adicionais utilizando novos marcadores moleculares. O aperfeiçoamento gradual das classificações é parte da dinâmica da taxonomia. Esperamos que os táxons propostos contribuam para a elaboração de critérios mais eficientes para uma melhor e mais natural classificação das espécies da família Trypanosomatidae.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos, Filogenia, Taxonomia, Evolução, Diptera, Calliphoridae

ABSTRACT

Borghesan TC. Diversity and Phylogeny of trypanosomatids parasites of dipteran [Ph. D. thesis (Biology of Host-Pathogen Interactions.)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The family Trypanosomatidae comprises obligate parasites of invertebrates, mainly insects, of plants and of all classes of vertebrates including man. Trypanosomatids exclusive of insects have been reported in more than 400 species worldwide, mostly of dipterans and hemipterans. Insect trypanosomatids were distributed in the genera *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* and *Wallaceina*. These genera have not been corroborated by phylogenetic studies and broader analyses are required for a contemporary appraisal of the Taxonomy of insect trypanosomatids. Our main goals were to revise the taxonomy of the genus *Herpetomonas* and of Symbiont Harboring Trypanosomatids (SHTs), which are common parasites of dipterans. For this purpose, during our study we compared ~130 trypanosomatids from flies captured in South America (Brazil, Venezuela and Colombia) and Africa (Mozambique, Guinea Bissau and Madagascar).

We compared the barcodes (V7V8 SSU rRNA sequences) of 4 reference species and 9 new SHTs to assess the genetic diversity and to select isolates for inclusion in phylogenetic trees. The resulting phylogenies (SSU rRNA and gGAPDH) supported the monophyly of the SHT and its partition in two subclades corresponding to the genera *Strigomonas* and *Angomonas* revalidated in this study; these genera were distantly related to *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* and *Crithidia*. Morphological and phylogenetic data enabled the description of *Angomonas* comprising 10 flagellates including *A. deanei* and *A. desouzai* plus the new *A. ambiguus*, and *Strigomonas* including *S. oncopelti*, *S. culicis* and the new *S. galati*. Analyses of 16SrRNA and ITS1rDNA revealed three new species of trypanosomatid proteobacterial endosymbionts (TPEs), and the partial congruence of SHT and TPE phylogenies support a co-divergent host-symbiont evolutionary history for most species excepting for *A. ambiguus*.

Barcoding of 364 cultures from flies collected in South America and Africa identified 70 cultures (20%) as *Angomonas*, 50 (71%) of them from blowflies (Calliphoridae). Surveys by PCR directly of 13 fly guts revealed that ~50% of the blowflies were infected by *Angomonas*. Of the 83 samples, 70 from cultures and 13 uncultivated, 61 were *A. deanei*, 16 *A. desouzai* and 6 *A. ambiguus*. Phylogenetic analysis (gGAPDH) of SHTs corroborated the existence of 3 main clades led by *A. deanei*, *A. desouzai* and *A. ambiguus*, and disclosed cryptic intra-specific diversity represented by four genotypes of *A. deanei* and two of *A. desouzai*. The phylogeny of the SHTs and TPEs were congruent. Four genotypes of *A. deanei* and “Ca. K. crithidii” and two genotypes of *A. desouzai* and “Ca. K. desouzaii” corroborated the SHT-TPE co-divergence. *A. deanei* and *A. ambiguus* shared the same TPE. The partial congruence between SHTs and TPEs suggests a predominant clonal propagation with sporadic recombination.

Chrysomya and *Lucilia* (Calliphoridae) yielded 73% of the isolates followed by Muscidae with 14%. Despite the strong *Angomonas*-blowflies association, these flies are also common hosts of trypanosomatids of other genera. The main hosts of *Angomonas* were blowflies of the genera *Chrysomya* and *Lucilia*, both originally from the Old World, while *Cochliomya*, native of the Neotropics, showed low infection rates among the blowflies. The analysis of the tripartite association *Angomonas*-TPE-

calliphorids allowed to hypothesize that the recent dispersion of blowflies played an important role in the dispersal of *Angomonas* into the Neotropics, and in the worldwide distribution of the species/genotypes of *Angomonas*.

The genus *Herpetomonas* was created to accommodate flagellates showing opisthomastigote forms. However, this parameter proved insufficient permitting the misplacement of *Herpetomonas* within *Leptomonas* and *Phytomonas* or the classification as *Herpetomonas* of flagellates of other genera. To review the taxonomy of the genus *Herpetomonas* through phylogenetic analyses we analyzed the barcodes of 527 insect trypanosomatids and selected 52 for gGAPDH and SSU rRNA phylogenetic inferences. The selected flagellates clustered into a monophyletic assemblage corresponding to the genus *Herpetomonas* that now comprises 13 valid species, 6 already known and 5 new species. ITS1 rDNA primary and putative secondary structures were compared for evaluation of inter- and intraspecific variability. Light and electron microscopy revealed an extreme polymorphism within *Herpetomonas*. Our findings showed that some species of *Herpetomonas* are generalist parasites of flies and appear to be as cosmopolitan as their hosts.

The taxa we have nominated can be reviewed at any time in the presence of new evidence from the analysis of additional samples using new molecular markers. The gradual improvement of classifications is part of the dynamics of taxonomy. We hope that the proposed taxa may help to elaborate more efficient criteria for a better and more natural classification of the Trypanosomatidae.

Keywords: Trypanosomatids, Phylogeny, Taxonomy, Evolution, Diptera, Calliphoridae

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae é formada por eucariotos unicelulares e uniflagelados pertencentes à classe Kinetoplastea que, juntamente com os euglenídeos e os diplomonídeos formam o filo Euglenozoa (Eukaryota: Excavata). Os estudos filogenéticos mais recentes do filo Euglenozoa apoiam a hipótese de que os cinetoplastídeos são mais relacionados com os diplomonídeos (Breglia et al., 2007, Busse e Preisfeld, 2002; 2003; Hughes e Piontkivska, 2003; Roger e Simpson, 2009; Simpson et al., 2006). A classe Kinetoplastea, originalmente formada pelas subordens Trypanosomatina e Bodonina, ambas definidas segundo parâmetros morfológicos, caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria composta por moléculas circulares de DNA (kDNA) concatenadas em uma rede única (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008). Estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares levaram a uma revisão taxonômica do grupo, propondo a separação da classe Kinetoplastea em duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina. A subclasse Prokinetoplastina possui uma única ordem (Prokinetoplastida) formada por *Ichthyobodo necator*, uma espécie ectoparasita de peixes, e *Perkinsiella amoebae*-like, um endossimbionte de amebas do gênero *Neoparamoeba*. A subclasse Metakinetoplastina inclui quatro ordens, sendo três de bodonídeos (Neobodonida, Parabodonida e Eubodonida), que incluem espécies de vida livre e parasitárias, e a ordem Trypanosomatida que alberga uma única família (Trypanosomatidae) de espécies de parasitas obrigatórios (Moreira et al., 2004). Estudos filogenéticos empregando genes codificantes de proteínas (Simpson e Roger, 2004) e análises filogenômicas (Deschamps et al., 2011) apóiam a hipótese de que os tripanossomatídeos posicionam-se como um grupo apical dentro da irradiação dos Metakinetoplastina e tem como grupo irmão Eubodonida, tornando, assim, os bodonídeos parafiléticos. Os protozoários da família Trypanosomatidae apresentam ampla distribuição geográfica e parasitam todas as classes de vertebrados, invertebrados (especialmente Diptera e Hemiptera) e plantas. Embora a maioria dos representantes dessa família não seja patogênica

para seus hospedeiros, alguns são importantes agentes etiológicos de doenças humanas e de animais domésticos, como as tripanossomíases Africana e Americana e as leishmanioses (Hoare e Wallace, 1966; Simpson et al., 2006; Vickerman, 1976).

Tradicionalmente, a taxonomia da família Trypanosomatidae tem sido baseada em parâmetros morfológicos, ciclo de vida e hospedeiros de origem. Quanto ao ciclo de vida, os tripanossomatídeos podem ser heteroxênicos, quando participam do seu ciclo biológico dois hospedeiros, sendo um invertebrado e um vertebrado, ou monoxênicos, quando completam seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro, geralmente insetos de diversas ordens (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008, Vickerman, 1976, Wallace, 1966; Wallace et al., 1983). Os tripanossomatídeos diferem quanto à forma, comprimento e largura do corpo, comprimento do flagelo livre, tamanho e posição do núcleo e do cinetoplasto etc. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a presença ou não de membrana ondulante e flagelo livre determinam as diferentes formas apresentadas por estes flagelados durante seus ciclos de vida (Figura 1): amastigota, coanomastigota, promastigota, opistomastigota, epimastigota, tripomastigota e opistomastigota. Formas consideradas estágios de transição ou raramente encontradas, como paramastigotas e endomastigotas, também foram descritas (Wallace et al., 1983; Wallace, 1966).

Foi com base nos parâmetros taxonômicos tradicionais (morfologia, ciclo de vida e hospedeiro de origem) que os flagelados da família Trypanosomatidae foram distribuídos em 10 gêneros: seis que abrigam parasitas monoxênicos de insetos (*Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Wallaceina* e *Sergeia*), um que abriga parasitas heteroxênicos de insetos e plantas (gênero *Phytomonas*) e os gêneros heteroxênicos *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma* que abrigam espécies de importância médica e veterinária e que parasitam insetos e vertebrados (Hoare e Wallace; 1966; Merzlyak et al., 2001, Svobodová et al., 2007; Wallace et al., 1983; Wallace, 1966).

Hipóteses filogenéticas baseadas em marcadores moleculares, dados biogeográficos e paleontológicos tentam explicar a origem dos tripanossomatídeos. Foram insetos ou vertebrados seus primeiros hospedeiros? Diferentes estudos sugerem que a adoção do ciclo de vida heteroxênico surgiu independentemente várias vezes ao longo da evolução desses parasitas. Análises filogenéticas recentes

de um grande número de espécies dos diferentes grupos de tripanossomatídeos têm gerado hipóteses filogenéticas bem resolvidas que permitiram sugerir que um bodonídeo ancestral de vida livre pode ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao habitat intestinal originando os tripanossomatídeos monoxênicos. Com a aquisição da hematofagia, insetos passaram a inocular esses parasitas em vertebrados e os que se adaptaram ao parasitismo passaram, então, a circular entre insetos hematófagos e vertebrados terrestres, assim originando as espécies heteroxênicas (Hamilton et al., 2004, 2007; Lukeš et al., 2002; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001; Stevens, 2008).

Figura 1. Estágios morfológicos encontrados na família Trypanosomatidae (modificada: de Souza W, 2002)

Estudos filogenéticos recentes baseados em diversos marcadores moleculares não têm corroborado grande parte da taxonomia tradicional, questionando muitas das espécies descritas bem como os gêneros da família Trypanosomatidae. Enquanto esses estudos suportam a monofilia dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Phytomonas*, os gêneros definidos para os tripanossomatídeos monoxênicos apresentam-se como não monofiléticos. Esses

dados mostram que os marcadores taxonômicos tradicionais são insuficientes para definir a maioria dos gêneros de tripanossomatídeos de insetos (Hollar e Maslov, 1997; Hughes e Piontkivska, 2003; Maslov et al., 2012; Merzlyak et al., 2001; Simpson et al., 2006; Hamilton et al., 2004; 2007; Svobodová et al., 2007; Westenberger et al., 2004; Podlipaev et al., 2004a,b; Yurchenko et al., 2006a,b, 2008; 2009).

1.2 Filogenia e taxonomia de tripanossomatídeos parasitas de insetos

Pouco se conhece sobre a diversidade e as relações filogenéticas de tripanossomatídeos monoxênicos. Esses protozoários são os mais abundantes na família e apresentam grande diversidade de hospedeiros, preferencialmente hemípteros e dípteros, tendo sido encontrados em mais de 400 espécies de insetos em todo o mundo. Aproximadamente 80% dos tripanossomatídeos de insetos foram descritos nessas duas ordens (Maslov et al., 2013). Geralmente não são patogênicos, desenvolvem-se no trato digestivo dos insetos (que fornece os nutrientes necessários para a propagação dos parasitas) e são transmitidos por coprofagia, predação e até mesmo canibalismo (Camargo, 1998; Hoare, 1972; Maslov et al., 2013; Vickermam, 1994; Wallace, 1966).

Baseando-se em caracteres morfológicos e ciclo de vida, Hoare e Wallace (1966) reorganizaram os tripanossomatídeos monoxênicos de insetos nos gêneros: *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Blastocrithidia*. Os gêneros *Wallaceina* originalmente denominado *Proteomonas*, e criado para acomodar tripanossomatídeos de insetos que apresentam formas endomastigotas (morfologia em que o flagelo se enrola dentro da célula, de modo que a extremidade não fique livre) e *Sergeia* foram posteriormente adicionados à família (Merzlyac et al., 2001; Podlipaev et al., 1990; Svobodová et al., 2007, Yoshida et al., 1978). Entre os tripanossomatídeos monoxênicos de insetos, cinco espécies apresentam endossimbiontes bacterianos no citoplasma : *Blastocrithidia culicis* (Chang, 1975), *Crithidia oncopelti* (Gill e Vogel, 1963), *Crithidia deanei* (Carvalho, 1973), *Crithidia desouzai* e *Herpetomonas roitmani* (Fiorini et al., 1989; Faria-e-Silva et al., 1991; Motta et al., 1991). A presença de endossimbiontes bacterianos na família

Trypanosomatidae foi também relatada em tripanossomas de peixe, *Trypanosoma cobitis* (Lewis e Ball, 1981), e de anuro, *Trypanosoma fallisi* (Martin e Desser, 1990).

De acordo com parâmetros taxonômicos tradicionais, o gênero *Crithidia* é constituído por tripanossomatídeos que apresentam formas coanomastigotas em seu ciclo de vida. Entretanto, análises filogenéticas baseadas em marcadores moleculares posicionam as espécies desse taxon em dois clados distintos e distantes (Figura 2) indicando que o gênero não é monofilético. Tripanossomatídeos com formas coanomastigotas que albergam endossimbiontes bacterianos (*C. deanei*, *C. desouzai* e *C. oncopelti*) são segregados juntamente com *Blastocrithidia culicis* e *Herpetomonas roitmani*, que também contêm endossimbiontes bacterianos, em um grupo monofilético muito distante de *C. fasciculata*, espécie-tipo do gênero e que não contém endossimbionte. *Crithidia fasciculata* é proximamente relacionada com espécies dos gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Leptomonas* e *Wallaceina* (Hamilton et al., 2004; Hollar e Maslov, 1997; Hollar et al., 1998; Jirků et al., 2012; Hughes e Piontkivska, 2003; Maslov et al., 2010; 2013; Merzlyak et al., 2001; Svobodová et al. 2007; Yurchenko et al., 2008, 2009). Estes dados indicam que o gênero *Crithidia* é um taxon artificial que necessita ser redefinido e separado em, pelo menos, dois gêneros (Hollar et al., 1998).

Leptomonas é outro gênero que necessita de revisão. Análises filogenéticas inferidas com os genes gGAPDH e SSU rRNA têm sugerido a polifilia do gênero e revelado que as espécies *Leptomonas costarricensis* e *Leptomonas barvae* são mais proximamente relacionadas com *Leishmania* do que com o clado que contém *Leptomonas seymouri*, espécie-tipo do gênero (Maslov et al., 2010, Votýpka et al., 2012a; Yurchenko et al., 2006b). Na realidade, o gênero *Leptomonas* juntamente com os gêneros *Crithidia*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Wallaceina* formam um grande clado que, devido às taxas relativamente lentas de evolução das sequências de SSU rRNA, foi denominado *Slowly Evolving* (SE) (Merzlyak et al., 2001). Recentemente, com base em filogenias geradas com os genes SSU rRNA e gGAPDH esse táxon foi denominado como Subfamília Leishmaniinae (Jirků et al., 2012), tendo *Leishmania* (Ross, 1903) como gênero tipo.

Muitas espécies de *Herpetomonas* foram descritas com base em parâmetros taxonômicos tradicionais (Podlipaev 1990; Wallace, 1966; Wallace et al. 1983). Contudo, análises filogenéticas demonstraram que as espécies classificadas nesse

gênero posicionam-se em ramos distantes e não relacionados (Figura 2). Um exemplo é *H. roitmani* que se posiciona juntamente com os tripanossomatídeos que têm simbiossomas e distantemente do clado das demais espécies desse gênero (*H. mariadeanei*, *H. muscarum*, *H. magaseliae*, *H. samuelpessoai*) (Figura 2). Atualmente, o gênero *Herpetomonas* (comentado separadamente adiante) também é considerado polifilético e requer uma revisão taxonômica.

O gênero *Blastocrithidia* (Laird, 1959) foi criado para acomodar tripanossomatídeos de insetos com formas epimastigotas (Wallace, 1966). Tem como espécie tipo *Blastocrithidia gerridis*, que não foi cultivada e, portanto não está disponível para comparações morfológicas e moleculares. As espécies de *Blastocrithidia* compartilham apenas as formas epimastigotas com as espécies do gênero *Trypanosoma*. Embora espécies de ambos os gêneros infectem triatomíneos, as espécies de *Blastocrithidia* diferem das de *T. cruzi* e *T. rangeli*, por também se desenvolverem em outros insetos. Construções filogenéticas recentes mostram que os flagelados classificados como *Blastocrithidia* com base em parâmetros morfológicos não formam um grupo monofilético. A espécie *B. culicis*, portadora de endossimbionte, agrupa-se no mesmo clado em que se posicionam as outras espécies de tripanossomatídeos portadoras de endossimbiossomas. Por outro lado, o clado contendo *B. triatoma*, *B. leptocoridis*, *B. cyrtomeni* e *B. largi* é segregado em um ramo distante e basal dos tripanossomatídeos (Hamilton et al., 2004, Maslov et al., 2012; Merzlyak et al., 2001; Votýpka et al., 2012b, Yurchenko et al., 2008). O status taxonômico do gênero *Blastocrithidia* na família Trypanosomatidae ainda é incerto.

A classificação de tripanossomatídeos monoxênicos de insetos em gêneros revela uma série de dificuldades, sendo realizada, na maioria das vezes, com base em parâmetros taxonômicos tradicionais (morfologia, ciclo de vida e hospedeiros de origem). Além disso, os tripanossomatídeos de insetos apresentam baixa especificidade em relação ao hospedeiro e uma grande diversidade morfológica. Embora parâmetros morfológicos sejam utilizados na definição de gêneros da família Trypanosomatidae, sua utilização para a classificação de tripanossomatídeos monoxênicos de insetos deve ser feita com cautela.

Espécies de mais de um gênero compartilham as mesmas características morfológicas (Tabela 1) e um mesmo gênero pode apresentar diferentes estágios e

grandes polimorfismos (Camargo et al., 1992; Camargo, 1999; Faria-e-Silva et al., 1991; Teixeira et al., 1997; Wallace et al., 1983). A existência de infecções mistas nos insetos e consequentemente nas culturas obtidas é um dos principais fatores que complicam a identificação morfológica de tripanossomatídeos. Formas observadas diretamente nos hospedeiros nem sempre correspondem às isoladas em cultura, que podem ser de outras espécies (minoritárias quando no hospedeiro de origem, porém facilmente cultiváveis), ou até mesmo de outros gêneros. Além da morfologia, a espécie do hospedeiro de origem é um critério amplamente utilizado na classificação de tripanossomatídeos. Entretanto, já foi demonstrado experimentalmente que tripanossomatídeos de insetos apresentam diferentes graus de especificidade em relação aos hospedeiros. Além disso, um hospedeiro pode conter infecções múltiplas, ou seja, albergar diferentes espécies de tripanossomatídeos (Camargo, 1999; Podlipaev, 2001; McGhee e Hanson, 1963; McGhee, 1970; Podlipaev et al., 2004a; Týč et al., 2013; Votýpka et al., 2012a; Wallace et al., 1983; 1993; Wallace, 1966; Zídková et al., 2010). Recentemente Votýpka e colaboradores (2012b) demonstraram que *Leptomonas pyrrhocoris* tem distribuição cosmopolita e apresenta especificidade com hospedeiros pertencentes à família Pyrrhocoridae. Essa família de hemíptero possui gêneros de distribuição mundial, o que possibilitou a disseminação do flagelado. Esses dados demonstram a importância de estudos filogeográficos para os tripanossomatídeos de insetos.

Tabela 1- Tripanossomatídeos monoxênicos de insetos

Gênero	Morfologia	Hospedeiro
<i>Crithidia</i>	Coanomastigota	Hemiptera/Diptera
<i>Leptomonas</i>	Promastigota	Hemiptera
<i>Herpetomonas</i>	Promastigota Opistomastigota	Hemiptera/Diptera
<i>Blastocrithidia</i>	Epimastigota	Hemiptera
<i>Sergeia</i>	Promastigota	Diptera
<i>Wallaceina</i>	Promastigota Endomastigota	Hemiptera

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados para a análise da diversidade dos tripanossomatídeos, mostrando-se muito mais confiáveis que os marcadores tradicionais tanto para a identificação de espécies ou cepas de organismos conhecidos quanto para a classificação de novas espécies ou a criação de táxons supraespecíficos. O posicionamento em diagramas filogenéticos tem permitido a identificação de novas espécies morfologicamente indistinguíveis de outras já conhecidas. Por outro lado, espécies originalmente classificadas como distintas tem sido sinonimizadas com base em dados moleculares (Ferreira et al. 2007, 2008; Hamilton et al., 2004, 2005a,b, 2007, 2009; Lima et al., 2012; Maia da Silva et al. 2004a,b; Maslov et al., 2012; Podlipaev et al., 2004b; Rodrigues et al. 2006, 2008; Stevens et al. 1999a,b, 2001; Svobodová et al., 2007; Viola et al., 2008, 2009a,b; Zídková et al., 2010).

Nos estudos evolutivos da família Trypanosomatidae, embora um número crescente de espécies venha sendo incluída ao longo do tempo, principalmente as do gênero *Trypanosoma*, ainda são poucos os representantes dos diferentes gêneros de tripanossomatídeos monoxênicos de insetos. Nos últimos anos aumentaram consideravelmente os estudos dedicados a explorar comparativamente a diversidade destes tripanossomatídeos de insetos (Maslov et al., 2007; Podlipaev et al., 2004a,b; Svobodová et al., 2007; Votýpka et al., 2010; Yurchenko et al., 2006a,b, 2008, 2009). Esses estudos apontam a necessidade de uma completa revisão taxonômica de praticamente todos os gêneros de tripanossomatídeos monoxênicos. Para isso, um grande número de isolados representativos da grande diversidade de hospedeiros e regiões geográficas precisam ser analisados.

Figura 2. Diagrama de máxima verossimilhança (ML) baseada no gene SSU rRNA utilizando sequências de tripanossomatídeos. Os números correspondem aos valores de suporte por “bootstrap” em ML inferidos por 100 replicatas. Fonte: modificada de Merzlyak et al., 2001.

1.3 Tripanossomatídeos parasitas de moscas

A classe Insecta é formada por mais de 750.000 espécies distribuídas em pelos menos 10 ordens. Cerca de 200 espécies foram descritas com infecções por tripanossomatídeos, em mais de 300 relatos em todo o mundo (Wallace et al., 1983; Sbravate et al., 1989; Teixeira et al., 1997; Serrano et al., 1999; Camargo et al., 1992; Camargo, 1998; Podlipaev et al., 2004a,b; Maslov et al., 2007, Votýpka et al., 2012).

A ordem Diptera, uma das maiores ordens da classe Insecta, constitui um grupo monofilético que abriga cerca de 158.000 espécies que apresentam grande

variação morfológica e diversidade ecológica. Os dípteros conhecidos atualmente estão classificados em pelo menos 130 famílias, 22-32 superfamílias, 8-10 infraordens e 5 subordens (McAlpine e Wood, 1989; Colless e McAlpine, 1991; Yaetes e Wiegmann, 1999, Amorim e Yaetes, 2006; Wiegmann et al., 2003). Somente uma pequena parte da diversidade dos dípteros foi examinada quanto à presença de tripanossomatídeos. Portanto, os estudos sobre a diversidade de tripanossomatídeos de moscas ainda são muito restritos, pois representam apenas uma pequena fração da diversidade de hospedeiros.

Os fósseis mais antigos de dípteros datam do Permiano superior (~250 mya) e um grande número de fósseis de Diptera datam do Mesozóico (Yeates e Wiegmann, 1999; Wiegmann et al., 2011). Os dípteros são considerados uma das maiores radiações adaptativas entre os eucariotos terrestres. Análises filogenéticas recentes baseadas em dados moleculares, morfológicos e fósseis sugerem que a grande diversidade de dípteros (tanto morfológica quanto ecológica) é devida a episódios de rápidas explosões radiativas, ou seja, os dípteros evoluíram e se diversificaram dos seus ancestrais em um curto período de tempo (Wiegman et al., 2011)

A maioria dos dípteros adultos alimenta-se de pólen e néctar de plantas ou de matéria orgânica em decomposição. Devido aos diferentes hábitos dos estágios larvais (detritívoros, semiaquáticos ou aquáticos), algumas espécies de moscas podem causar danos econômicos, tanto para plantas (caso da mosca das frutas, da família Tephritidae, cujas larvas danificam principalmente os frutos) quanto para animais (caso de moscas das famílias Calliphoridae e Oestridae, cujas larvas podem invadir tecidos vivos de vertebrados, causando miíases) (Yates e Wiegmann, 1999, Stevens et al., 2006). Insetos adultos das famílias Simuliidae, Culicidae, Psychodidae e Glossinidae têm hábitos hematófagos, constituindo-se em importantes hospedeiros e/ou vetores de oncocercose, malária, leishmaniose e tripanossomíases africanas (doença do sono), respectivamente (Yates e Wiegmann, 1999, Rodrigues et al., 2006). Por outro lado, algumas espécies de dípteros (Tephritidae, Tachinidae) possuem larvas com hábitos parasitóides (parasitam outras espécies de insetos) e desempenham importante papel na regulação de pragas, sendo utilizadas no controle biológico de insetos e plantas (Yates e Wiegmann, 1999).

Tradicionalmente, os dípteros estão divididos nas subordens Nematocera e Brachycera. A subordem Nematocera (com seis infraordens), da qual fazem parte os mosquitos (Culicidae), borrachudos (Simuliidae) e flebotomíneos (Psychodidae), contém os dípteros com antenas com mais de seis segmentos livremente articulados. Análises filogenéticas baseadas em dados moleculares e morfológicos sugeriram que essa subordem é parafilética e que o relacionamento entre as infraordens é incerto (Yates e Wiegmann et al., 1999, Wiegmann et al., 2003). A subordem Brachycera constitui um grupo monofilético, formado por dípteros com antenas com 3 a 5 segmentos e distribuídos em quatro infraordens: Xylophagomorpha, Stratiomyomorpha, Tabanomorpha e Muscomorpha (antiga subordem Cyclorrapha), que compreende os dípteros muscóides. Com base em dados morfológicos, a Infraordem Muscomorpha divide-se em quatro grandes grupos: Heterodactyla, Eremoneura (formado por Empidoidea e Cyclorrapha), Cyclorrapha e Schizophora (Figura 3) (Yates e Wiegmann et al., 1999). Eremoneura forma o clado mais bem suportado dentro da subordem Brachycera (Yates e Wiegmann 1999; Wiegmann et al., 2011).

De acordo com a análise de caracteres morfológicos, Cyclorrapha é dividido em duas seções: Aschiza e Schizophora. A seção Aschiza é formada por duas superfamílias: Syrphoidea (formada por duas famílias) e Platypezoidea (composta por cinco famílias). Estudos recentes baseados em dados moleculares têm demonstrado que essa seção é parafilética (Yates e Wiegmann 1999; Wiegmann et al., 2011). Na seção Schizophora, encontra-se a maior diversidade de famílias da ordem Díptera, com aproximadamente 85 famílias divididas em duas subseções: Acalyptratae e Calyptratae. Com aproximadamente 18.000 espécies descritas, a seção Calyptratae consiste em um dos maiores e mais diversificado grupo da ordem Díptera, com todos os representantes posicionados em um único clado fortemente suportado (Yates e Wiegmann 1999; Wiegmann et al., 2011). McAlpine (1989) dividiu a seção Calyptratae em três superfamílias: a) Hippoboscoidea, composta pelas famílias Glossinidae, Hippoboscidae, Strablidae e Nycteribiidae; b) Muscoidea, que inclui Sconthophagidae, Anthomyiidae, Faniidae e Muscidae; e c) Oestroidea, formada pelas famílias Calliphoridae, Mystacinobiidae, Sarcophagidae, Rhinophoridae, Tachinidae e Oestridae.

Moscas de diversas espécies, gêneros e famílias são hospedeiras e/ou vetores de tripanossomatídeos heteroxênicos. Diversos fósseis de Diptera, de diferentes períodos, foram encontrados infectados por tripanossomatídeos (Poinar e Poinar, 2005). O ciclo biológico dos tripanossomatídeos nos insetos ocorre em diferentes porções do tubo digestivo e, em alguns casos, nas glândulas salivares. As espécies africanas do gênero *Trypanosoma* pertencentes à secção Salivaria são parasitas de mamíferos que têm moscas tsé-tsé (glossinas) como vetores. No caso de tripanossomas do clado *T. theileri*, parasitas de Artiodactyla, os vetores da transmissão contaminativa são moscas das famílias Tabanidae e Hippoboscidae (Rodrigues et al., 2006). Pequenas moscas hematófagas pertencentes à família Ceratopogonidae transmitem algumas espécies de tripanossomas de aves (Votýpka et al., 2002), mas também foram descritas infectadas por tripanossomatídeos monoxênicos dos gêneros *Herpetomonas* e *Sergeia* (Podlipaev et al., 2004b; Svobodová et al., 2007; Zídková et al., 2010). Estudos recentes têm demonstrado que tripanossomatídeos são comuns em diversas espécies de *Drosophila* (Ebbert et al., 2001; Wilfert et al., 2011). Em um estudo prévio de nosso laboratório, com base em polimorfismos de restrição do gene SSU rRNA, classificamos 11 tripanossomatídeos isolados de moscas (pertencentes às famílias Muscidae e Calliphoridae) no gênero *Herpetomonas* (Teixeira et al., 1997).

Centenas de tripanossomatídeos monoxênicos foram descritos parasitando moscas de diversas espécies e famílias. Entretanto, poucos estudos foram realizados a fim de classificar esses flagelados e, na maioria dos casos, a classificação foi baseada apenas em dados morfológicos (Faria e Silva et al., 1991; Hollar et al., 1998; Podlipaev et al., 2004a,b; Yurchenko et al., 2006a,b, 2008). Os flagelados estudados neste trabalho foram isolados de moscas principalmente da família Calliphoridae, mas também das famílias Muscidae, Sarcophagidae e Syrphidae (figura 3).

Figura 3: Inferência filogenética de Diptera baseada em dados morfológicos e moleculares. Bolas vermelhas indicam as famílias onde os isolados deste estudo foram encontrados (modificada de Wiegmann et al, 2003)

A família Calliphoridae, que compreende moscas com reflexos metálicos (geralmente azulados e esverdeados) conhecidas como “moscas varejeiras” ou “blowfly” (Guimarães e Papavero, 1999), forma um grupo muito diverso e heterogêneo, havendo, aproximadamente, 1.500 espécies distribuídas mundialmente (Marinho et al., 2012; Pape et al., 2011). As espécies de Calliphoridae das regiões neotropicais são agrupadas em quatro subfamílias: Chrysomyinae,

Calliphorinae, Mesembrineliinae e Toxotarsinae, com ~27 gêneros e mais de 125 espécies. As principais espécies causadoras de miíases são encontradas nos gêneros *Cochliomyia*, *Lucilia*, *Calliphora*, *Comptosomyia* e *Chrysomya* (de Azeredo-Espin e Lessinger, 2006; Guimarães e Papavero, 1999; Stevens e Wall, 1996; Stevens et al., 2006a,b). As espécies mais comuns no Brasil, com grandes populações sinantrópicas, são espécies exóticas dos gêneros *Luciliae* (Calliphorinae) e *Chrysomya* (Chrysomyinae). Mesembrineliinae e Toxotarsinae são subfamílias neotropicais restritas às regiões silvestres e são muito utilizadas como marcadores de impacto ambiental (Guimarães e Papavero, 1999; Melo, 2003).

As larvas de Calliphoridae desenvolvem-se em locais diversos: em invertebrados, materiais em decomposição (fezes, lixo, carcaças de animais, etc) e tecidos vivos de vertebrados. Algumas espécies são atraídas também por flores e frutas com aromas acentuados. Devido ao seu papel como ectoparasitas de animais (causando miíases primárias e secundárias) e sua importância na entomologia forense, espécies de Calliphoridae tem sido bastante estudadas filogeneticamente (Stevens, et al., 2006a,b; Stevens 2003; de Azeredo-Espin e Lessinger, 2006; Marinho et al., 2012).

Enquanto algumas espécies de Calliphoridae são endêmicas, outras foram introduzidas pelo homem e estão dispersas atualmente em praticamente todos os continentes. No Brasil, as espécies endêmicas são principalmente de hábitos silvestres e existem em pequenas populações. O gênero *Cochliomyia* é endêmico no novo mundo e inclui importantes agentes causadores de miíases obrigatórias. As espécies *Cochliomyia hominivorax* e *Cochliomyia macellaria* são as mais abundantes e amplamente distribuídas e atualmente são encontradas em populações pequenas e restritas a regiões rurais (Stevens et al., 2003; 2006a,b; de Azeredo-Espin e Lessinger, 2006). O gênero *Chrysomya* era restrito ao Velho Mundo até meados da década de 1970, quando foram descritas três espécies no Brasil: *C. megacephala* (originária da Austrália e Oriente), *C. albiceps* (originária da Europa) e *C. putoria* (originária da África). Essas espécies possuem uma grande capacidade de adaptação a novos ambientes, o que levou a uma rápida dispersão e a ocorrência de populações sinantrópicas. Atualmente, essas são as espécies mais abundantes no Brasil. Com o estabelecimento dessas espécies no Brasil, ocorreu o deslocamento de espécies endêmicas para ambientes silvestres (Guimarães, 1999;

de Azeredo-Espin e Lessinger, 2006). Estudos recentes, baseados em dados morfológicos e moleculares, demonstram que a família Calliphoridae é parafilética (Kutty et al., 2008; Marinho et al., 2012).

A família Muscidae é composta por aproximadamente 5.000 espécies, distribuídas em cerca de 170 gêneros. As espécies dessa família são encontradas em todas as regiões biogeográficas. Suas larvas possuem hábitos saprófagos e quando adultos podem ser saprófagos, predadores, hematófagos ou alimentar-se de néctar e pólen. Estudos recentes baseados em dados moleculares demonstram que Muscidae é monofilética, dividida em oito subfamílias: Achantipterinae, Atherigoninae, Azeliinae, Cyrtoneurinae, Coenosiinae, Muscinae, Mydaeinae e Phaoniinae (Kutty et al., 2008). A espécie mais conhecida da família é *Musca domestica*. Essa espécie é cosmopolita, sinantrópica e têm um importante papel como vetor de microorganismos (Gupta et al., 2012).

1.4 Tripanossomatídeos que albergam simbiossiontes

A maioria dos tripanossomatídeos que albergam simbiossiontes pertence ao gênero *Crithidia*, gênero criado no início do século XX para classificar tripanossomatídeos com formas de “grão de cevada”, ligeiramente achatados na extremidade anterior de onde se exterioriza o flagelo. *Crithidia fasciculata* é a espécie tipo (Léger, 1902). Durante muito tempo o termo “critidial stage” foi adotado para descrever em outros gêneros formas similares às encontradas no gênero *Crithidia*, gerando grande confusão e inúmeros erros de classificação. Apesar de a morfologia coanomastigota ser considerada exclusiva do gênero *Crithidia* a identificação de coanomastigotas nem sempre é fácil, quando se considera o grande pleomorfismo dos indivíduos desse gênero (Wallace, 1966; Wallace et al., 1983) (Figura 4). Exceto em *B. culicis* (que apresenta forma epimastigota), nos demais tripanossomatídeos que albergam endossimbiontes bacterianos (*C. deanei*, *C. desouzai*, *C. oncopelti* e *H. roitmani*) encontram-se formas nas quais o cinetoplasto localiza-se posteriormente ao núcleo, presentes em maior número em culturas em fase estacionária (Teixeira et al., 1997) (Figura 4). Estas formas, que aqui designamos opistomorfos, não são encontradas nos tripanossomatídeos sem endossimbiontes do gênero *Crithidia*. O termo opistomorfo foi adotado para distinguir

as formas coanomastigotas com cinetoplasto posterior ao núcleo das formas opistomastigotas típicas, que são formas alongadas, como as promastigotas, e exclusivas das espécies do gênero *Herpetomonas* (Teixeira et al., 1997).

Figura 4: Microscopia de luz de tripanossomatídeos do gênero *Crithidia* portadores de simbiontes: **A:** 1 e 2 *C. deanei*; 3) *C. desouzai*; 4) *C. oncopelti*; e não portadores de simbiontes **B:** 1) *C. fasciculata*; 2) *C. acanthocephali* e 3) *C. l. thermofila*. As setas indicam formas opistomorfos.

Os endossimbiontes de tripanossomatídeos pertencem à classe Betaproteobacteria, são intracitoplasmáticos obrigatórios, não sobrevivem fora do hospedeiro e são circundados por uma dupla membrana separada por um espaço eletrólucido (Chang, 1974; 1975; Du et al., 1994a, 1994b; Hollar et al., 1998; Tuan e Chang, 1975; Alfieri e Camargo, 1982; De Souza e Motta, 1999). Geralmente há apenas um endossimbionte por célula o qual se divide sincronicamente com seu hospedeiro (Du et al., 1994b; Motta et al., 2010). Estudos sobre requerimentos nutricionais demonstraram a contribuição dos simbiontes para o metabolismo dos tripanossomatídeos hospedeiros fornecendo vários nutrientes essenciais (Chang e Trager, 1974; Frossard et al., 2006; Korený et al., 2010; Roitman e Camargo, 1985). Tripanossomatídeos que contêm endossimbiontes bacterianos não exigem adição de ornitina, arginina e citrulina no meio de cultura, intermediários do ciclo da uréia que são supridos pelo endossimbionte (Galinari e Camargo, 1978; Camargo e

Freytmüller, 1977). Os endossimbiontes também influenciam na síntese de fosfatidilcolina (de Azevedo-Martins et al., 2007), ajudam na captação de prolina (Galvez Rojas et al., 2008) e sintetizam treonina-desaminase, primeira enzima da via biossintética de isoleucina, leucina e valina, envolvida na conversão de treonina em alfa-cetobutirato. Assim, espécies com endossimbiontes sobrevivem na ausência desses aminoácidos, o que não ocorre com *C. fasciculata*, cujo desenvolvimento é bastante prejudicado (Alfieri e Camargo, 1982).

Enquanto a imensa maioria dos tripanossomatídeos requer hemina como fonte de heme (uma molécula encontrada em todos os seres vivos e de fundamental importância funcional), as espécies portadoras de simbiote dispensam hemina no meio de cultura, indicando a capacidade do simbiote de sintetizar o heme. A via de síntese de heme está ausente na maioria dos cinetoplastídeos, enquanto enzimas e precursores envolvidos no percurso biossintético são mais abundantes em tripanossomatídeos com endossimbiontes (Newton, 1957; Chang e Trager, 1974; Mundim e Roitman, 1977; Mundim et al., 1974; Faria-e-Silva et al., 1994). Análises genômicas conduzidas recentemente demonstraram que os endossimbiontes de tripanossomatídeos possuem a via de biossíntese de heme potencialmente completa (Alves et al., 2011), o que explicaria a propagação em cultura dos tripanossomatídeos hospedeiros em meios desprovidos de hemina (Mundim e Roitman, 1977; Mundim et al., 1974; Alfieri e Camargo, 1982; Faria-e-Silva et al., 1994). A via completa da síntese desse composto é encontrada na maioria dos organismos e é altamente conservada (Korený et al., 2010; 2013). Embora raros, alguns organismos apresentam deficiências na síntese deste composto, como é o caso de protistas anaeróbicos como *Giardia*, *Entamoeba*, *Trichomonas*, entre outros (Korený et al., 2010; 2013). Por outro lado, estudos recentes baseados em análises de genomas completos mostraram a presença, em espécies de *Leishmania* e *Crithidia*, dos genes que codificam as três últimas enzimas da via biossintética do heme (Alves et al., 2011.), provavelmente oriundos de uma transferência horizontal de Gammaproteobacteria. Filogenias baseadas nos genes da via biossintética do heme sugerem que a via heme tenha sido perdida no ancestral ainda não parasita dos cinetoplastídeos e mais tardiamente readquirida, por transferência horizontal, em *Leishmania* e *Crithidia*. Nos tripanossomatídeos que albergam simbiotes, a

aquisição dos genes oriundos de gammaproteobacteria ocorreu antes do evento de simbiose com betaproteobacteria.

Os flagelados que albergam endossimbiontes diferem dos que não possuem endossimbiontes em muitas características morfológicas, bioquímicas e moleculares (Brandão et al., 2000; Camargo et al., 1982, 1992; Fernandes et al., 1997; Hollar et al., 1998, Maslov et al., 2010; Merzlyak et al., 2001; Teixeira et al., 1995). Além de conferir vantagens nutricionais e metabólicas, o endossimbionte altera a morfologia e ultra-estrutura dos tripanossomatídeos hospedeiros (de Souza e Motta 1999; Motta et al., 1997) de forma que os tripanossomatídeos portadores de simbiontes diferem dos não portadores em muitas características ultraestruturais (Cavalcanti et al., 2008; Freymuller e Camargo, 1981), por exemplo: ausência de estrutura paraflagelar; alterações na organização do cinetoplasto com afrouxamento da rede de kDNA; e ausência de microtúbulos subpeliculares nas regiões em que ramificações da mitocôndria se aproximam da porção interna da membrana plasmática (Figura 5).

Quando tratados com cloranfenicol, os tripanossomatídeos ficam livres de seus endossimbiontes (cepas apossimbióticas). Entretanto, perdem muitas das suas capacidades biossintéticas (Roitman e Camargo, 1985) e também apresentam diferenças nos glicoconjugados de superfície e enzimas proteolíticas (d'Avila-Levy et al., 2001, 2008). Entretanto, as alterações ultraestruturais acima citadas também são encontradas nas cepas apossimbióticas (Freymuller e Camargo, 1981; Roitman e Camargo, 1985; de Souza e Motta, 1999).

O status taxonômico dos tripanossomatídeos com endossimbiontes tem sido controverso e algumas propostas têm sido sugeridas. Baseando-se nas formas coanomastigotas que apresentam o cinetoplasto localizado posteriormente ao núcleo, Souza e Côrte-Real (1991) propuseram a reclassificação de *C. deanei* em um novo gênero chamado *Angomonas*. Posteriormente com base em características morfológicas e perfis de kDNA, Brandão e colaboradores (2000) propuseram a adoção do gênero *Strigomonas* para acomodar *C. oncopelti* (espécie inicialmente classificada como *Leptomonas* subgênero/gênero *Strigomonas* por Lowff e Lowff (1963) e *Angomonas* para *C. deanei* e *C. desouzai*. Entretanto devido à falta de dados taxonômicos suportados por análises filogenéticas moleculares, essa classificação não foi adotada.

Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão. Características ultraestruturais de tripanossomatídeos portadores de endossimbionte bacteriano. Rede de kDNA frouxa (A, B); ausência de microtúbulos subpeliculares nas regiões em que ramificações da mitocôndria se aproximam da porção interna da membrana plasmática indicada pelas setas (C); estrutura paraflagelar ausente (D). Note diferenças na compactação do cinetoplasto em *C. deanei* (A) e *C. oncopelti* (D). Endossimbionte (E), mitocôndria (M), núcleo (N).

1.4.1 Filogenia dos endossimbiontes de tripanossomatídeos

A endossimbiose bacteriana em tripanossomatídeos foi inicialmente descrita em *Blastocrithidia culicis* e seus simbiossomas foram chamados de diplossomos (Novey et al., 1907). Posteriormente Newton e Horne (1957) reportaram estruturas reprodutivas no citoplasma de *C. oncopelti*, as quais foram denominadas de corpos bipolares. Nos endossimbiontes de *C. oncopelti* foi comprovada pela primeira vez a presença de DNA similar ao de bactérias. A origem procariótica destas estruturas foi confirmada pelo tratamento com antibiótico, que “curou” o flagelado eliminando os corpos bipolares (Chang, 1974; Roitman e Camargo, 1985; De Souza e Motta, 1999). Desde então, diversos estudos tem sido realizados a fim de entender o relacionamento dos endossimbiontes com os tripanossomatídeos e a origem desta simbiose (Freytmüller e Camargo, 1981; Du et al., 1994a,b; Hollar et al., 1998; Motta et al., 1997; 2004; De Souza e Motta, 1999).

A primeira análise filogenética de endossimbiontes de tripanossomatídeos foi realizada por Du e colaboradores (1994a; b). Nesses estudos, foram obtidas

sequências de 16S e ITS ribossômicos dos endossimbiontes de *C. deanei*, *C. desouzai*, *C. oncopelti* e *B. culicis*. Os resultados demonstraram que os endossimbiontes das três espécies de *Crithidia* eram idênticos e muito similares ao de *B. culicis*, e que as sequências destes simbiontes apresentavam grande similaridade com a sequência de *Bordetella bronchiseptica*, pertencente à divisão betaproteobacteria. A distância genética entre o simbionte de *B. culicis* e os endossimbiontes de *Crithidia* spp. é similar à encontrada entre espécies de *Bordetella*. Desta forma, os endossimbiontes de *Blastocrithidia* e *Crithidia* spp. foram considerados betaproteobacteria e classificados como *Kinetoplastibacterium blastocrithidii* e *Kinetoplastibacterium crithidii*, respectivamente (Du et al., 1994a,b). Entretanto, os genes FtsZ (de origem procarótica e homólogos aos de tubulina dos eucariotos) foram observados nos endossimbiontes de *C. deanei* e *B. culicis*, sendo as sequências muito similares nas duas espécies e relacionadas com *Pseudomonas putida* que é pertencente a divisão gammaproteobacteria (Motta et al., 2004), indicando assim uma origem diferente para os simbiontes.

Estudos recentes, baseados em análises dos genomas completos dos simbiontes de tripanossomatídeos, mostraram a total sintenia dos genes das espécies de endossimbiontes e confirmaram que estes pertencem a divisão betaproteobacteria, família Alcaligenacea (Alves et al., 2013, Motta et al., 2013). Contudo, esses endossimbiontes são mais proximamente relacionados com o gênero *Taylorella* do que com o gênero *Bordetella* (Alves et al., 2013). Esses estudos também demonstraram que os simbiontes mantiveram preferencialmente os genes necessários para a biossíntese de compostos necessários aos hospedeiros e que genes relacionados com a cooperação com o hospedeiro são mais comumente retidos no genoma e apresentam pressão positiva de seleção.

Análises filogenéticas baseadas em genes ribossômicos demonstraram que estes simbiontes (16S rRNA) são tão filogeneticamente relacionados quanto seus hospedeiros (SSU rRNA). Esses dados sugerem que a simbiose desses tripanossomatídeos se originou em um único evento, com uma história evolutiva antiga (provavelmente em um tempo em que o protozoário ancestral era capaz de realizar atividades como fagocitose) no qual houve a aquisição de uma betaproteobacteria por um hospedeiro ancestral, seguido de co-evolução com seus respectivos hospedeiros (Du et al. 1994a,b).

Além de simbioses bacterianas, algumas espécies da família Trypanosomatidae podem albergar também partículas virais. Diversos estudos demonstraram a presença de partículas virais denominadas LRV pertencentes à família Totiviridae em algumas espécies do gênero *Leishmania* (Tarr et al, 1988; Widmer et al, 1989; Gupta e Deep, 2007). Estudos filogenéticos baseados em sequências de vírus dsRNA mostraram que há dois grupos de vírus em leishmânias: LRV1 encontrado em algumas espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (novo mundo) e LRV2 encontrado em *L. major* (velho mundo). As distâncias genéticas entre LRV1 e LRV2 são muito semelhantes às distâncias genéticas dos parasitas hospedeiros. Assim, esses dados indicam que os vírus provavelmente estavam presentes nas leishmanias antes da divergência entre o novo e velho mundo, e que os simbioses co-evoluíram com seus hospedeiros (Scheffter et al, 1995; Widmer e Dooley 1995; Zamora et al., 2000). Estudos recentes demonstraram que a presença do vírus LRV1 pode ser um dos principais fatores que contribuem para o potencial metastático de leishmanias do subgênero *Viannia* (Ives et al, 2011; Ronet et al; 2011). Entretanto a relação do vírus LRV2 com o parasita ainda é desconhecida (Hartley et al., 2012). *Crithidia desouzai* é a única espécie de tripanossomatídeo que alberga simultaneamente simbioses bacterianas e partículas virais. Análises ultraestruturais e de imunohistoquímica mostraram partículas semelhantes a vírus (VLPs) no citoplasma de *C. desouzai*. Essas partículas são formadas por RNA, tem formato hexagonal e geralmente ficam mais próximas do núcleo (Motta et al., 2003).

1.5 Gênero *Herpetomonas*

O gênero *Herpetomonas* foi criado para acomodar tripanossomatídeos parasitas monoxênicos de insetos que apresentam formas promastigotas (cinetoplasto localizado anteriormente ao núcleo) e opistomastigotas (cinetoplasto posterior ao núcleo) em seus ciclos de vida (Hoare e Wallace, 1966). Criar um novo gênero para acomodar flagelados apresentando formas opistomastigotas nos insetos e em culturas deveria facilitar a identificação de *Herpetomonas*. No entanto, formas opistomastigotas são raramente encontradas ou até mesmo ausentes tanto em insetos como em culturas, podendo, além disso, ser confundidas com as formas opistomorfos, estas últimas encontradas nos tripanossomatídeos que albergam

simbiontes (Teixeira et al., 1997). Estas incertezas geraram inúmeras classificações equivocadas de espécies de *Herpetomonas* em gêneros que também apresentam formas promastigotas como *Leptomonas* e *Phytomonas* (Teixeira et al., 1997). A maioria dos flagelados descritos como *Herpetomonas* foram isolados de dípteros (Teixeira et al., 1997; Wallace, 1966). Entretanto, há relatos de flagelados pertencentes a esse gênero encontrados em hemípteros predadores (Roitman et al., 1976), plantas (Fiorini et al., 2001) e até mesmo em humanos imunodeprimidos (Chicharro e Alvar, 2003; Morio et al., 2008). Em seus hospedeiros mais comuns, os dípteros, formas promastigotas vivem no trato digestivo, preferencialmente no reto, podendo ser encontradas livres ou ligadas às células endoteliais (Hupperich et al., 1992; Nayduch, 2009).

Baseando-se nos critérios taxonômicos tradicionais, centenas de espécies de *Herpetomonas* foram descritas (Podlipaev, 1990; Wallace, 1966; Wallace et al., 1983). Entretanto, inferências filogenéticas recentes revelaram que os flagelados classificados pela taxonomia tradicional como *Herpetomonas* ficam posicionados em clados distantes e não relacionados (figura 2). Sendo assim, o gênero *Herpetomonas* é atualmente considerado polifilético.

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados na tentativa de distinguir as espécies de *Herpetomonas*. Análises de polimorfismos de restrição e hibridização cruzada usando sequências de DNA ribossomal e de kDNA, além de distinguir diferentes espécies de *Herpetomonas* revelaram que espécies anteriormente classificadas neste gênero são mais relacionadas com outros gêneros de tripanossomatídeos (Camargo et al., 1992; Nunes et al., 1994; Teixeira et al., 1997). Análises de padrões de RAPD e de RFLP revelaram polimorfismos intraespecíficos no gênero *Herpetomonas* (Fiorini et al., 2001).

Recentemente, a combinação de dados filogenéticos e morfológicos foi utilizada na descrição de novas espécies de *Herpetomonas* encontradas em duas espécies de Diptera pertencentes à família Ceratopogonidae: *Herpetomonas ztiplika* isolada de *Culicoides kibunensis* (Podlipaev et al., 2004a) e *Herpetomonas trimorpha*, isolada de *Culicoides truncorum* (Zídková et al., 2010). Embora existam inúmeras descrições de *Herpetomonas* spp. na literatura, somente uma pequena parte foi cultivada e está disponível para estudos comparativos (Figura 6).

Figura 6: Microscopia de luz de espécies de *Herpetomonas*: A) *H. muscarum*; B) *H. samuelpeessoai*; C) *H. trimorpha* (modificada de Zidková et al., 2010); D) *H. mirabilis*, E) *H. mariadeanei*. Note o acentuado polimorfismo encontrado entre as espécies no gênero *Herpetomonas*.

1.6 Genes utilizados para filogenia e taxonomia de tripanossomatídeos

A taxonomia dos tripanossomatídeos baseada em parâmetros taxonômicos tradicionais tem se mostrado incompatível com evidências demonstradas por dados moleculares. Embora estudos atuais apontem para a eficácia do uso de marcadores moleculares para gerar hipóteses evolutivas filogenéticas confiáveis da família Trypanosomatidae, os estudos focam parasitas monoxênicos e esses empregam um número pequeno de espécies. Desde as primeiras análises filogenéticas baseadas em sequências de genes ribossômicos (Sogin et al., 1986; Fernandes et al., 1993), o uso de sequências gênicas tem sido valioso na reconstrução da história evolutiva desses organismos.

Marcadores moleculares têm sido utilizados por diversos grupos, apesar de muitas vezes os resultados não serem facilmente comparáveis. Entretanto, esse é um requisito indispensável na taxonomia atual.

1.6.1 Gene ribossômico

Sequências dos genes ribossômicos têm sido amplamente utilizadas para inferir relações filogenéticas entre espécies do filo Euglenozoa. Os

tripanossomatídeos possuem um dos mais complexos padrões de moléculas maduras de RNA. Os genes de RNA ribossômico (rRNA) consistem de unidades de repetição compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos) que são intercaladas por espaçadores intergênicos (IGS) e se repetem em tandem mais de 100 vezes no genoma. Estes genes são processados em uma única unidade de transcrição conhecida como pré-rRNA. Após várias etapas de processamento o pré-rRNA dá origem a três moléculas de RNA maduros: 18S (SSU ou subunidade menor), 5.8S e 24S (LSU ou subunidade maior), que nestes organismos é constituída por dois fragmentos de alto peso molecular (24S α e 24S β) e quatro subunidades de rRNAs de baixo peso molecular (S1, S2, S4 e S6). As subunidades SSU e LSU são constituídas por sequências altamente conservadas e intercaladas por espaçadores de conservação intermediária ITS (ITS 1 e 2, espaçadores internos transcritos) e ETS (espaçador externo transcrito) que são flanqueados pelo espaçador intergênico (IGS), que apresenta sequências altamente variáveis (Sogin et al., 1986; Hernández et al., 1990) (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática do cistron ribossômico de tripanossomatídeos.

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

restrição nos genes ribossômicos de tripanossomatídeos também pode auxiliar na classificação em gêneros. Já foi demonstrado que espécies de *Crithidia* que não tem simbiontes (apossimbióticas) e *Herpetomonas* tem sítios para *PvuII* na SSU, ausentes em *Phytomonas*. Um sítio para *Hind III*, observado na LSU (24Sα) das espécies de *Crithidia* apossimbióticas não foi detectado em *Phytomonas* e *Herpetomonas*. As espécies de *Leptomonas* e os tripanossomatídeos com endossimbiontes apresentaram heterogeneidade destes sítios de restrição (Camargo et al., 1992; Teixeira et al., 1994;1997; Batistoti et al., 2001). Em análises por “riboprinting” de SSUrDNA amplificado por PCR de 19 espécies/isolados do gênero *Crithidia* revelou-se uma grande variabilidade genética entre os isolados analisados, que foram separados em 7 tipos/grupos: 1) *C. deanei*; 2) *C. oncopelti*; 3) *C. fasciculata* e *C. luciliae*; 4) *C. flexonema*; 5) *C. melificae*; 6) *C. acanthocephali* e *C. harmosa*; 7) *C. hutneri* e *C. l. thermophila* (Clark, 1997).

As sequências do gene SSU rRNA são as mais utilizadas em estudos comparativos devido a características importantes, tais como: a) o pequeno tamanho que permite fácil obtenção por amplificação por PCR; b) a presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas que permitem alinhamentos altamente confiáveis, com oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e nove regiões variáveis (V1-V9) (Hernández et al., 1990). Além disso, existem dezenas de sequências de SSU rRNA de diferentes espécies de flagelados da família Trypanosomatidae depositadas em bancos de sequências, permitindo a rápida comparação de novas sequências com as de espécies ou linhagens já conhecidas.

Os espaçadores IGS e ITS são muito mais variáveis que as regiões SSU e LSU. A região entre a SSU e a LSU contém três regiões: ITS1, 5.8S altamente conservada) e ITS2. As sequências de ITS1 e ITS2 diferem inter e intra-especificamente, sendo excelentes para análises de organismos filogeneticamente próximos assim como alvos para diagnóstico.

Análises do tamanho e de sítios de restrição de ITS rDNA, especialmente ITS1, revelaram-se valiosas no estudo de variabilidade inter e intraespecíficas de flagelados dos gêneros *Trypanosoma* (Cuervo et al., 2002; Fernandes et al., 1999; Ferreira et al., 2007; Lima et al., 2012; Maia da Silva et al., 2004b; Rodrigues et al., 2006, 2008; Santos et al., 2002) e *Leishmania* (Cupolillo et al, 1995; 1998; Schönián et al., 2000). Resultados obtidos por nosso grupo mostraram que tamanhos de ITS

separam grupos intraespecíficos de *Herpetomonas* (Teixeira et al., 1996; 1997; Takata et al., 1996; Fiorini et al., 2001) e de *Phytomonas* (Serrano, 2000). Recentemente Dollet e colaboradores (2012), baseados em sequências de ITS rDNA, identificaram 10 grupos distintos de isolados de *Phytomonas*, evidenciando, assim, a utilidade de sequências de ITS rDNA para avaliar a diversidade de tripanossomatídeos de plantas.

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

Nas espécies da família Trypanosomatidae, as enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e glicerol encontram-se em organelas peculiares, chamadas glicossomos. A compartimentalização de enzimas da via glicolítica em tripanossomatídeos contrasta com sua localização citossólica nos demais eucariotos. Em tripanossomas, foram encontrados dois genes que codificam a enzima glicossômica (gGAPDH) e um gene que codifica uma enzima citossólica (cGAPDH). (Michels et al. 1986; Kendall et al. 1990) (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática dos genes de GAPDH.

Os genes de gGAPDH apresentam duas cópias praticamente idênticas e por codificarem proteínas, estão sujeitos a diferentes pressões seletivas e taxas de evolução se comparados aos genes ribossômicos. Os genes de gGAPDH são excelentes marcadores para estudos filogenéticos de tripanossomatídeos, permitindo alinhamentos confiáveis de sequências de organismos geneticamente distantes (Hamilton et al., 2004, 2005a,b, 2007; Stevens, 2008).

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

com um grande número de tripanossomatídeos baseado em genes gGAPDH e que utilizou diferentes métodos de inferências filogenéticas, confirmou a polifilia do gênero *Crithidia*, assim como a monofilia dos tripanossomatídeos com endossimbiontes (Hamilton et al., 2004).

1.6.3 Polimorfismo de moléculas de minicírculos de kDNA

Os cinetoplastídeos modificaram sua única mitocôndria, alterando o conteúdo de DNA e sua organização, gerando o cinetoplasto, uma região rica em moléculas de DNA (kDNA) concatenadas em uma única rede. O kDNA consiste de moléculas dupla-fita circulares possuindo entre 5.000-10.000 minicírculos e 20-40 maxicírculos (Englund, 1978; Marini et al., 1980; Lukeš e Votýpka, 2000; Jensen e Eglund, 2012).

Assim como DNA mitocondrial de outros organismos, os maxicírculos codificam rRNA e várias proteínas envolvidas na transdução de energia (incluindo subunidades de citocromo-oxidase, NADH desidrogenase e ATP - sintetase). Já os minicírculos codificam os RNAs guias, que participam do processo de edição das moléculas de RNA codificadas nos maxicírculos (Jensen e Eglund, 2012).

Os minicírculos do kDNA dos tripanossomatídeos apresentam tamanhos muito variáveis e sequências heterogêneas, exceto pela presença de uma região conservada formada por ~100-200 pares de bases chamada UMS ("Universal Minicircle Sequence") que corresponde à origem de replicação. Essa região é formada por três blocos CSB ("Conserved Sequence Blocks") - CSBs 1, 2 e 3 - e dependendo da espécie pode ter uma, duas ou quatro cópias com localizações opostas e distantes simetricamente (Jensen and Englund, 2012; Simpson, 1987; Lukeš et al., 2002; Ray, 1989). *Crithidia fasciculata*, uma das espécies mais utilizadas em estudos de organização e replicação de kDNA (Guilbride e Englund, 1998; Morris et al., 2001; Klingbeil e Englund, 2004), apresenta duas UMS separadas a 180° (Figura 9) (Jensen e Englund, 2012; Sugisaki e Ray, 1987).

Figura 9. A: Representação esquemática da organização das moléculas de minicírculos de kDNA de *C. fasciculata*: CR, Conserved region; CSB, "Conserved Sequence Blocks" (Ray, 1989). B: Microscopia eletrônica da rede de kDNA de *C. fasciculata*, e C: kDNA desconcatenados. As setas indicam os maxicírculos (modificada de Liu et al., 2005)

Interespecificamente os minicírculos do kDNA diferem acentuadamente em tamanho e sequência. Intraespecificamente, estas moléculas diferem na sequência, mas são, geralmente, homogêneas em tamanho, ou pelo menos apresentam uma classe majoritária. O polimorfismo de tamanho de minicírculos do kDNA varia conforme o gênero; o maior é o encontrado entre espécies de *Trypanosoma*, que varia de 465bp em *T. vivax* (Borst et al., 1985) a mais de 5,0kb em tripanossomas de peixes (Jirků et al., 1995) e até ~10,0kb em *T. avium* (Yurchenko et al., 1999; Lukeš e Votýpka, 2000). As espécies de *Leishmania* apresentam uma pequena variação de tamanho de minicírculos (~600 a 970bp), que são heterogêneos em sequências (Yurchenko e Kolesnikov, 2001).

As análises de minicírculos de kDNA revelaram um só tamanho por espécie do gênero *Phytomonas*, grande heterogeneidade entre as espécies, com pelo menos cinco classes de moléculas (tamanhos de 1,3 a 2,8kb), porém, com grupos de isolados que compartilham o tamanho destas moléculas (Muller et al., 1995). O sequenciamento de minicírculos de *P. serpens* revelou duas origens de replicação (Dollet et al., 2001; Sá-Carvalho et al., 1993; Maslov et al., 1998).

Ao contrário das espécies dos gêneros *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Phytomonas*, que apresentam minicírculos que variam de tamanho e de sequência apenas interespecificamente, os membros do gênero *Crithidia* apresentam classes de tamanhos e sequências variáveis intraespecificamente.

Pestov e colaboradores (1990) descreveram quatro classes de minicírculos (1,3; 1,6; 1,9 e 2,2 kb) em *C. oncopelti*. Posteriormente, foi demonstrado que o tamanho dos minicírculos de kDNA permite agrupar os isolados do gênero *Crithidia* e que as espécies com endossimbiontes apresentam minicírculos muito heterogêneos quanto ao tamanho (entre 1,3 e mais de 4,0kb) e número de classes. As espécies com endossimbiontes apresentaram três padrões de moléculas representadas, respectivamente por: *C. deanei*, *C. desouzai* e *C. oncopelti*. Os tripanossomatídeos com formas coanomastigotas sem endossimbiontes foram distribuídos em três grupos representados respectivamente por *C. fasciculata*, *C. l. termophila* e *C. acantocephali* (Teixeira et al., 1995, Malvezzi et al. 1996). Hollar e colaboradores (1998) também mostraram que os minicírculos de algumas espécies com endossimbiontes apresentam tamanhos acima de 4,0kb, sendo esses os maiores encontrados entre tripanossomatídeos de insetos. A heterogeneidade e o agrupamento de espécies com formas coanomastigotas, com base no tamanho dessas moléculas foram confirmados por Brandão et al., (2000).

Devido ao grande número de cópias e a divergência entre espécies, os minicírculos de kDNA têm sido alvos de métodos diagnósticos. A homogeneidade de tamanho das moléculas tem sido explorada para o diagnóstico de *T. cruzi* por PCR (Ávila et al., 1990; Wincker et al., 1994; Junqueira et al., 1996; Gomes et al., 1998) e para separar esta espécie de *T. rangeli* (Vallejo et al., 1999). A amplificação de sequência de minicírculos de kDNA também tem sido bastante utilizada no diagnóstico de *Leishmania* spp. (Noyes et al., 1998; Martin Sanches, 2004; Cortes et al., 2004). Recentemente, de Pereira e Brandão (2013) demonstraram que o perfil de composição de dinuclotídeos dos minicírculos podem ser capazes de diferenciar membros pertencentes a família Trypanosomatidae.

Os padrões de digestão de kDNA por endonucleases de restrição (esquizodemas) são característicos para espécies de tripanossomatídeos (Morel e Simpson, 1980; Morel et al., 1986; Camargo et al., 1982). Diferentes espécies de *Crithidia* diferem nos padrões de esquizodema (De Sa et al., 1980; Camargo et al., 1982; Hollar et al., 1998). A heterogeneidade intraespecífica de sequências de kDNA foi utilizada para identificar subgrupos de *Herpetomonas* (Nunes et al., 1994; Teixeira et al., 1997; Fiorini et al., 2001). Grupos de isolados de *Phytomonas* definidos de acordo com o tamanho destas moléculas foram confirmados por

marcadores de RAPD e por sequências dos genes ribossômico e SL (Serrano, 2000).

5. CONCLUSÃO

- O estudo de tripanossomatídeos parasitas de moscas capturadas na América do Sul (Brasil, Venezuela e Colômbia) e África (Moçambique, Guiné Bissau e Madagascar) revelou que os gêneros *Angomonas* e *Herpetomonas* apresentam forte associação com moscas.
- Análises filogenéticas baseadas nos genes SSU rRNA e gGAPDH apoiaram a monofilia de todos os tripanossomatídeos com endossimbiontes, a divisão em dois subclados correspondentes aos gêneros *Strigomonas* e *Angomonas* e a descrição de uma nova espécie de cada gênero.
- A comparação (*DNA barcoding*) de 364 culturas de moscas coletadas na América do Sul e África revelou que 20% são do gênero *Angomonas*, 71% delas de Calliphoridae. Análises de amostras de tubo digestivo detectaram *Angomonas* em 51% das moscas. De 83 tripanossomatídeos de moscas, 61 foram identificados como *A. deanei*, 16 como *A. desouzai* e 6 como *A. ambiguus*. *A. deanei* e *A. desouzai* apresentaram diversos genótipos.
- Os principais hospedeiros de *Angomonas* são moscas dos gêneros *Chrysomya* e *Lucilia* (51%) sugerindo que a dispersão recente dessas moscas deve ter tido um papel importante na distribuição mundial das mesmas espécies e genótipos de *Angomonas*.
- Análises filogenéticas revelaram três novas espécies de endossimbiontes e congruência entre a maioria das espécies hospedeiras e seus simbiossiontes, sugerindo co-divergência.
- As filogenias inferidas para os tripanossomatídeos de moscas permitiram validar o gênero *Herpetomonas*, que agora compreende 13 espécies válidas, incluindo 5 novas espécies descritas com esse estudo.
- As espécies de *Angomonas* e *Herpetomonas* são parasitas generalistas de moscas, tão cosmopolitas quanto seus hospedeiros.

6. REFERÊNCIAS

Alfieri SC, Camargo EP. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine de

Alves JM, Serrano MG, Maia da Silva F, Voegtly LJ, Matveyev AV, Teixeira MMG, Camargo EP, Buck GA. Genome evolution and phylogenomic analysis of *Candidatus Kinetoplastibacterium*, the betaproteobacterial endosymbionts of *Strigomonas* and *Angomonas*. *Genome Biol Evol*. 2013;5:338-50.

Alves JM, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS One*. 2011;6(8):e23518.

Amorim DS, Yeates D. Pesky Gnats: Ridding dipteran classification of the Nematocera. *Studia dipterologica*. 2006;13(1): 3-9.

Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;48:211-21.

Batistoti M, Cavazzana M JR, Serrano MG, Ogatta SF, Baccan GC, Jankevicius JV, Teixeira MM, Jankevicius SI. Genetic variability of Trypanosomatids isolated from *Phytophagous hemiptera* defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J Parasitol*. 2001;87:1335-41.

Borst P, Fase-Fowler F, Weijers PJ, Barry JD, Tetley L, Vickerman K. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma vivax* and *T. congolense*. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;15:129-42.

Brandão AA, Miranda A, Degraive WM, Sousa MA. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Parasitol Res*. 2000;86:809-12.

Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. *J Eukaryot Microbiol*. 2007;54(1):86-92.

Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*. 2001;31:1218-26.

Busse I, Preisfeld A. Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:617-24.

Busse I, Preisfeld A. Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene*. 2002;284:83-91.

Camargo EP. Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol*. 1999;42:29-112.

*De acordo com:

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

- Camargo EP. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. Adv Parasitol. 1998;42:29-112.
- Camargo EP, Sbravate C, Teixeira MMG, Uliana SRB, Soares MBM, Affonso HT, Floeter-Winter LM. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of trypanosomatids. J Parasitol. 1992;78: 40-8.
- Camargo EP, Mattei DM, Barbieri CL, Morel CM. Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of kDNA, of esterase isoenzymes and surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids. J Protozool. 1982;29:251-58.
- Camargo EP, Freymuller, E. Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyl transferase in trypanosomatid. Nature. 1977;270:52-3.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1964;6:93-100.
- Carvalho ALM. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). Rev Patol Trop. 1973;2:223-74.
- Cavalcanti DP, Thiry M, Desouzai W, Motta MC. The kinetoplast ultrastructural organization of the endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. Histochem Cell Biol. 2008;130:1177-85.
- Chang KP. Haematophagous insect and haemoflagellate as hosts for prokaryotic endosymbionts. Symp Soc Exp Biol. 1975;29:407-28
- Chang KP. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *B. culicis* and *C. oncopelti*. J Protozool. 1974a;21:699-707.
- Chang KP, Trager W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. Science. 1974b;183:531-32.
- Chicharro C, Alvar J. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97:75-8.
- Clark, CG. Riboprinting: a tool for the study of genetic diversity in microorganisms. J Eukaryot Microbiol. 1997;44:277-83.
- Colles DH, McAlpine DK. Diptera, p. 717-786. In: CSIRO (Ed.). The insects of Australia. Victoria, Melbourne University Press. 1991;1137p.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98 (1):12-7.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Añez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MMG. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. Parasitolgy. 2006;133:159-69.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:877-80.

Cupolillo E, Pereira LO, Fernandes O, Catanho MP, Pereira JC, Medina-Acosta E, Grimaldi GJR. Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:5677-83.

Cupolillo E, Grimaldi JR, Momem H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995;73:145-55.

d'Avila-Levy CM, Santos LO, Marinho FA, Matteoli FP, Lopes AH, Motta MCM, Santos ALS, Branquinha MH. *Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut. Exp Parasitol. 2008;118: 345-53.

d'Avila-Levy CM, Melo ACN, Vermelho AB, Branquinha MH. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. FEMS Microbiol Lett. 2001;202:73-7.

de Azeredo-Espin AM, Lessinger AC. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. Genetica. 2006;126:111-31.

de Azevedo-Martins AC, Frossard ML, de Souza W, Einicker-Lamas M, Motta MC. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. FEMS Microbiol Lett. 2007;275:229-36.

de Oliveira Ramos Pereira L, Brandão A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. Parasitol Int. 2013;62(4):397-403.

De Sá, MFG, De Sá, CM, Veronese, MA, Astolfi Filho S, Gander ES. Morphological and biochemical characterization of *Crithidia brasiliensis* sp. n. J Protozool. 1980;27:253-7.

De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biol Dis. 2002;31;1(1):3.

De Souza W, Motta MCM. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. FEMS Microbiol Lett. 1999;173:1-8.

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

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolves 10 groups Infect Genet Evol. 2012;12(2):299-308.

Dollet M, Sturm NR, Ahomadegbe JC, Campbell DA. Kinetoplast DNA minicircles of phloem-restricted *Phytomonas* associated with wilt diseases of coconut and oil palms have a two-domain structure. FEMS Microbiol. Lett. 2001;205:65-9.

Du Y, Maslov DA, Chang KP. Monophyletic origin of beta-division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. Proc Natl Acad Sci USA. 1994a;91:8437-41.

Du Y, McLaughlin G, Chang KP. 16S ribosomal DNA sequence identities of beta-proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. J Bacteriol. 1994b;176:3081-4.

- Ebbert MA, Burkholder JJ, Marlowe JL. Trypanosomatid prevalence and host habitat choice in woodland *Drosophila*. *J Invertebr Pathol*. 2001;77:27-32.
- Englund PT. The replication of kinetoplast DNA networks in *Crithidia fasciculata*. *Cell*. 1978;14(1):157-68.
- Faria e Silva PM, Fiorini JE, Soares MJ, Alviano CS, de Souza W, Angluster J. Membrane-associated polysaccharides composition, nutritional requirements and cell differentiation in *Herpetomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. *J Eukaryot Microbiol*. 1994;41:55-9.
- Faria e Silva PM, Solé-Cava AM, Soares MJ, Motta MC, Fiorini JE, de Souza W. *Herpetomonas roitmani* (Fiorini et al., 1989) n. comb.: a trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm. *J Protozool*. 1991;38:489-94.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology*. 1999;118:161-6.
- Fernandes O, Teixeira MM, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraive WM, Campbell DA. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(6):535-9.
- Fernandes O, Degraive W, Campbell DA. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. *Parasitology*. 1993;107:219-24.
- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MMG. A Phylogenetic Lineage of Closely Related Trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of Anurans and Sand Flies (Psychodidae, Diptera) Sharing the Same Ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55:427-35.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MMG. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology*. 2007;134:1623-38.
- Fiorini JE, Takata CS, Teofilo VM. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelpessoai camargoi* n. subsp., a Trypanosomatid isolated from the flower of the squash *Cucurbita moschata*. *J Eukaryot Microbiol*. 2001;48:62-9.
- Fiorini JE, Silva PMF, Soares MJ, Brazil RP. Três novas espécies de tripanosomatídeos isolados em Alfenas, Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989;84:69-74.
- Freytmüller E, Camargo EP. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *J Protozool*. 1981;28: 175-82.
- Frossard ML, Seabra SH, DaMatta RA, de Souza W, de Mello FG, Motta MC. An endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:443-9.
- Galinari S, Camargo EP. Trypanosomatid protozoa: survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. *Exp Parasitol*. 1978;46:277-82.

- Galvez Rojas RL, Frossard ML, Machado Motta MC, Silber AM. L-Proline uptake in *Crithidia deanei* is influenced by its endosymbiont bacterium. FEMS Microbiol Lett. 2008;283:15-22.
- Gill JW, Vogel HJ A bacterial endosymbiont in *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*: biochemical and morphological aspects. J Protozool. 1963;10: 148-52.
- Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp. Parasitol. 1998;88:1 28-33.
- Guilbride DL, Englund PT. The replication mechanism of kinetoplast DNA networks in several trypanosomatid species. J Cell Sci. 1998;111:675-9.
- Guimarães JH, Papavero N. Myiasis in man and animals in the Neotropical region. Bibliographic database. São Paulo, Editora Plêiade/FAPESP. 1999;p.308.
- Gupta AK, Nayduch D, Verma P, Shah B, Ghate HV, Patole MS, Shouche YS. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). FEMS Microbiol Ecol. 2012;79(3):581-93
- Gupta V, Deep A. An insight into the *Leishmania* RNA virus. Indian J Med Microbiol. 2007;25:7-9.
- Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, Herder S. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. Infect Genet Evol. 2009;9(1):81-6.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Molecular phylogenetics and evolution. 2007;44:15-25.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). Int J Parasitol. 2005a;35:431-43.
- Hamilton PB, Stevens JR, Cooke B, Boag B, Holz P, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. Mol Ecology. 2005b;14:3167-76.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson CW. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small ribosomal RNA. Int J Parasitol. 2004;34:1393-404.
- Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:99.
- Hernandez R, Rios P, Valdez AM, Piñero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small subunit ribosomal RNA coding region: comparison with others trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 1990;41:207-12.
- Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Part 2 Systematic. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1972. p. 123-625:
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature. 1966;212:1385-6.

Hollar L, Lukeš J, Maslov DA. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *J Eukaryot Microbiol.* 1998;45:293-7.

Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;89:295-9.

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

Hupperich K, Camargo EP, Milder R. Ultrastructural study of the host-parasite relationship of trypanosomatids in the housefly. *Parasitol Res.* 1992;78:48-55.

Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson SM, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P, Fasel N, Masina S. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science.* 2011;331:775-8.

Jensen RE, Englund PT. Network news: the replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:473-91.

Jirků M, Kolesnikov AA, Benada O, Lukeš J. Marine fish and ray trypanosomes have large kinetoplast minicircle DNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;73:279-83.

Jirků M, Yurchenko VY, Lukeš J, Maslov DA. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59:537-547.

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

Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1996;90:129-32.

Klingbeil MM, Englund PT. The gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:4333-4.

Kořený L, Oborník M, Lukeš J. Make it, take it, or leave it: heme metabolism of parasites. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003088.

Kořený L, Lukeš J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *Int J Parasitol.* 2010;40:149-56.

Kutty SN, Pape T, Pont A, Wiegmann BM, Meier R. The Muscoidea (Diptera:Calyptratae) are paraphyletic: Evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol.* 2008;49(2):639-52.

Laird M. Blastocrithidia N. G. (Mastigophora : Protomonadina) for Crithidia (in Part), with a Subarctic Record for B. Gerridis (Patton), 1959. *Canadian Journal of Zoology.* 1959;37:749-52.

Leger L. Sur un flagelle parasite de l'*Anopheles maculipennis*. Compt Rend Soc Biol. 1902;54:354-6.

Lewis JW, Ball SJ. Electron microscope study of the epimastigotes of a fish trypanosome, *Trypanosoma cobitis*, in culture. Ann Trop Med Parasitol. 1981;75:533-8.

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

Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. Trends Parasitol. 2005;21(8):363-9.

Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zídková A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. Euk Cell. 2002;1:495-502.

Lukeš J, Votýpka J. *Trypanosoma avium*: novel features of the kinetoplast structure. Exp Parasitol. 2000;96:178-81.

Lwoff M, Lwoff A. Recherches sur la morphologie de *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden et *Leptomonas fasciculata* Novy, Mc Neal et Torrey. Arch Zool Exp Gen. 1931;71:21-37.

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

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

Malvezzi A, Takata CSA, Campaner M, Teixeira MMG, Camargo EP. High genetic heterogeneity of symbiont-harboring trypanosomatids. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:91.

Marinho MA, Junqueira AC, Paulo DF, Esposito MC, Villet MH, Azeredo-Espin AM. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. Mol Phylogenet Evol. 2012;65:840-54.

Marini JC, Miller KG, Englund PT. Decatenation of kinetoplast DNA by topoisomerases. J Biol Chem. 1980;255(11):4976-9.

Martin DS, Desser SS. A light and electron microscopic study of *Trypanosoma fallisi* n. sp. in toads (*Bufo americanus*) from Algonquin Park. Ontario. J Protozool. 1990;37:199-206.

Martín-Sánchez J, Pineda JA, Morillas-Márquez F, García-García JA, Acedo C, Macías J. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase

chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. Am J Trop Med Hyg. 2004;70(5):545-8.

Maslov DA, Hollar L, Haghighat P, Nawathean P. Demonstration of mRNA editing and localization of guide RNA genes in kinetoplast-mitochondria of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol Biochem Parasitol. 1998;93:225-36.

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

Maslov DA, Yurchenko VY, Jirků M, Lukeš J. 2012. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. J Eukaryot Microbiol. 2012;57(2):177-88

Maslov DA, Yurchenko VY, Jirků M, Lukeš J. Two new species of trypanosomatids parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. J Eukaryot Microbiol. 2010;57:177-88.

Maslov DA, Westenberger SJ, Xu X, Campbell DA, Sturm NR. Discovery and barcoding by analysis of spliced leader RNA gene sequences of new isolates of Trypanosomatidae from Heteroptera in Costa Rica and Ecuador. J Eukaryot Microbiol. 2007;54:57-65.

McAlpine, J.F., and Wood, D.M. (Coordinators). 1989. Manual of Nearctic Diptera. Vol. 3. Agriculture Canada Monograph No. 32.

McGhee RB. The relation of contiguity of host and parasite life cycles to survival of species of Trypanosomatidae. J Parasitol. 1970;56:231-2.

McGhee RB, Hanson WL. The relationship of various crithidias as determined by serological reactions. J Protozool. 1963;10: 239-43.

Mello RP. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. Entomologia y Vectores. 2003;10(2):255-268.

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

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

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

Morel C, Simpson L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. Am J Trop Med Hyg. 1980;29:1070-4.

Morel CM, Deane MP, Goncalves AM. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. Parasitol Today. 1986;2:97-101.

Morio F, Reynes J, Dollet M, Pratlong F, Dedet JP, Ravel C. Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol*. 2008;46(11):3845-7.

Morris JC, Drew ME, Klingbeil MM, Motyka SA, Saxowsky TT, Wang Z, Englund PT. Replication of Kinetoplast DNA: An Update for the New millennium. *Int J Parasitol*. 2001;31:453-8.

Motta MC, Martins AC, de Souza SS, Catta-Preta CM, Silva R, Klein CC, de Almeida LG, de Lima Cunha O, Ciapina LP, Brocchi M, Colabardini AC, de Araujo Lima B, Machado CR, de Almeida Soares CM, Probst CM, de Menezes CB, Thompson CE, Bartholomeu DC, Gradia DF, Pavoni DP, Grisard EC, Fantinatti-Garboggini F, Marchini FK, Rodrigues-Luiz GF, Wagner G, Goldman GH, Fietto JL, Elias MC, Goldman MH, Sagot MF, Pereira M, Stoco PH, de Mendonça-Neto RP, Teixeira SM, Maciel TE, de Oliveira Mendes TA, Ürményi TP, de Souza W, Schenkman S, de Vasconcelos AT. Predicting the proteins of *Angomonas deanei*, *Strigomonas culicis* and their respective endosymbionts reveals new aspects of the trypanosomatidae family. *PLoS One*. 2013;8:e60209.

Motta MCM, Catta-Preta CMC, Schenkman S, Martins ACA, Miranda K, de Souza W, Elias MC. The bacterium endosymbiont of *Crithidia deanei* undergoes coordinated division with the host cell nucleus. *PLoS One*. 2010;5:e12415.

Motta MC, de Souza W, Thiry M. Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;221:17-23.

Motta MC, Picchi GF, Palmié-Peixoto IV, Rocha MR, de Carvalho TM, Morgado-Diaz J, de Souza W, Goldenberg S, Fragoso SP. The microtubule analog protein, FtsZ, in the endosymbiont of trypanosomatid protozoa. *J Eukaryot Microbiol*. 2004;51:394-401.

Motta MCM, Leal LHM, Souza WD, De Almeida DF, Ferreira LCS. Detection of Penicillin-binding Proteins in the Endosymbiont of the Trypanosomatid *Crithidia deanei*. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44:492-6.

Motta MC, Sole Cava AM, Silva PMF, Fiorini JE, Soares MJ, deSouza W. Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas angusteri*. *Can J Zool*. 1991;69: 571-7.

Muller E, Ahomadegbe JC, Coulaud D, Gargani D, Fernandez-Becerra C, Dollet M. Variability of kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for hartrot and marchitez diseases. *Phytopathology*. 1995;85:942-7.

Mundim MH, Roitman, I. Extra Nutritional Requirements of Artificially Aposymbiotic *Crithidia deane*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1977;24:329-31.

Mundim MH, Roitman I, Hermans M, Kitajima EW. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. *J Protozool*. 1974;21:518-21.

Nayduch D. Temporal progression of *Herpetomonas muscarum* Leidy (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in the midgut of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *J Entomol Sci*. 2009;44:141-148.

Newton BA, Horne RW. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*. I. Cytoplasmic structures containing ribonucleoprotein. *Exp Cell Res*. 1957;13:563-74.

Newton BS. Nutritional requirements and biosynthetic capabilities of the parasitic flagellate *Strigomonas oncopelti*. J Gen Microbiol. 1957;17(3):708-17.

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

Novey FG, McNeal WJ, Torrey HN. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. J Infect Dis. 1907;4:223-76.

Noyes HA, Stevens JR, Teixeira MMG, Phelan J, Holz P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. Int J Parasitol. 1998;29:331-9.

Nunes LR, Teixeira MMG, Camargo EP, Affonso HT. kDNA and rDNA sequences reveal a phylogenetic cluster of species originally placed in different genera of Trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. 1994;41:496-500.

Pape T, Blagoderov V, Mostovski, MB. Order Diptera Linnaeus, 1758. In:Zhang, Z.Q. (Ed.), Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness. Zootaxa. 2011;3148:222–229.

Pestov DG, Gladkaya LA, Maslov DA, Kolesnikov AA. Characterization of kinetoplast minicircle dna in the lower trypanosomatid *Crithidia-oncopelti*. Mol Biochem Parasitol.1990;41:135-45.

Podlipaev S, Votýpka J, Jirků M, Svobodová M, Lukeš J. *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). J Parasitol. 2004b;90:342-7.

Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol. 2001;31:648-52.

Podlipaev SA, Frolov AO, Kolesnikov AA *Proteomonas inconstans* n.gen. n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) - a parasite of the bug *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera: Miridae). Parazitologia. 1990;24:339-45.

Podlipaev SA, Sturm NR, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, Campbell DA, Lukeš J. Diversity of insect Trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. J Eukaryot Microbiol. 2004a;51:283-90.

Poinar G Jr, Poinar R. Fossil evidence of insect pathogens. J Invertebr Pathol. 2005;89(3):243-50.

Ray DS. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. Mol Cell Biol. 1989;9:1365-7.

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

Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira M.G. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates

- associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 2006;132:215-24.
- Roger AJ, Simpson AG. Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree. *Curr Biol*. 2009;19:R165-7.
- Roitman I, Camargo EP. Endosymbionts of Trypanosomatidae. *Parasitol Today*. 1985;1:143-4.
- Roitman I, Muddin MH. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. *J Protozool*. 1977;24:p. 329-31.
- Roitman I, Brenner Z, Roitman C, Kitajima EW. Demonstration that *Leptomonas pessoai* Galvão, Oliveira, Carvalho; Veiga, 1970 is a *Herpetomonas*. *J Protozool*. 1976;23:291-3.
- Ronet C, Beverley SM, Fasel N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion. *Virulence*. 2011;2(6):547-52.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003
- Ross R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. *Br Med J*. 1903 Nov 14;2(2237):1261-2.
- Sá-Carvalho D, Perez-Morga D, Traub-Cseko YM. Characterization of kinetoplastid DNA from *Phytomonas serpens*. *J Eukaryot Microbiol*. 1993;40:317-22.
- Santos AL, Souto-Padron T, Alviano CS, Lopes AH, Soares RM, Meyer-Fernandes JR. Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*. *Arch Biochem Biophys*. 2002;405:191-8.
- Sbravate C, Campaner M, Camargo, LEA, Conchon I, Teixeira MMG, Camargo EP. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous hemiptera in Brazil. *J Protozool*. 1989;36:543-7.
- Scheffter SM, Ro YT, Chung IK, Patterson JL. The complete sequence of Leishmania RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology*. 1995;212:84-90.
- Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, Eisenberger CL, Schnur LF, Presber W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;106:239-48.
- Serrano MG, Campaner M, Buck GA, Teixeira MMG, Camargo, EP. PCR amplification of the spliced leader gene for the diagnosis of trypanosomatid parasites of plants and insects in methanol-fixed smears. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999; 76: 241-246.
- Simpson AG, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Mol Phylogenet Evol*. 2004;30(1):201-12.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006;22:168-74.

Simpson L, Aphasizhev R, Gao G, Kang X. Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA*. 2004;10(2):159-70.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987;41:363-82.

Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:1383-7.

Souto RP, Fernandes O, Mecedo AM, Campbell D, Zingales B. DNA marker define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996;83:141-52.

Souza MA, Côrte-Real, S. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973: proposal of a new genus. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 199;133(8).

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

Stevens J, Wall R. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae). *Proc Biol Sci*. 1996;263:1335-41.

Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;15(3):226-32.

Stevens JR, Wallman JF. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. *Trends Parasitol.* 2006a; 22(3):129-36.

Stevens JR, Wallman JF, Otranto D, Wall R, Pape T. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part II): biological and life-history studies. 2006b *Trends Parasitol.* 22:181–188.

Stevens JR. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int J Parasitol.* 2003;33(10):1105-13.

Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol.* 2001;48:1-56.

Stevens JR, Teixeira MMG, Bingle LEH, Gibson WC. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *Inter. J Parasitol.* 1999a;29:749-57.

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 1999b118:107-16.

Sugisaki H, Ray DS. DNA sequence of *Crithidia fasciculata* kinetoplast minicircles. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;23:253-63.

Svobodová M, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukeš J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007;57(2):423-32.

Swofford DL PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland MA. 2002.

Takata CSA, Conchon I, Teixeira MMG e Camargo EP. New species of *Herpetomonas* defined by rDNA fingerprinting and RAPD. Reunião Anual da SBP. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91: 92.

Tarr PI, Aline RF, Smiley BL, Keithly J, Stuart K. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85: 9572-5.

Teixeira MMG, Campaner M, Camargo EP. Detection of trypanosomatid *Phytomonas* parasitic in plants by polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA. Parasitol Res. 1994;80: 512-6.

Teixeira MMG, Yamaguchi L, Takata CSA, Campaner M, Serrano MG, Camargo EP. Molecular and biological characteristics disclosed subgroups within the genus *Crithidia*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995;90: 279.

Teixeira MMG, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: A spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. Exp Parasitol. 1996;84: 311-9.

Teixeira MMG, Takata CSA, Conchon I. Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new *Trypanosomatids* isolated from flies. J Parasitol. 1997;83: 58-65.

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

Tuan RS, Chang KP. Isolation of intracellular symbiotes by immune lysis of flagellate protozoa and characterization of their DNA. J Cell Biol. 1975;65: 309-23.

Týč J, Votýpka J, Klepetková H, Suláková H, Jirků M, Lukeš J. Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): Frequent cosmopolitism and moderate host specificity. Mol Phylogenet Evol. 2013;69: 255-64.

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 1999;72 (2): 203-12.

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

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

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

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

- Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. from *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. J Eukaryot Microbiol. 2009a;56: 594-602.
- Viola LB, Campaner M, Takata CS, Ferreira RC, Rodrigues AC, Freitas RA, Duarte MR, Grego KF, Barrett TV, Camargo EP, Teixeira MMG. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. Parasitology. 2008;135: 595-605.
- Votýpka J, Klepetková H, Yurchenko VY, Horák A, Lukeš J, Maslov DA. Cosmopolitan distribution of a trypanosomatid *Leptomonas pyrrocoris*. Protist. 2012a;163:616-31.
- Votýpka J, Klepetková H, Jirků M, Kment P, Lukeš J. Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa. Int J Parasitol. 2012b;42:489-500.
- Votýpka J, Maslov DA, Yurchenko V, Jirků M, Kment P, Lun ZR, Lukeš J. Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect hosts in South-West China reveals both endemism and global dispersal. Mol Phylogenet Evol. 2010;54:243-53.
- Votýpka J, Obornik M, Volf P, Svobodová M, Lukeš J. *Avium ofraptors* (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. Parasitology 2002;125:253-63.
- Wallace FG, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. J Protozool. 1983;30:308-13.
- Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol. 1966;18:124-93.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledon R, Campbell DA, Maslov DA. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. Parasitology. 2004;129:537-47.
- Widmer G, Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL. Characterization of aRNA virus from the parasite Leishmania. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;Aug 86(15):5979-82.
- Widmer G, Dooley S. Phylogenetic analysis of *Leishmania* RNA virus and *Leishmania* suggests ancient virus-parasite association. Nucleic Acids Res. 1995;23:2300-4.
- Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim JW, Lambkin C, Bertone MA, Cassel BK, Bayless KM, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Pape T, Sinclair BJ, Skevington JH, Blagoderov V, Caravas J, Kutty SN, Schmidt-Ott U, Kampmeier GE, Thompson FC, Grimaldi DA, Beckenbach AT, Courtney GW, Friedrich M, Meier R, Yeates DK. Episodic radiations in the fly tree of life. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:5690-5.
- Wiegmann BM, Yeates DK, Thorne JL, Kishino H. Time flies, a new molecular time-scale for brachyceran fly evolution without a clock. Syst Biol. 2003;52:745-56.
- Wilfert L, Longdon B, Ferreira AG, Bayer F, Jiggins FM. Trypanosomatids are common and diverse parasites of Drosophila. Parasitology. 2011;18:1-8.

Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 1994;51:771-77.

Yeates DK, Wiegmann BM. Congruence and controversy: toward a higher-level phylogeny of Diptera. *Ann R Entomology.* 1999, 44:397-428.

Yoshida N, Freymuller E, Wallace, FG. *Herpetomonas mariadeanei* sp. N (Protozoa, Trypanosomatidae) from *Muscina stabulans* (Fallen, 1816) (Diptera, Muscidae). *J Protozool.* 1978;25:421-425.

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

Yurchenko VY, Lukeš J, Tesarová M, Jirků M, Maslov DA. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus crithidia. *Protist.* 2008;159:99-114.

Yurchenko V, Lukeš J, Xu X, Maslov DA. An integrated morphological and molecular approach to a new species description in the Trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae). *J Eukaryot Microbiol.* 2006a;53(2):103-11.

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

Yurchenko VY, Kolesnikov AA. Minicircular kinetoplast DNA of Trypanosomatidae *Mol Biology.* 2001;35: 3-13.

Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1656-7.

Zamora M, Guilbride L, Sacks L, Stuart K. Phylogenetic analysis of the 5' subterminal region of isolates of *Leishmania* RNA virus-1. *Ann Trop Med Parasitol.* 2000;94:123-33.

Zídková L, Cepicka I, Votýpka J, Svobodová M. *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2236-46.

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