**Omar Ariel Espinosa Domínguez**

# DIVERSIDADE, TAXONOMIA E FILOGENIA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DA SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE

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

São Paulo
2015

**Omar Ariel Espinosa Domínguez**

# DIVERSIDADE, TAXONOMIA E FILOGENIA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS DA SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Domínguez, Omar Ariel Espinosa.
Diversidade, Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos da subfamília Leishmaniinae / Omar Ariel Espinosa Domínguez. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Taxonomia e Filogenia de tripanossomatídeos.

Versão do título para o inglês: Diversity, Taxonomy and Phylogeny of Trypanosomatids of Leishmaniinae subfamily.

1. Leishmaniinae 2. Leishmania 3. Endotrypanum 4. Crithidia 5. Leptomonas 6. Filogenia I. Teixeira, Profa. Dra. Marta Maria Geraldes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB075/2015

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidato(a): Omar Ariel Espinosa Domínguez

Titulo da Tese: Diversidade, Taxonomia e Filogenia deTripanossomatídeos da Subfamília Leishmaniinae.

Orientador(a): Professora Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira

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

**( ) Aprovado(a)** **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição:.....

Presidente Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição:.....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

*Comissão de Ética em Pesquisa*

# CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **589/13** referente ao projeto intitulado: "*Diversidade e taxonomia de tripanossomatídeos de insetos dos gêneros Crithidia, Leptomonas e Wallaceina e relações filogenéticas com Leishmania e Endotrypanum*" sob a responsabilidade de **Omar Ariel Espinosa Domínguez,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 26 de abril de 2013.

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

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

À minha Família que sempre acreditou em mim, embora distante, sempre souberam me fazer sentir em casa, e a todos os que me apoiaram de forma incondicional...

Obrigado por estar sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Marta Maria Geraldes Teixeira, pela oportunidade oferecida para me desenvolver acadêmica e profissionalmente no seu laboratório e pela orientação durante a condução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Erney Plessmann de Camargo, pela dedicação e principalmente pela colaboração na conclusão deste trabalho.

Ao Professor Dr. Jeffrey J. Shaw, pelo estímulo e colaboração oferecidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Silvia Alfieri, pela grande ajuda na revisão deste trabalho e pelo estímulo constante durante estes anos.

Ao Professor Dr. João Marcelo Alves pela paciência e ajuda oferecida.

Ao Dr. Robson Ferreira pelos ensinamentos e pelo apoio incondicional na minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade.

Ao Professor Dr. Cristiano Feldens Schwertner, da Universidade Federal de São Paulo, pela importante colaboração na identificação dos hemípteros.

À Marta Campaner e Carmen Takata, pelo apoio técnico e pelos ensinamentos do laboratório oferecidos.

À Tânia Matsumoto, além de sua ajuda, pela amizade oferecida.

Aos Colegas do laboratório Ana, Adriana, Andernice, André, Bruno, Carla, Charlotte, Flávia, Herakles, Jennifer, Juliana, Laerte, Luciana, Lyslaine, Oneida, Paola, Robson, Tarcilla e Zuleima, pela amizade e companheirismo.

À Luciana, Carmen e Paola pela importante colaboração e horas dedicadas, com muita paciência e otimismo, na finalização deste trabalho.

À minha Guriazinha, motivo das minhas... Alegrias.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e todos os amigos do Departamento de Parasitologia com quem compartilhei horas de alegria e de futebol.

À minha família, especialmente a minha mãe Dalys, que com muito apoio e amor incondicional, estiveram no meu lado sempre. Sem vocês não seria possível.

*La vida no es la que uno vivió, sino la que uno recuerda y cómo la recuerda para contarla.*

Gabriel García Márquez

Este trabalho contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Secretaría Nacional de Ciencias y Tecnología (SENACYT)-Panamá.

# RESUMO

Domínguez OAE. Diversidade, Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos da Subfamília Leishmaniinae. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Os parasitas da subfamília Leishmaniinae são tripanossomatídeos exclusivos de insetos, classificados como *Crithidia* e *Leptomonas*, ou de vertebrados e insetos, dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum*. Análises filogenéticas posicionaram espécies de *Crithidia* e *Leptomonas* em vários clados, corroborando sua polifilia. Além disso, o gênero *Endotrypanum* (tripanossomatídeos de preguiças e flebotomíneos) tem sido questionado devido às suas relações com algumas espécies neotropicais "enigmáticas" de leishmânias (a maioria de animais selvagens). Portanto, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Endotrypanum* precisam ser revisados taxonomicamente. Com o objetivo de melhor compreender as relações filogenéticas dos táxons dentro de Leishmaniinae, os principais objetivos deste estudo foram: a) caracterizar um grande número de isolados de Leishmaniinae e b) avaliar a adequação de diferentes marcadores moleculares para a avaliação de relações entre espécies separadas por pequenas distâncias genéticas. Com estes propósitos, uma grande amostragem de tripanossomatídeos de insetos (Hemíptera e Díptera) e vertebrados silvestres da América Central (AC), América do Sul (AS) e da África (AF) foram analisados por V7V8 SSUrRNA Barcoding. Todas as amostras atribuídas a Leishmaniinae foram incluídas nas análises filogenéticas baseadas em SSUrRNA, gGAPDH, CATB, HSP70 e ITS1rDNA que, por sua vez, foram comparadas com outras sequências disponíveis em bancos de sequências. Filogenias baseadas na SSUrRNA revelaram vários grupos, apesar de seu elevado grau de conservação inter- e intra-grupo. Em contraste, as análises dos genes gGAPDH e CATB permitiram posicionar espécies de Leishmaniinae em clados bem suportados. Dois grandes clados foram evidenciados em todas as análises: 1- Um clado composto exclusivamente por tripanossomatídeos de insetos distribuídos em sete subclados, cada um correspondendo a um gênero, incluindo *Crithidia*, *Leptomonas, Legeria* (gênero novo proposto neste trabalho) e quatro gêneros adicionais ainda não nomeados. As espécies desses gêneros foram encontradas em uma diversidade de insetos: *Crithidia* contém parasitas de moscas, mosquitos e hemípteros da AS e AN (América do Norte); *Legeria*, isolados de moscas e hemípteros da AF, AC e AS; e *Leptomonas,* apenas isolados de hemípteros da AF, AC e AS. O novo gênero *Legeria* foi o mais próximo do segundo maior clado. 2- O segundo grande clado abrigou *Leishmania*/*Endotrypanum* e o grupo basal costarricensis, de parasitas equatoriais de hemípteros predadores e flebotomíneos, apoiando assim a origem das leishmânias a partir de um tripanossomatídeo de insetos neotropicais. Isolados de diversos lagartos, incluindo novas espécies da AF (Moçambique), foram posicionados no subgênero *L*. (*Sauroleishmania*), que se posicionou mais perto do subgênero *L*. (*Leishmania*) do que de *L. (Viannia),* apoiando a hipótese de que leishmânias de lagartos divergiram no velho mundo. Os três subgêneros foram separados de outro clado formado por isolados de flebotomíneos neotropicais, preguiças e seres humanos classificados como *Endotrypanum* e *Leishmania*, com *L. deanei/L. hertigi* de porcos-espinhos como espécies basais. A análise global realizada neste estudo, considerando o número e a diversidade dos isolados e o conjunto de marcadores moleculares avaliados, revelou vários grupos fortemente

apoiados que representam gêneros, bem como diversas novas espécies e sinonímias. Portanto, este estudo fornece as bases fundamentais necessárias para uma ampla revisão taxonômica de Leishmaniinae.

**Palavras – Chaves**: Leishmaniinae. *Leishmania*. *Endotrypanum. Crithidia. Leptomonas*. Filogenia. SSUrRNA. gGAPDH. ITSrDNA.

**ABSTRACT**

Domínguez OAE. Diversity, Taxonomy and Phylogeny of Trypanosomatids of Leishmaniinae Subfamily. [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The Leishmaniinae subfamily trypanosomatids include parasites exclusively found in insects, and classified as *Crithidia* and *Leptomonas,* and species evolving in vertebrate and insects of genera *Endotrypanum* and *Leishmania*. Phylogenetic analysis positioned *Crithidia* and *Leptomonas* species in several clades corroborating their polyphyly. In addition, the genus *Endotrypanum* of trypanosomatids from sloths and sand flies has been questioned due to its relationships with some "enigmatic", Neotropical species of *Leishmania* (mostly of wildlife). Therefore, *Crithidia, Leptomonas* and *Endotrypanum* need to be revised taxonomically. Aiming to understand the phylogenetic relationships of taxons within Leishmaniinae the main goals of this study were: a) to characterize a large number of Leishmaniinae isolates; b) to evaluate the suitability of different molecular markers to assess the relationships among species separated by small genetic distances. With these purposes, large sampling of trypanosomatids from insects (Hemiptera and Diptera) and wild vertebrates from Central America (CA), South America (SA) and Africa (AF) was analyzed by V7V8 SSUrRNA barcoding. All samples assigned to Leishmaniinae were selected for phylogenetic inferences based on SSUrRNA, gGAPDH, CATB, HSP70 and ITS1rDNA, including other sequences available in databanks. Phylogeny of SSUrRNA revealed several groups despite high degrees of sequence conservation inter- and intra-group. In contrast, gGAPDH and CATB gene analyses allowed the positioning of Leishmaniinae species in well-supported clades, with two major clades being evidenced in all analyses: 1) one clade comprised exclusively trypanosomatids of insects distributed in 7 subclades, each corresponding to one genus, including *Crithidia, Leptomonas*, *Legeria* (proposed in this work), and four unnamed additional genera. The species within these genera were widespread in a range of insects: *Crithidia* harbored parasites of flies, mosquitoes and hemipterans from SA and NA (North America); *Legeria* isolates of flies and hemipterans from AF, CA and SA; and *Leptomonas* only isolates of hemipterans from AF, CA and SA. 2) The proposed new genus *Legeria* was closest to the second major clade. The latter harbored *Leishmania*/*Endotrypanum* and the basal Costarricensis group comprised by equatorial parasites from hemipteran predators and sand flies, thus supporting the origin of *Leishmani*a from a Neotropical insect trypanosomatid. Diverse isolates of lyzards, including new species from AF (Mozambique), were all nested into the subgenera *L.* (*Sauroleishmania*)*,* which was positioned with strong support closer to the subgenus *L. (Leishmania)* than to Viannia, then supporting that lizard leishmanias diverged in the Old World. The three subgenera were separated from another clade formed by Neotropical isolates of sandflies, sloths and humans classified as *Endotrypanum* and *Leishmania,* with *L. deanei/L.hertigi* of porcupines as basal species. The comprehensive analysis performed in this study regarding the number and diversity of isolates and the set of molecular markers evaluated revealed several strongly supported clades representing genera, and identified diverse new species

and synonymies as well. Therefore, this study provides the fundamentals required for a broad taxonomic revision of Leishmaniinae.

**Keywords**: Leishmaniinae. *Leishmania*. *Endotrypanum. Crithidia. Leptomonas*. Phylogeny. SSUrRNA. gGAPDH. ITSrDNA.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Formas celulares dos cinetoplastídeos encontradas nos diferentes estágios de desenvolvimento da família Trypanosomatidae 23

**Figura 2-** Filogenia da subfamília Leishmaniinae 33

**Figura 3-** Relação filogenética entre espécies de *Leishmania, Endotrypanum* e Paraleishmania 36

**Figura 4**- Representação esquemática do cistron ribossômico de precursores de rRNA em tripanossomatídeos 38

**Figura 5**- Representação esquemática dos genes que codificam as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 39

**Figura 6**- Representação esquemática do gene *SL* 41

**Figura 7**- Representação esquemática dos domínios da enzima Catepsina B-*like* 44

**Figura 8**- Representação esquemática da proteína de choque térmico de 70 kDa citoplasmática (HSP70) 46

**Figura 9**- DNA *Barcoding* de tripanossomatídeos da subfamília Leishmaniinae 62

**Figura 10-** Distribuição geográfica das espécies e isolados dos clados da sufamília Leishmaniinae descritos no dendograma V7V8 SSUrRNA. 64

**Figura 11**- Análises filogenéticas de sequências concatenadas da região V7V8 SSUrDNA e do gene gGAPDH dos isolados e espécies da subfamília Leishmaniinae 66

**Figura 12** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenéticas de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados e espécies do Clado Fasciculata 69

**Figura 13** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e isolados do Clado Fasciculata 70

**Figura 14** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenéticas de sequências concatenadas de gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados e espécies do Clado Termófilo 72

**Figura 15** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e isolados do Clado Termófilo proposto como gênero *Legeria* 73

**Figura 16** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenéticas de sequências concatenadas de gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados do Clado Leptomonas 75

**Figura 17** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e 76

isolados do Clado Leptomonas

**Figura 18** - Análises filogenéticas dos isolados e espécies dos Clados Acanthocephali, Rondônia e *C. inconstans* de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA 78

**Figura 19** - Distribuição geográfica e análises filogenéticas de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados do Clado Costarricensis 80

**Figura 20** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies do Clado Costarricensis 81

**Figura 21** - Análises filogenéticas de sequências concatenadas da região V7V8 SSUrDNA e dos genes gGAPDH e CATB dos isolados e espécies da subfamília Leishmaniinae 83

**Figura 22** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenéticas de sequências concatenadas gGAPDH e HSP70 dos isolados e espécies de *Endotrypanum* e leishmânias enigmáticas 87

**Figura 23** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenéticas de sequências concatenadas gGAPDH, HSP70 e CATB dos isolados e espécies *L.* (*Sauroleishmania*) 92

**Figura 24 –** Microscopia de luz de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae corados com Giemsa 94

**Figura 25 –** Microscopia de Luz de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae corados com Giemsa 96

**Figura 26 –** Microscopia de Luz dos subgrupos que compreendem o gênero *Legeria*: (a) T1: *Legeria termophila* 96

**Figura 27 -** Microscopia de luz do isolado TCC310 (Clado Rondônia) corado com Giemsa 97

**Figura 28** - Clado Leptomonas: Isolados observados por microscopia de luz corados com Giemsa 98

**Figura 29** –Microscopia de luz do Clado costarrisensis corados com Giemsa 100

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Lista de Isolados de tripanossomatídeos (TCC) da subfamília Leishmaniinae utilizados neste estudo. 50

**Tabela 2-** Meios de cultura utilizados neste estudo para o cultivo de tripanossomatídeos 53

**Tabela 3-** Soluções para obtenção de DNA dos tripanossomatídeos 55

**Tabela 4** - Ciclos de amplificação e temperaturas utilizadas nas diferentes reações de PCR 56

**Tabela 5** - Sequências obtidas do *GenBank*, da região V7V8 SSUrRNA e do gene gGAPDH de espécies de tripanossomatídeos 57

**Tabela 6** - Sequências obtidas do *GenBank*, da região V7V8 SSUrRNA, gGAPDH, HSP70, CATB e ITS1rDNA de espécies do gênero *Leishmania* 58

**Tabela 7** - Matriz de divergências das sequências da região V7V8 SSUrDNA entre os Clados definidos da subfamília Leishmaniinae 63

**Tabela 8** - Matriz de divergências das sequências do gene gGAPDH entre os clados definidos da subfamília Leishmaniinae 67

**Tabela 9** - Matriz de divergências das sequências do gene CATB entre os clados definidos da subfamília Leishmaniinae 67

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| AB | Análise Bayesiana |
| AM | Amazonas |
| AP | Apure |
| BAB | Meio agar sangue (“Blood Agar Base”) |
| BI | Biskra |
| BO | Boyacá |
| BSA | Albumina bovina sérica ("BovineSerumAlbumin") |
| ºC | Grau Celsius |
| CATB | Catepsina B-*Like* |
| CATL | Catepsina L-*Like* |
| CP | Cisteíno Protease |
| *cpa* | Isoforma de Catepsina L-*Like* |
| *cpb* | Isoforma de Catepsina L-*Like* |
| *CPC* | Isoforma de Catepsina B-*Like* |
| cGAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenasecitosólico |
| CHCl3 | Clorofórmio |
| CO | Colômbia |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DNTP | Desoxirribonucleotídeo fosfatado |
| EDTA | Ácido etileno diaminotetracético |
| ETS | Espaçadores externos do gene Ribossômico |
| EUA | Estados Unidos de América |
| FL | Florida |
| *GenBank* | Banco de dados de Nucleotídeos do NLM/NCBI |
| GF | Guiana Francesa |
| GO | Goiás |
| HIV | Vírus de Imunodeficiência Humana |
| HE | Heredia |
| gGAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenaseglicossomal |
| $H_2O$ | Água |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HI 5 | Célula isolada de *Trichophlusia ni* |
| HSP70 | Proteína de Choque Térmico 70 kDa |
| ICB USP | Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo |
| IGS | Espaçãdores Intergênico do gene Ribossômico |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| KA | Kalingrad |
| KCl | Cloreto de Potássio |
| kDa | Kilo Daltons |
| LA | Lara |

| | |
|---|---|
| LIT | Liver Infusion Tryptose |
| LSU | Sub Unidade Maior do gene Ribossômico |
| M | Molar |
| ME | Merid |
| mg | Miligrama |
| MG | Minas Gerais |
| MgCl | Cloreto de Magnésio |
| MI | Minessota |
| min | Minutos |
| ml | Mililitro |
| ML | Máxima Verossimilhança |
| MLEE | Multilocusenzymeelectrophoresis |
| mM | Milimolar |
| MO | Moramango |
| MP | Máxima Parcimônia |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MS | Mato Grosso do Sul |
| MZ | Moçambique |
| $N_2$ | Nitrogênio líquido |
| $Na_2HPO_4$ | Fosfato dissódico |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| ng | Nanograma |
| NY | Nov Iorque |
| PA | Pará |
| PAUP | Phylogenetic Analysis Using Parsimony* |
| PBS | Salina em tampão fosfato |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial de Hidrogênio |
| PN | Panamá |
| PR | Paraná |
| rDNA | Ácido desoxiribonucleico ribossômico |
| Rep | República |
| RJ | Rio de Janeiro |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| rRNA | Ácido ribonucleico ribossômico |
| RNAse | Ribonuclease |
| RO | Rondônia |
| rpm | Rotações por minuto |
| Sarkosil | Laurilsarcosinato de sódio |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SE | Solução salina Tris-EDTA |
| *SE* | *Slowly Evolving* |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SL | Spliced Leader |

| | |
|---|---|
| SO | Sofala |
| SOC | Super optimal broth with catabolite repression |
| SP | São Paulo |
| SSUrRNA | Subunidade menor do gene do DNA ribossômico |
| TAE | Tampão Tris acetato-EDTA |
| TCC | TrypanosomatidCultureColection |
| TE | Tampão tris-EDTA |
| TGF-□ | Fator de Necrosis Tumoral beta |
| Th1 | Resposta imune celular tipo 1 |
| Th2 | Resposta imune celular tipo 2 |
| TM | Tolima |
| TO | Tocantins |
| U1-U8 | Regiões universalmente conservadas do gene SSUrRNA |
| UNIFESP | Universidade Federal de São Paulo |
| UV | Radiação ultravioleta |
| µL | Microlitro |
| µg | Micrograma |
| V1-V9 | Regiões variáveis do gene SSUrRNA |
| ZU | Zulia |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** 22

**1.1 Taxonomia da família Trypanosomatidae** 22

**1.2 Origem e evolução da família Trypanosomatidae** 23

**1.3 Tripanossomatídeos de insetos** 24

**1.4 Subfamília Leishmaniinae** 26

1.4.1 Gêneros da subfamília Leishmaniinae 26

*1.4.1.1 Gênero Leishmania* 27

*1.4.1.2 Gênero Endotrypanum* 27

*1.4.1.3 Gênero Crithidia* 28

*1.4.1.4 Gênero Lotmaria* 29

*1.4.1.5 Gênero Leptomonas* 29

*1.4.1.6 Gênero Wallaceina* 30

1.4.2 Filogenia da subfamília Leishmaniinae 30

*1.4.2.1 Clado formado por tripanossomatídeos monoxênicos de insetos* 31

*1.4.2.2 Clado formado por tripanossomatídeos monoxênicos e heteroxênicos* 31

*1.4.2.2.1 Clado Leishmania-Endotrypanum e as leishmanias enigmáticas* 32

**1.5 Genes tradicionalmente utilizados em análises filogenéticas de tripanossomatídeos** 37

1.5.1 O gene ribossômico 37

1.5.2 O gene gGAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica) 38

1.5.3 Gene *SL* (*Spliced Leader* ou Mini-exon) 40

**1.6 Novos marcadores utilizados em análises filogenéticas de tripanossomatídeos** 41

1.6.1 Cisteíno Proteases 41

*1.6.1.1 Catepsinas-Like estudadas no gênero Trypanosoma* 42

*1.6.1.2 Catepsinas estudadas no gênero Leishmania* 43

*1.6.1.2.1 Catepsinas L-Like* 43

*1.6.1.2.2 Catepsina B-like* 43

1.6.2 HSP70 45

**2 JUSTIFICATIVA** 47

**3 OBJETIVOS** 49

**3.1 Objetivo Geral** 49

**3.2 Objetivos Específicos** 49

**4 MATERIAIS E MÉTODOS** 50

**4.1 Organismos** 50

**4.2 Cultivo de Parasitas** 53

**4.3 Microscopia óptica y Microscopia eletrônica de varredura** 53

**4.4 Extração de DNA genômico a partir de parasitas em cultura** 54

**4.5 Reações de PCR (V7V8 SSUrRNA, gGAPDH, ITS rDNA, HS70 e CatB-*Like*)** 54

**4.6 Clonagem de fragmentos de DNA amplificados por PCR** 55

**4.7 Sequenciamento de DNA** 56

**4.8 Alinhamento das sequências** 57

**4.9 Análises filogenéticas** 58

**5 RESULTADOS E DISCUSSÕES** 59

**5.1 Diversidade, filogenia, taxonomia e origem de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae** 59

5.1.1 DNA *barcoding* de espécies/isolados monoxênicos da subfamília Leishmaniinae 59

*5.1.1.1 Clado Fasiciculata* 60

*5.1.1.2 Clado Termófilo* 60

*5.1.1.3 Clado Leptomonas* 60

*5.1.1.4 Clado Acanthocephali* 60

*5.1.1.5 Clado Inconstans* 60

*5.1.1.6 Clado Rondônia* 60

*5.1.1.7 Clado Mellificae* 61

*5.1.1.8 Clado Costarricensis* 61

5.1.2 Relações filogenéticas entre os grupos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae 65

5.1.3 Diversidade genética, geográfica e de hospedeiros dos tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae 68

*5.1.3.1 Clado Fasciculata* 68

*5.1.3.2 Clado Termófilo* 71

*5.1.3.3 Clado Leptomonas* 74

*5.1.3.4 Clado Acanthocephali, Inconstans e Rondônia* 77

*5.1.3.5 Clado Costarricensis* 79

5.1.4 Análises filogenéticas baseadas em dados multigênicos 81

**5.2 Diversidade de isolados classificados no gênero *Endotrypanum* e relações filogenéticas com espécies de leishmânias "enigmáticas"** 84

5.2.1 Barcoding dos isolados de *Endotrypanum* e leishmânias enigmáticas relacionadas do grupo Paraleishmania 84

5.2.2 Relações filogenéticas entre isolados de *Endotrypanum* e leishmânias enigmáticas Paraleishmania 85

5.2.3 Complexo *Leishmania enriettii* 88

**5.3 O subgênero *L.* (*Sauroleishmania*) e relações filogenéticas com espécies de *L.* (*Leishmania*) e *L.* (*Viannia*)** 89

5.3.1 Caracterização de novos isolados de leishmânias de lagarto 89

**5.4 Caracterização morfológica de novos gêneros propostos.** 93

5.4.1 Gênero *Crithidia*: espécie-tipo *C. fasciculata* 94

5.4.2 Gênero *Legeria*: espécie-tipo *Legeria thermophila* 95

5.4.3 Gênero *Cecilmonas*: espécie tipo *C. acanthocephali* 95

5.4.4 Clado Rondonia: novo gênero 96

5.4.5 Gênero *Leptomonas*: espécie tipo: *L. seymouri* 97

5.4.6 Clado Costarricenses: novo gênero 99

**6 CONCLUSÕES** 101

**REFERÊNCIAS** 105

**ANEXOS** 118

**A** - Towards a taxonomic revision of insect trypanosomatids included in the genera *Crithidia* and *Leptomonas* of the subfamily Leishmaniinae: delimiting genera and species boundaries by taxon-rich phylogenetic analysis of five locus

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Taxonomia da família Trypanosomatidae

Os cinetoplastídeos são organismos classificados dentro do filo Euglenozoa, classe Kinetoplastida. Esse grupo caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da sua única mitocôndria, localizada na base flagelar, e que contém o DNA mitocondrial. A classe Kinetoplastida possui duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina. A subclasse Prokinetoplastina está representada apenas por espécies da ordem Prokinetoplastida, enquanto que a Metakinetoplastina é dividida em quatro ordens: Eubodonida, Parabodonida, Neobodonida e Trypanosomatida (Lukes et al., 2014; Moreira et al., 2004; Stevens, 2008, 2014; Vickerman, 1976). Com a exceção dos organismos monoflagelados da ordem Trypanosomatida, os Metakinetoplastina são biflagelados, parasitas ou de vida livre e comumente conhecidos como bodonídeos.

A família Trypanosomatidae, classificada dentro da ordem Trypanosomatida, compreende protozoários flagelados que apresentam grande diversidade de hospedeiros, infectando plantas, animais vertebrados e invertebrados de praticamente todas as ordens e com descrições em todos os continentes (Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1994). A maioria dos representantes da família Trypanosomatidae não é patogênica para seus hospedeiros, embora algumas espécies sejam importantes agentes patológicos de doenças humanas e de animais domésticos, como as tripanossomíases e as leishmanioses (Hamilton et al., 2007; Lukes et al., 2014; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001; Vickerman, 1976).

Tradicionalmente, a taxonomia da família Trypanosomatidae tem sido baseada em parâmetros morfológicos, ciclos de vida e hospedeiros de origem. A família alberga parasitas que, de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento em seus hospedeiros, distribuem-se em dezesseis gêneros: doze gêneros compreendem espécies monoxênicas de insetos *(Angomonas, Blastocrithidia, Blechomonas, Crithidia, Herpetomonas, Kentomonas, Leptomonas, Lotmaria, Paratrypanosoma, Sergeia, Strigomonas* e *Wallacemonas)* e quatro gêneros albergam espécies heteroxênicas cujos ciclos de vida ocorrem em alternância entre hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos) e

vertebrados (*Trypanosoma, Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre invertebrados (insetos fitófagos) e plantas (*Phytomonas*) (Borghesan et al., 2013; Camargo, 1999; Flegontov et al., 2013; Kostygov et al., 2014; Merzlyak et al., 2001; Schwarz et al., 2015; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Vickerman, 1976; Votýpka et al., 2013, 2014; Wallace, 1966; 1979; 1983).

Morfologicamente, os tripanossomatideos exibem acentuadas diferenças quanto à forma, comprimento do corpo, espessura, comprimento do flagelo, tamanho e posição do núcleo e do cinetoplasto, etc. A localização do cinetoplasto em relação ao núcleo e**,** a presença ou não de membrana ondulante e flagelo livre, são as características determinantes das diferentes formas apresentadas por estes flagelados durante seus ciclos de vida (Figura 1): tripomastigota, promastigota, amastigota, opistomastigota, epimastigota e coanomastigota (Wallace et al., 1983; Wallace, 1966)

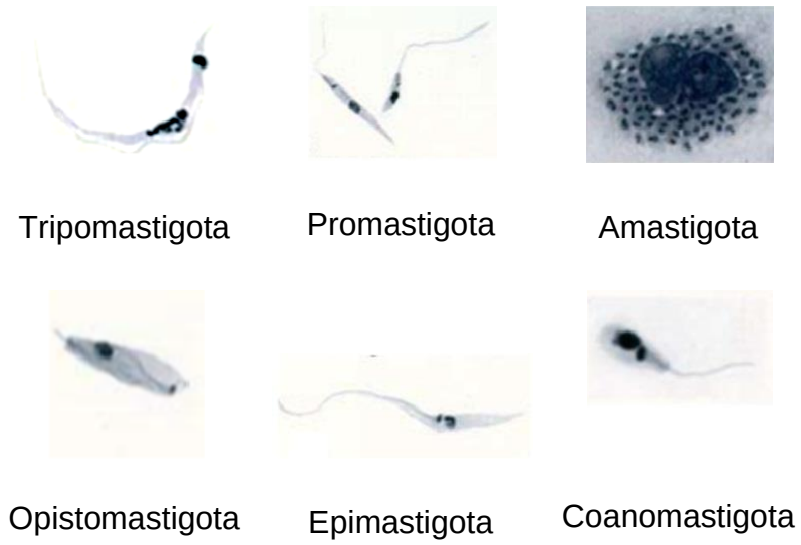



**Figura 1 -** Formas celulares dos cinetoplastídeos encontradas nos diferentes estágios de desenvolvimento da família Trypanosomatidae (modificada: De Souza, 2002).

## 1.2 Origem e evolução da família Trypanosomatidae

Hipóteses fundamentadas em reconstruções filogenéticas tentam explicar a origem dos tripanossomatídeos e dos ciclos heteroxênicos de *Trypanosoma, Leishmania, Endotrypanum* e *Phytomonas.* Os estudos propõem diferentes histórias evolutivas, dependendo dos táxons e grupos externos analisados, bem como dos genes e dos métodos de inferências filogenéticas utilizados (Deschamp et al., 2011;

Moreira et al., 2004). A hipótese sugerida por esses estudos é a de um bodonídeo aquático de vida livre ter sido ingerido por insetos e se adaptado ao *habitat* intestinal, originando, assim, os tripanossomatídeos monoxênicos de insetos. Com o surgimento da hematofagia nos insetos, esses parasitas podem ter sido inoculados em vertebrados, adaptando-se, assim, ao parasitismo no sangue e passando a circular entre insetos hematófagos e vertebrados. Insetos hematófagos existentes há milhões de anos (Cretáceo-Jurássico), como os ceratopogonídeos e os flebotomíneos, podem ter participado desse processo (Hamilton et al., 2004, 2007; Poinar, 2004, 2008; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001).

Estudos filogenéticos recentes sugerem que as espécies heteroxênicas originaram-se das monoxênicas e que estas últimas são mais relacionadas com os cinetoplastídeos de vida livre (Flegontov et al., 2013; Yurchenko et al., 2006b). O recente posicionamento em análises filogenéticas do novo gênero *Paratrypanosoma*, que contém uma única espécie (*Paratrypanosoma confusum*), na base da irradiação do clado que compreende as espécies da família Trypanosomatidae, apoia essa hipótese (Flegontov et al., 2013; Votýpka et al., 2014). Esses mesmos estudos igualmente apoiaram a monofilia dos gêneros *Trypanosoma, Phytomonas*, *Leishmania* e *Herpetomonas,* e dos gêneros *Kentomonas*, *Strigomonas, Angomonas*, *Blechomonas* e *Wallacemonas* (mais recentemente criados), bem como a polifilia dos gêneros *Crithidia, Blastocrithidia* e *Leptomonas* (Borghesan et al., 2013; Fraga et al., 2010; Hamilton et al., 2004, 2007; Kostygov et al., 2014; Leonard et al., 2011; Merzlyak et al., 2001, Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2012a, b, 2013, 2014; Yurchenko et al., 2006a, b, 2008, 2009).

Com base em análises filogenéticas, atualmente é aceito que o primeiro ramo a divergir dentro da família Trypanosomatidae corresponde ao gênero *Paratrypanosoma.* Posteriormente, dois clados irmãos são segregados, um deles contendo as espécies do gênero *Trypanosoma* e o outro as espécies de tripanossomatídeos de insetos e *Leishmania/Endotrypanum* (Flegontov et al., 2013; Kostygov et al., 2014; Votýpka et al., 2014; Yurchenko et al., 2014).

### 1.3 Tripanossomatídeos de insetos

A primeira metade do século vinte foi marcada por um grande número de publicações descrevendo novas espécies de tripanossomatídeos de insetos. Nessa

época e durante as décadas seguintes, o principal método de pesquisa parasitológica era a microscopia de luz. Com a criação do sistema de classificação desenvolvido por Hoare e Wallace, foram redefinidos vários gêneros com base em marcadores morfológicos, hospedeiros de origem e ciclos de vida. Desse modo, as novas espécies encontradas nos anos seguintes foram classificadas com base nesse sistema (Hoare, Wallace, 1966; Maslov et al., 2013; Wallace, 1966).

Estudos filogenéticos baseados em marcadores moleculares demonstraram que, para os tripanossomatídeos, a classificação genérica baseada em marcadores tradicionais muitas vezes resulta em agrupamentos polifiléticos que têm sido objeto de revisões taxonômicas. A taxonomia e a filogenia dos tripanossomatídeos de insetos continuam objeto de discussões, sendo que nos últimos anos intensificaram-se os estudos nesses temas. Novos táxons e grupos relacionados tanto aos gêneros novos quanto aos tradicionais têm sido descritos (Borghesan et al., 2013; Kostygov et al., 2014; Schwarz, 2015; Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014; Yurchenko et al., 2006a, b, 2014).

O relacionamento filogenético entre os gêneros e grupos que albergam a grande diversidade dos tripanossomatídeos de insetos varia, dependendo dos marcadores moleculares utilizados e dos táxons incluídos, embora, nessas análises, os gêneros *Blastocrithidia* e *Blechomonas* apareçam, recorrentemente, como os clados mais basais. Por outro lado, observa-se de forma consistente o relacionamento entre os gêneros de tripanossomatídeos com endossimbionte (*Angomonas*, *Strigomonas* e, recentemente, *Kentomonas*), todos reclassificados taxonomicamente dentro da nova subfamília Strigomonadinae (Votýpka et al., 2014). Os gêneros *Phytomonas* e *Herpetomonas* apresentam-se como grupos irmãos de forma estável nos vários estudos já realizados, embora as espécies representativas possuam ciclos de vidas diferentes. O gênero *Blastocrithidia,* em várias análises, posiciona-se como clado irmão de um grupo chamado de *Leptomonas jaculum* (única espécie descrita). Os gêneros *Crithidia, Leishmania, Endotrypanum* e a maioria das espécies classificadas como *Leptomonas* formam um grupo apical na irradiação do clado que contém os tripanossomatídeos de insetos e são classificados na subfamília Leishmaniinae (Borghesan et al., 2013; Jirku et al., 2012; Teixeira t al., 2011; Votýpka et al., 2012a, 2014).

## 1.4 Subfamília Leishmaniinae

Antes de ser classificado taxonomicamente como subfamília, este grupo de tripanossomatídeos foi denominado como clado *Slowly Evolving* (*SE*) devido às taxas relativamente baixas de divergências nas sequências da subunidade menor do gene ribossômico (SSUrRNA) (Merzlyak et al., 2001). Este clado se mostra consistente, com altos valores de suporte nas análises filogenéticas realizadas com sequências ribossômicas ou do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica (gGAPDH). Em diversas análises utilizando diferentes táxons, o clado *SE* mostra-se como um táxon monofilético dentro da família Trypanosomatidae. Por este motivo e considerando que a classificação do clado *SE* encontrava-se hierarquicamente abaixo de família e acima de gênero, o grupo foi denominado de Subfamília Leishmaniinae (Jirkú et al., 2012; Maslov et al., 2010; Merzlyak et al., 2001; Yurchenko et al., 2006b).

Dentre os táxons que compreendem a subfamília Leishmaniinae, apenas as espécies que formam o gênero *Leishmania* podem ser consideradas como táxons naturais (Jirkú et al., 2012). Em diversos estudos utilizando os genes SSUrRNA e gGAPDH, as espécies classificadas nos gêneros *Crithidia* e *Leptomonas* tem se posicionado em diversos clados polifiléticos que contêm espécies de ambos os gêneros ou linhagens individuais de uma espécie só, como, por exemplo, *Leptomonas barvae,* que não agrupa com nenhuma outra espécie do gênero *Leptomonas* (Kostygov et al., 2014; Maslov et al., 2010; Votýpka et al., 2012a, 2014; Yurchenko et al., 2006a, b, 2008). A classificação do gênero *Endotrypanum* tem sido questionada em diversos trabalhos que demonstram o relacionamento deste gênero com espécies de *Leishmania* chamadas “enigmáticas”. As espécies que compreendem esses três gêneros foram classificadas com base em padrões morfológicos e necessitam de revisões taxonômicas para melhor compreender e explicar sua origem e evolução (Cupolillo et al., 2000; Maslov et al., 2010; Schwarz et al., 2015; Yurchenko et al., 2006a, b, 2009, 2014).

### 1.4.1 Gêneros da subfamília Leishmaniinae

A subfamília Leishmaniinae é composta por espécies monoxênicas dos gêneros *Crithidia, Leptomonas* e *Wallaceina* e dos gêneros heteroxênicos

*Endotrypanum* e *Leishmania*. Recentemente, as espécies de *Wallaceina* foram reclassificadas como *Crithidia* e um novo gênero *(Lotmaria)* foi proposto para acomodar uma nova espécie de tripanossomatídeo, isolada de abelha, que não apresenta afinidade filogenética com nenhuma espécie já descrita nos demais gêneros (Jirkú et al., 2012; Kostygov et al., 2011; Merzlyak et al., 2001; Schwarz et al., 2015; Yurchenko et al., 2014).

*1.4.1.1 Gênero Leishmania*

Esse gênero é composto por um importante grupo de parasitas de mamíferos (diversas espécies) e de lagartos, transmitidos por insetos hematófagos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). A maioria das espécies de *Leishmania* de mamíferos ocasiona lesões crônicas cutâneas, muco-cutâneas ou viscerais em humanos, motivos pelos quais têm sido amplamente estudadas. As leishmânias de mamíferos foram divididas em dois subgêneros: *L.* (*Viannia*), cujas espécies são restritas ao neotrópico, e *L. (Leishmania*), cujas espécies distribuem-se tanto no novo quanto no velho mundo. O subgênero *L.* (*Sauroleishmania*) inclui espécies de leishmânias de lagartos, restritas ao velho mundo (Lainson, Shaw, 1987, 2005).

Nas árvores filogenéticas, as espécies do gênero *Leishmania* (subgêneros *Viannia, Leishmania* e *Sauroleishmania*) formam um grupo monofilético. Nas análises, é possível observar um grupo basal de espécies neotropicais denominadas paraleishmânias, assim designadas por não produzirem os sintomas característicos das leishmanioses e por estarem mais relacionadas com as espécies do gênero *Endotrypanum,* o que tem gerado discussões sobre a classificação das espécies de *Leishmania* e do gênero *Endotrypanum* (Asato et al., 2009; Croan et al., 1997; Cupolillo et al., 2000; Fraga et al., 2010; Noyes et al., 1997, 2002).

*1.4.1.2 Gênero Endotrypanum*

Este gênero compreende parasitas exclusivos de preguiças, cujos hospedeiros invertebrados são flebotomíneos. Organismos do gênero *Endotrypanum* foram encontrados no Brasil, Costa Rica, Colômbia, Guiana Francesa e Panamá (Shaw, 1985). Poucos estudos moleculares, com poucos isolados, foram realizados

a fim de definir a taxonomia e o posicionamento filogenético das espécies de *Endotrypanum.*

Os critérios adotados para a classificação de tripanossomatídeos no gênero *Endotrypanum* são o hospedeiro de origem (preguiça) e a morfologia (epimastigotas no sangue, além de raros relatos de tripomastigotas no interior dos eritrócitos). Porém, epimastigotas e tripomastigotas são formas raramente observadas no sangue de preguiças e as formas promastigotas, observadas em cultura e nos insetos vetores, são morfologicamente indistinguíveis de *Leishmania*. O hospedeiro de origem também não garante a classificação de *Endotrypanum,* pois preguiças podem infectar-se com espécies de *Trypanosoma* (*T. cruzi, T. rangeli* e outras) e são reservatórios de *Leishmania* (Shaw, 1985). A classificação de isolados de flebotomíneos no gênero *Endotrypanum* é ainda mais difícil. Além de *Leishmania,* tripanossomas de morcegos e marsupiais, são transmitidos por flebotomíneos (Hoare, 1972). Outros estudos revelaram, além de *Endotrypanum* e *Leishmania*, também tripanossomas de anuros e de serpentes entre isolados de flebotomíneos da Amazônia brasileira (Ferreira et al., 2008; Viola et al., 2009).

*1.4.1.3 Gênero Crithidia*

Tripanossomatídeos do gênero *Crithidia* podem ser encontrados em moscas, mosquitos e hemípteros (incluindo predadores e fitófagos). Espécies desse gênero caracterizam-se por apresentar, exclusivamente, formas coanomastigotas. A dificuldade de identificação de formas coanomastigotas típicas reforça a necessidade de outros critérios, além do morfológico, na classificação de tripanossomatídeos do gênero *Crithidia* (Camargo et al., 1992; Santos, 2004).

Poucos representantes do gênero *Crithidia* foram comparados com finalidades taxonômicas ou incluídos em análises filogenéticas, além das antigas espécies de *Crithidia* com endossimbiontes, estas atualmente reclassificadas nos gêneros *Angomonas* e *Strigomonas* (Teixeira et al., 2011).

Além de *C. fasciculata* (espécie tipo)*, C. luciliae, C. luciliae thermophila e C. aconthocephali,* novas espécies foram classificadas no gênero *Crithidia*, como *C. confusa, C. brachyflagelli, C. insperata, C. permixta, C. abscondita, C. otongatchiensis, C. dedva* e *C. pragensis,* além das espécies do extinto gênero

*Wallaceina (C. brevicula e C. inconstans)* (Hanson, McGhee, 1961; Jirkú et al., 2012; Kostygov et al., 2014; Leger, 1902; Yurchenko et al., 2008, 2009, 2014).

A análise de isolados do gênero *Crithidia* por riboprinting de SSUrRNA (Clark et al., 1997) e sequências do gene *SL* (Fernandes et al.,1997; Podlipaev et al., 2004) revelou uma grande variabilidade genética interespecífica. Esse estudo revelou dois grupos, liderados por *C. fasciculata* e *C. luciliae thermophila,* além de *C. acanthocephali* que não foi agrupada, mas se posicionou próxima desses grupos.

Um grupo de espécie do gênero *Crithidia* que tem sido bastante estudado nos últimos anos são os parasitas de abelhas: *C. melificae, C. bombi* e *C. expoeki* (Langridge, McGhee, 1967; Popp, Lattorff, 2011, Runckel et al., 2014; Schmid-Hempel et al., 2010; Yourth et al., 2006). As espécies desse grupo são parasitas exclusivos de abelhas, com distribuição mundial. A taxonomia desse grupo, composto por espécies classificadas como *Crithidia,* também tem sido revista. Recentemente, foi proposta a criação de um novo gênero, *Lotmaria* para albergar uma das espécies (*L. passim*) desse grupo (Schwarz et al., 2015).

*1.4.1.4 Gênero Lotmaria*

Este gênero foi criado recentemente para classificar uma espécie com forma "coanomastigota" isolada da abelha *Apis mellifera*. A única espécie classificada nesse gênero é *L. passim* (Schwarz et al., 2015).

*1.4.1.5 Gênero Leptomonas*

Esse gênero compreende parasitas monoxênicos frequentemente encontrados em hemípteros de diversas famílias e origens geográficas. A espécie tipo do gênero é *L. seymouri*. Pouco se sabe sobre a diversidade genética e as relações entre as espécies classificadas tradicionalmente nesse gênero, visto que o caráter taxonômico utilizado para sua classificação é a presença exclusiva da forma promastigota. Estudos filogenéticos recentes confirmaram a polifilia das espécies classificadas no gênero *Leptomonas* (Jirkú et al., 2012; Kostygov et al., 2014; Maslov et al., 2010; Schwarz et al., 2015; Yuchenko et al., 2006a, b, 2008, 2009, 2014). Algumas espécies foram reclassificadas como *Herpetomonas* (*L. samuelli* e *L. lactosovorans*) (Borghesan et al., 2013), outras formaram diversos grupos dentro da

subfamília Leishmaniinae, porém mais relacionas com as espécies de *Crithidia* (*L. acus, L. bifurcata ,L. tarcoles*), outras posicionadas mais próximas de *Leishmania (L. costarricensis, L. barvae)* ou completamente isoladas *(L. moramango*). Poucas foram as novas espécies que posicionaram-se próximas de *L. seymouri* (*L. podiplaevi*, *L. jaderae, L. scantii, L. neopamerae* e *L. pyrrhocoris*) (Jirku et al., 2012; Maslov et al., 2010; Votypka et al., 2012a, 2013; Yurchenko et al., 2006a, b, 2008, 2009).

*1.4.1.6 Gênero Wallaceina*

Esse gênero, criado para acomodar os tripanossomatídeos de insetos com formas coanomastigota e endomastigota, encontrados nos insetos *Colocoris sexguttatus* e *Nabisbrevis* na Rússia (Merzlyak et al., 2001; Podlipaev, 2001, 2004) foi recentemente extinto. As espécies do gênero *Wallaceina* foram reclassificadas como *C. brevicula e C. inconstans.* Na re-descrição o gênero *Wallaceina* passou a albergar *W. collosoma* (anteriormente designada *Leptomonas collosoma)* e *W. raviniae* Estas novas espécies do "novo" gênero *Wallaceina* posicionam-se fora do clado da subfamília Leishmaniinae (Merzlyak et al., 2001; Yurchenko et al., 2014). A decisão de reclassificar este gênero foi tomada com base em critérios morfológicos, argumentando-se que as espécies de *Wallaceina* desenvolviam-se como endomastigotas; no entanto, *W. inconstans* e *W. brevicula* não apresentavam essas formas (Yurchenko et al., 2014). No mesmo ano, o mesmo grupo de pesquisadores alterou o nome do gênero *Wallaceina* para *Wallacemonas*. Este novo gênero abriga *W. collosoma* (espécie tipo), *W. rigidus* e *W. raviniae* (Kostygov et al., 2014).

1.4.2 Filogenia da subfamília Leishmaniinae

Vários estudos demonstram que a subfamília Leishmaniinae é subdividida em dois subclados bem suportados (Figura 1). Um clado compreende apenas espécies de parasitas monoxênicos de insetos e inclui todas as espécies classificadas como *Crithidia* e a maioria das espécies de *Leptomonas.* O outro clado compreende duas espécies de *Leptomonas* e as espécies heteroxênicas dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* (Jirkú et al., 2012; Kostygov et al, 2011; Schwarz et al., 2015; Yurchenko et al., 2014).

*1.4.2.1 Clado formado por tripanossomatidoes monoxênicos de insetos*

O subclado que compreende apenas espécies de *Crithidia* e *Leptomonas* subdivide-se em vários grupos polifiléticos, que incluem espécies de ambos os gêneros, exceto aquele que contém *Lepomonas seymouri,* que também inclui as espécies *L. podlipaevi, L. neopamerae, L. scantii, L. pyrrhocoris* e *L. jaderae*. Por outro lado, outras espécies deste gênero têm sido descritas fora desse clado, algumas inclusive mais próximas aos gêneros heteroxênicos *Leishmania* e *Endotrypanum* (Figura 1). A polifilia do gênero *Leptomonas* tem sido confirmada por diversos autores (Hollar et al., 1998; Jirkú et al., 2012; Merzlyak et al., 2001; Noyes et al., 1996; Schwarz et al., 2015; Votýpka et al., 2012a; Yurchenko et al. 2006b, 2008, 2009, 2014).

Em análises filogenéticas recentes, *Crithidia fasciculata,* isolada de um mosquito (Diptera-Culicidae), mostrou-se relacionada com *L. acus*, *L. tarcoles*, *L. spiculata, C. brachyflagelli* e *C. otongatchiensis* (Jirkú et al., 2012; Kostygov et al., 2011, 2014; Yurchenko et al, 2008, 2014). Outro grupo contém *C. confusa*, *L. bifurcata, C. insperata* e *C. pachysarca* (Jirkú et al., 2012; Yurchenko et al, 2008, 2009, 2014). Além desses clados formados por espécies de diferentes gêneros, o posicionamento filogenético das espécies *C. abscondita*, *C. permixta, C. pragensis*, *L. tenua* e do novo gênero *Lotmaria passim* é confuso, pois varia, dependendo dos táxons e marcadores filogenéticos utilizados (Jirkú et al., 2012; Podlipaev et al., 2004; Schwarz et al., 2015; Yurchenko et al., 2009, 2014).

Dependendo dos táxons e genes analisados, algumas análises posicionam o clado composto pela nova espécie *Leptomonas moramango* e a espécie *Blastocrithidia miridarum* como o mais basal do subclado composto apenas por espécies monoxênicas de insetos. A espécie *B. miridarum* precisa ser reclassificada, já que se posiciona distante do clado composto pela espécie *B. triatoma*, espécie-tipo do gênero (Kostygov et al., 2014; Votýpka et al., 2013; Yurchenko et al., 2014).

*1.4.2.2 Clado formado por tripanossomatideos monoxênicos e heteroxênicos*

O outro subclado da subfamília Leishmaniinae é composto tanto por espécies monoxênicas quanto heteroxênicas. Nesse subclado, a espécie *Leptomonas barvae* posiciona-se de forma isolada e basal em todas as análises publicadas, divergindo

posteriormente a *Leptomonas costarricensis*. Essas espécies foram isoladas de hemípteros, fitófago e predador respectivamente, na Costa Rica. Em estudos publicados, *L. costarricensis* posiciona-se filogeneticamente junto ao tripanossomatídeo G775, que foi sequenciado diretamente de um flebotomíneo da Guatemala (G775) (Maslov et al., 2010; Noyes et al., 1997; Yurchenko et al., 2006b).

O posicionamento basal destas duas espécies monoxênicas de insetos e o fato de *L. costarricensis* se relacionar a um tripanossomatídeo obtido de um flebotomíneo da Guatemala, tem apoiado a hipótese que propõe a origem do gênero *Leishmania* a partir de um tripanossomatídeo de inseto Neotropical (Noyes et al., 1997; Momen, Cupolillo, 2000).

Após *Leptomonas barvae* e *L. costarricensis*, diverge o clado que contém a grande diversidade de espécies de leishmânias, que poderia ser classificado como o clado do gênero *Leishmania*, apesar de também conter as duas espécies do gênero *Endotrypanum* (Croan et al., 1997; Cupolillo et al., 1998, 2000; Katakura et al., 2003).

*1.4.2.2.1 Clado Leishmania-Endotrypanum e as leishmanias enigmáticas*

Diferindo das espécies do gênero *Trypanosoma,* que são parasitas de todas as classes de animais, as espécies do gênero *Leishmania* infectam apenas mamíferos e lagartos. Os subgêneros *L.* (*Leishmania*) e *L.* (*Viannia*) infectam apenas mamíferos, enquanto que lagartos são infectados por espécies do subgênero *L. (Sauroleishmania*). O posicionamento de *L. (Sauroleishmania*) foi muito discutido, com propostas de classificação como gênero ou subgênero (Lainson, Shaw, 1987; Noyes et al., 1997, 1998, Orlando et al., 2002).

Análises baseadas em diversos genes resultaram em diferentes posicionamentos, provavelmente porque o número de espécies incluídas em estudos filogenéticos seja ainda muito pequeno para permitir análises que definam o *status* taxonômico dos isolados de lagartos (Momen, Cupolillo et al., 2000). Sequências do gene de RNA polimerase II (Croan, 1997) foram analisadas a fim de se determinar as relações filogenéticas entre os subgêneros *Leishmania, Viannia* e *Sauroleishmania*.

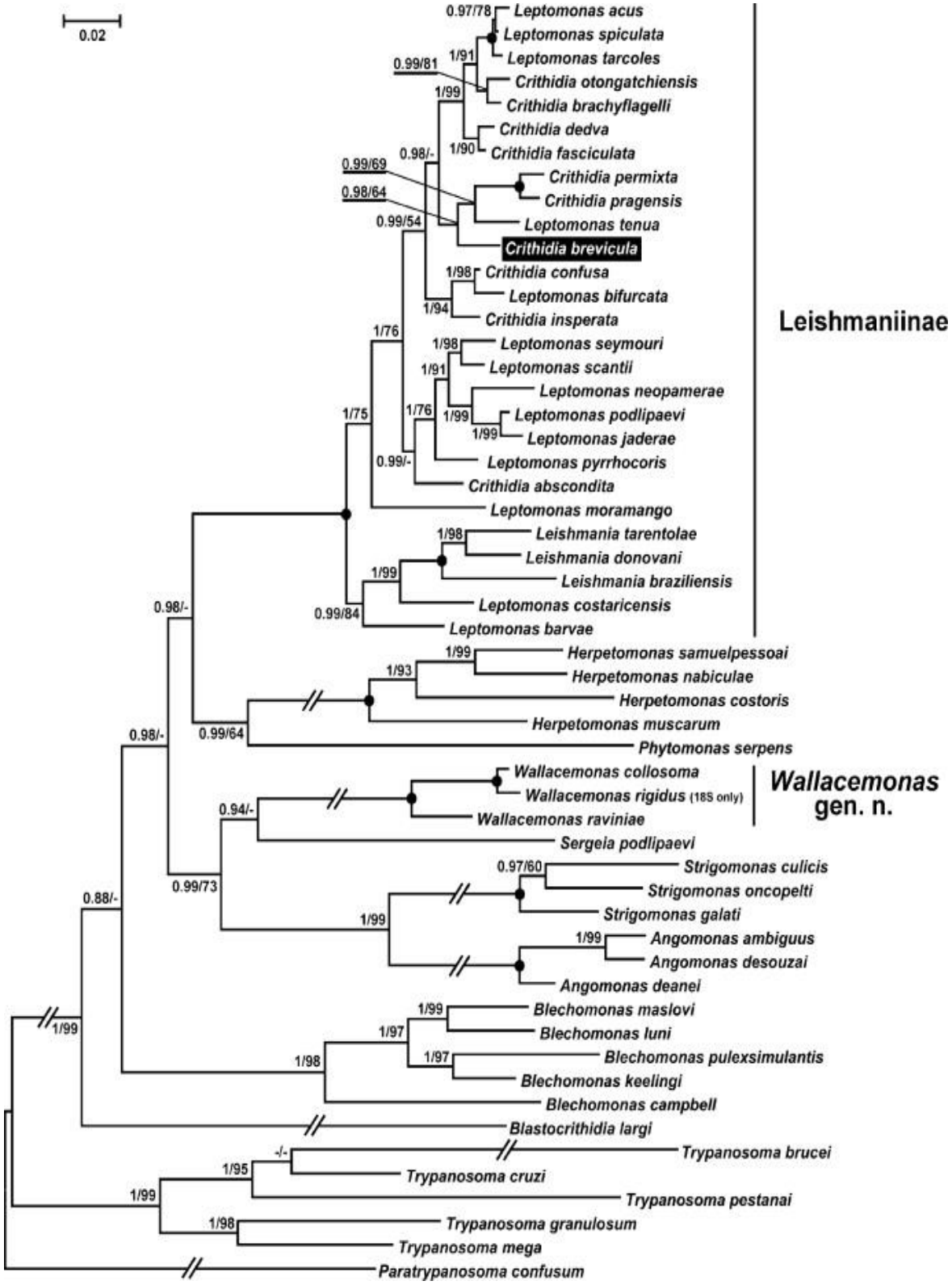



**Figura 2** - Filogenia da subfamília Leishmaniinae, baseada nas sequências concatenadas dos genes SSUrRNA e gGAPDH. Pode-se observar os dois subclados, um composto apenas por espécies monoxênicas de insetos e outro por duas espécies de *Leptomonas* e os gêneros heteroxênicos (*Leishmania* e *Endotrypanum*).

Fonte: Kostygov et al., 2014.

Nesse estudo, *L. tarentolae* se mostrou mais relacionada com *L.* (*Leishmania*); porém, os valores de suporte foram baixos. Um estudo baseado no gene citocromo b posicionou *Sauroleishmania* em um ramo basal do subgênero *L.* (*Viannia*) (Asato et al., 2009). Em outro estudo, baseado no gene HSP*70, L. tarentolae* foi posicionada mais próxima de *L.* (*Leishmania*) (Fraga et al., 2010). Apesar das controvérsias em relação ao posicionamento desses grupos, vários estudos têm corroborado, em geral, a classificação desse grupo como um subgênero de *Leishmania.*

Inúmeros estudos filogenéticos apoiam a existência de um grupo monofilético que compreende o subgênero *L.* (*Leishmania*), com espécies encontradas no Novo e Velho Mundo, o subgênero *L.* (*Viannia*) restrito ao Novo Mundo e *L. (Sauroleishmania)* restrito ao Velho mundo. Recentemente, as discussões taxonômicas sobre esse grupo propõem a diminuição do número de espécies do subgênero *L.* (*Viannia*) com base apenas em alta similaridade genética. Por outro lado, a variabilidade de isolados de *L. donovani* tem se revelado cada vez maior (Asato et al., 2009; Downing et al., 2012; Fraga et al., 2010; Leblois et al., 2011; Lukes et al., 2007; Schönian et al., 2011; Van der Auwera et al., 2011).

O gênero *Endotrypanum* foi descrito como exclusivo de tripanossomatídeos de preguiças, de dois (*Choloepus*) e três (*Bradypus*) dedos, da América Central (Costa Rica e Panamá). As espécies desse gênero, assim como as de *Leishmania,* são transmitidas por flebotomíneos (Shaw, 1964). Contrastando com as leishmânias, que vivem intracelularmente em vacúolos parasitóforos de macrófagos, os representantes do gênero *Endotrypanum* infectam eritrócitos de preguiças. As espécies deste gênero, *E. schaudinni* e *E. monterogeii,* apresentam formas tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente, que foram observadas somente em hemácias *in vivo* (Mesnil, Brimont, 1908; Shaw, 1969).

Com base em análises filogenéticas, foi proposta a divisão do gênero *Leishmania* em dois grandes grupos: Euleishmania (subgêneros *Leishmania* e *Viannia*) e Paraleishmania, que abriga as “leishmânias enigmáticas” (Cupolillo, 2000). As espécies de *Leishmanias* enigmáticas foram assim designadas por estarem mais relacionadas ao gênero *Endotrypanum* e, em alguns casos, por não produzirem a sintomatologia das leishmanioses. Essas espécies são *L. herreri* (preguiça), *L. equatorensis* (preguiça e esquilo) e *L. colombiensis* (preguiça). Há relatos de vários genótipos de *L. colombiensis* relacionados a manifestações clínicas

conhecidas de leishmanioses, incluindo a forma visceral (Rodriguez-Bonfant et al., 2003). Outras espécies de leishmânias podem ser também consideradas "enigmáticas", como *L. hertigi* e *L deanei*, até agora encontradas apenas em porco espinho do Panamá e Brasil, respectivamente, que não agrupam com nenhuma das espécies anteriormente mencionadas (Herrer, 1971; Lainson, Shaw, 1977; Noyes et al., 1996, 1997; Cupolillo et al., 1998; Grimaldi et al, 1992).

O número de espécies ainda pouco conhecidas descritas no gênero *Leishmania* vem aumentando. *L. enriettii*, agente de leishmanioses cutâneas em porquinho da índia (Muniz, Medina, 1948) é uma espécie descrita há muitos anos, mas pouco se sabe sobre ela. Desde a primeira descrição por Muniz e Medina (1948), apenas em duas outras ocasiões essa espécie foi reportada, a primeira em Curitiba/Brasil (Luz et al., 1967) e, em 1988,em duas cobaias compradas em um mercado em São Paulo, SP, que desenvolveram lesões nodulares que ulceraram de forma característica da leishmaniose cutânea produzida por *L. enriettii.* Os isolados desses animais foram identificados como *L. enriettii* (Machado et al., 1994). Em 1995, foi descrito na Martinica um tripanossomatídeo monoxênico suspeito de causar leishmaniose cutânea difusa em paciente infectado com HIV (Dedet et al., 1995). Cinco anos depois, um novo caso de infecção cutânea difusa foi relatado em um paciente HIV negativo também da Martinica (Boisseau-Garsaud et al., 2000). Os parasitas isolados desses dois pacientes compartilhavam os mesmos zimodemas. Um estudo filogenético molecular classificou esses isolados como uma espécie diferente (*Leishmania* sp. MAR) relacionada com *L. enriettii*. Essa nova espécie foi nomeada *L. martiniquensis* e incluída no subgênero *L. (Leishmania*). Surtos de leishmaniose visceral em pacientes imunocompetentes e de leishmaniose cutânea difusa na Tailândia têm sido atribuídos a *L. siamensis*; esta espécie também foi descrita como agente de leishmaniose cutânea em eqüinos e bovinos, na Europa Central e Suiça, respectivamente. Um estudo molecular recente, utilizando ITS1 rDNA, confirmou que *L. siamensis* e *L. martiniquensis* são de fato idênticas (Chiewchanvit et al., 2015; Desbois et al, 2014; Lobsiger et al., 2010; Marcilli et al., 2014; Müller et al., 2009; Noyes.et al., 2002; Pothirat et al., 2014).

Em 2004, foi descrita em cangurus na Austrália leishmaniose cutânea causada por uma *Leishmania* que não pertence a nenhum dos subgêneros descritos. Outros casos de leishmaniose tegumentar em cangurus foram relatados nos anos seguintes (Dougall et al., 2009). Estudos filogenéticos com várias espécies

de *Leishmania,* incluindo *L.enriettii, L. martiniquensis* e *Leishmania* sp. Australiana, mostraram que essas espécies formam um clado - o complexo *L. enriettii* (Dougall et al, 2009, 2011; Rose et al, 2004). Finalmente, a mais recente leishmânia enigmática é uma espécie chinesa. Utilizando SSUrRNA, Citocromo B e ITS1 rDNA um grupo de isolados humanos e de cães posicionou-se com *L. tarentolae* (Cao et al., 2011; Guan et al., 2012; Yang et al., 2010, 2013). Além disso, recentemente foi encontrado DNA do cinetoplasto de *L. tarentolae* em múmias de Itacambira, Minas Gerais, Brasil, colocando em dúvida o ”status” desta espécie de lagarto como não infectante para humanos (Novo et al., 2015).

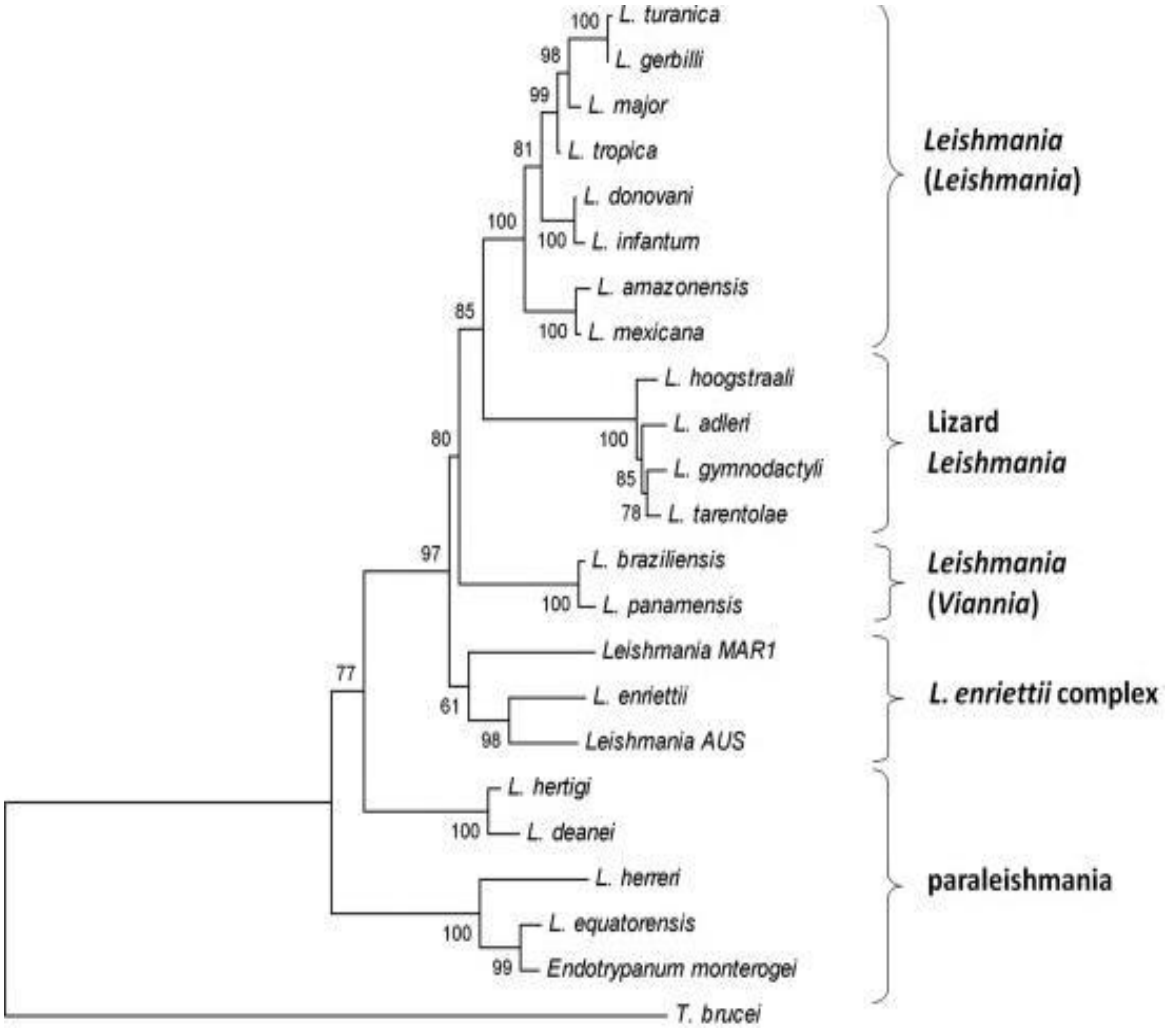



**Figura 3** – Relação filogenética entre espécies de *Leishmania, Endotrypanum* e Paraleishmania. Analises baseada nas sequências da subunidade II do gene RNA Polimerase. Pode-se observar reção entre os *Subgeneros L. (Leishmania), L. (Suroleishmnia), L. (Vinnia),* Complexo *L. enriettii*, assim como a relação entre espécies de *Endotrypanum* com *Leishmanias* enigmáticas.
Fonte: Dougall et al., 2011.

## 1.5 Genes tradicionalmente utilizados em análises filogenéticas de tripanossomatídeos

A classificação taxonômica tradicional dos tripanossomatídeos de insetos tem sido realizada com base nos padrões morfológicos estabelecidos (Hoare, 1972), criando gêneros artificiais que na realidade são grupos polifiléticos distribuídos ao longo das árvores filogenéticas. Por outro lado, com o desenvolvimento e a utilização de marcadores moleculares novos e os convencionais, tem se evidenciado a necessidade de revisar e redefinir estes grupos. Contudo, conhecer a biologia e a ecologia dos organismos, sua morfologia e seu desenvolvimento nos hospedeiros continua sendo complemento relevante na taxonomia contemporânea.

### 1.5.1 O gene ribossômico

Nas análises filogenéticas, os genes ribossômicos são amplamente utilizados devido à presença universal e a sua função conservada em todos os organismos conhecidos, ajudando, desta forma, a reconstruir suas histórias evolutivas.

O gene ribossômico é composto por várias unidades de transcrição (cistrons ribossômicos), que se encontram entre dois espaçadores intergênicos (IGS). Esta unidade cistrons-espaçadores se repete em *tandem* mais de 100 vezes no genoma dos tripanossomatídeos (Figura 2). De cada gene ribossômico, uma única unidade de transcrição (o pré-rRNA) é processada, dando origem a três moléculas maduras de RNA: 18S, 5.8S e 24S.

A subunidade menor (SSU, pela sigla em inglês) é formada por oito regiões universalmente conservadas (U1-U8) e por nove regiões variáveis (V1-V9). A subunidade maior 24S (LSU, pela sigla em inglês) possui duas versões, 24Sα e 24Sβ. No cistron ribossômico existem ainda quatro moléculas de rRNA de baixo peso molecular, S1, S2, S4 e S6 (Figura 2). As subunidades dos genes ribossômicos (SSU e LSU) são intercaladas por regiões transcritas polimórficas, que correspondem aos espaçadores internos transcritos (ITS) e externos transcritos (ETS) do gene (Hernández et al., 1990; Sogin et al., 1986).

Sequências das regiões V7V8 SSUrRNA tem sido utilizadas como marcadoras de *DNA barcoding* em estudos de diversidade genética de tripanossomatídeos. Análises baseadas em diversas regiões do cistron ribossômico

permitiram inferir diversos níveis de relacionamento entre organismos. (Borghesan et al., 2013; Fermino et al., 2013; Teixeira et al., 2011).

Os espaçadores ITS, ao contrário da região SSU e LSU, são muito variáveis e têm sido utilizados para analisar a diversidade interespecífica de diversos grupos de tripanossomatídeos (Barnabe et al., 2003; Brisse et al., 2003; Fermino et al., 2013; Ferreira et al., 2008; Guan et al., 2012; Lima et al., 2012, 2013; Maia da Silva et al., 2004; Rodrigues et al., 2006; Viola et al., 2009).

Tanto o ITS1 quanto a subunidade menor do gene ribossômico (SSU) tem sido utilizados como marcadores moleculares para inferir relações filogenéticas entre espécies do gênero *Leishmania* e como uma ferramenta confiável para identificação e caracterização de novas espécies (Briones et al., 1992; Davila, Momem, 2000; De Lima et al., 2011; Guan et al., 2012; Orlando et al., 2002; Sukmee et al., 2008; Van der Auwera, Dujardin., 2015; Yang et al., 2010).

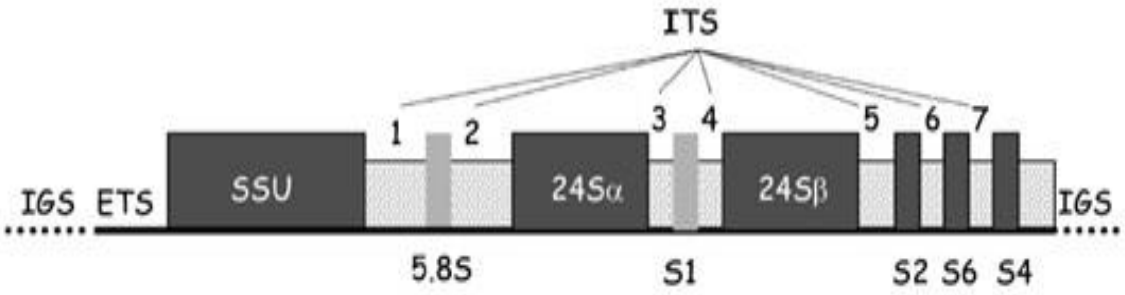



**Figura 4** - Representação esquemática do cistron ribossômico de precursores de rRNA em tripanossomatídeos. Demonstra a disposição das três regiões codificadoras de RNA: Subunidade Menor (SSU), 5.8S e a subunidade maior (LSU) composta pelas regiões 24α e 24β. Os sete espaçadores intergênicos (ITS) são intercalados ao longo do cistron ribossômico. O ITS1 se intercala entre o SSU e 5.8S. Cada cistron ribossômico é delimitado por espaçadores externos transcritos (ETS) e segmentos intergênicos (IGS).

### 1.5.2 O gene gGAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica)

A enzima gGAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicossômica) catalisa a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato**,** sexta reação da via glicolítica. Essa via metabólica, nos tripanossomatídeos, ocorre no glicossoma que é uma organela especializada e, portanto, essencial nos cinetoplastídeos (Hannaert et al., 1998). Nos tripanossomatídeos, a gGAPDH é codificada por dois

genes idênticos dispostos em *tandem*. Além dos genes glicossômicos, existe uma cópia de outro gene que codifica uma isoforma citoplasmática da enzima (cGAPDH) (Figura 3). Análises filogenéticas dos genes de GAPDH sugerem que a versão citoplasmática desses genes foi adquirida pelos tripanossomatídeos via transferência horizontal, provavelmente de uma espécie de *Euglena.* No entanto, a gGAPDH foi herdada de um ancestral comum dos cinetoplastídeos (Hannaert et al., 1998; Henze et al., 1995; Sogin et al., 1998).

Os genes de gGAPDH são bastante conservados nos tripanossomatídeos, gerando alinhamentos múltiplos confiáveis sem regiões ambíguas. Essas características permitem o emprego desses genes em análises filogenéticas de organismos muito distantes.

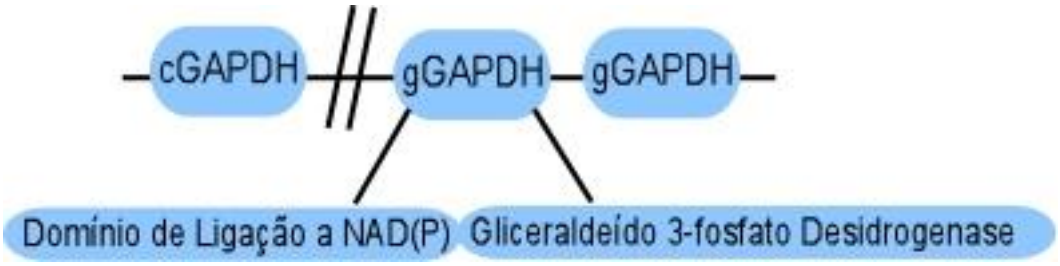



**Figura 5** - Representação esquemática dos genes que codificam as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Uma copia única do cGAPDH e os dois genes em tandém gGAPDH. Destaca-se os dominios que compõem a estrutura da proteína.

Análises baseadas em sequências do gene gGAPDH são congruentes com as obtidas utilizando genes ribossômicos (Hamilton et al., 2004). Os genes SSUrRNA e gGAPDH são os mais utilizados em análises filogenéticas da família Trypanosomatidae, tanto em análises individuais quanto combinadas.

Análises filogenéticas baseadas em sequências concatenadas de gGAPDH e SSUrRNA tem gerado topologias muito robustas e tem sido utilizadas para o posicionamento de novas espécies, bem como nas reconstruções da história evolutiva dos tripanossomatídeos (Fermino et al., 2013; Hamilton et al., 2004, 2005a, b, 2007, 2009; Lima et al., 2012, 2013; Marcilli et al., 2014; Viola et al., 2009).

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

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

Os genes *SL* possuem três regiões com diferentes graus de conservação: um éxon com 39 nucleotídeos, altamente conservado; um íntron moderadamente conservado de 50-150 nucleotídeos; e uma região espaçadora intergênica (*SL* IR), que apresenta variações de tamanho e de sequências nas diferentes espécies de tripanossomatídeos. Algumas espécies também apresentam o rRNA 5S, inserido na região intergênica do gene *SL* e composto de sequências altamente conservadas (Figura 4) (Gibson et al., 2000). Essas características e o fato de que este gene se repete (100-200 vezes) "*in tandem*" no genoma dos tripanossomatídeos, o torna um excelente marcador genético taxonômico e para diagnóstico.

A utilização dos genes de *SL* permitiu determinar o polimorfismo genético em vários gêneros de tripanossomatídeos estudados, incluindo *Trypanosoma* (Maia da Silva et al., 2007; Rodrigues et al., 2010; Ventura et al., 2001), *Crithidia* (Fernandes et al., 1997; Yurchenko et al., 2008), *Endotrypanum* (Fernandes et al., 1993), *Leishmania* (Fernandes et al., 1994; Paiva et al., 2006; Serin et al., 2007), *Leptomonas* e *Herpetomonas* (Podlipaev et al., 2004; Westenberger et al., 2004; Yurchenko et al., 2006a) e *Phytomonas* (Dollet et al., 2000, 2001; Godoi et al., 2002; Nunes et al., 1995; Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999a, b). Também tem sido utilizado nas descrições de novas espécies e gêneros, como *Sergeia* (Svobodová et al., 2007), *Blechomonas* e *Kentomonas* (Votýpka et al., 2013, 2014), *Wallacemonas* (Kostygov et al., 2014).

Na subfamília Leishmaniinae, o gene *SL* foi utilizado como uma ferramenta para descrever novas espécies dos gêneros *Leptomonas* e *Crithidia* (Jirku et al., 2012; Maslov et al., 2010; Yurhenko et al., 2006a, b, 2008, 2009, 2014). No gênero

*Leishmania* também foi utilizado para identificação e relações filogenéticas de novas espécies (Guan et al., 2012).

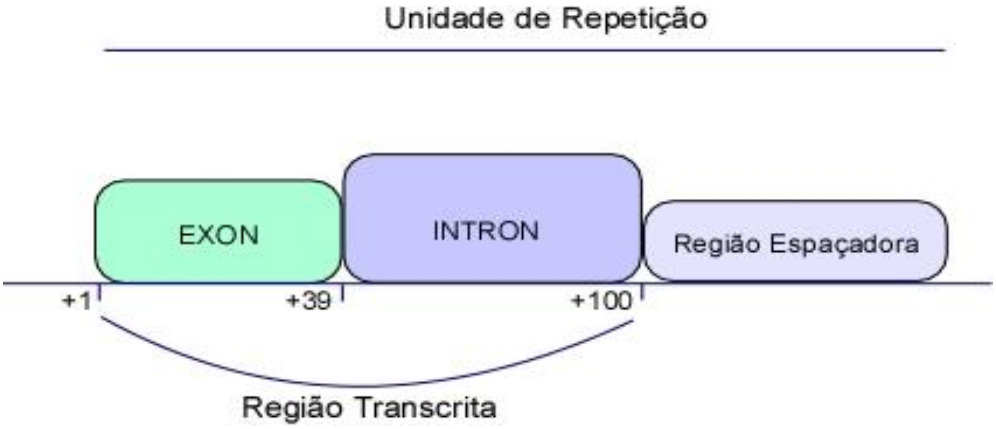



**Figura 6** - Representação esquemática do gene *SL*. Destacam-se as três regiões que compõem este gene: Éxon, Íntron e a região espaçadora.

## 1.6 Novos marcadores utilizados em análises filogenéticas de tripanossomatídeos

### 1.6.1 Cisteíno Proteases

Proteases (proteinases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas, degradando proteínas, ativando enzimas ou produzindo peptídeos menores. As proteases têm sido encontradas em diversos sistemas biológicos, que incluem procariotos, eucariotos e vírus, e constituem um dos grupos mais complexos e heterogêneos de enzimas. Estima-se que aproximadamente 2% dos genes expressos codificam proteases (Mottram et al., 2003; Rudenskaya, Pupov, 2008; Sajid, McKerrow, 2002; Vermelho et al., 2007).

Devido à sua diversidade, proteases podem ser classificadas segundo o tipo de reação catalisada e os mecanismos catalíticos envolvidos. Com base no tipo de reação, podem atuar como exopeptidases, clivando ligações peptídicas próximas às regiões N-terminal ou C-terminal (aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente) e endopeptidases (ou proteinases), quando clivam preferentemente ligações peptídicas da região interna da cadeia polipeptídica (Barret, 1994; Barrett, McDonald, 1985, 1986; Rao et al., 1998). Com base no

mecanismo catalítico e os aminoácidos reativos do sítio ativo, proteases são classificadas em serina-proteases, aspártico-proteases, metalo-proteases, treonina-proteases e cisteína-proteases.

Papaína foi a primeira cisteína-protease (CP) descrita e é considerada o protótipo deste grupo. As demais CPs, similares em sequência, estrutura e atividades à papaína são denominadas “Papaína-like” (Mottram et al., 2003; Rawlings, 2007; Sajid, McKerrow, 2002).

As CPs são divididas em subgrupos denominados Clãs e estes, por sua vez, em famílias. Foram descritos aproximadamente 12 Clãs para classificar as CPs, sendo que os Clãs CD e CA são os que reúnem a maioria das CPs conhecidas. (Mottram et al., 2003; Rudenskaya, Pupov, 2008; Sajid, McKerrow, 2002). O Clã CA agrupa a maioria das CPs descritas e que contém resíduos de Cisteína, Histidina e Asparagina ou Ácido Aspártico (C-H-N/D) na tríade catalítica (Mottram et al., 2003). Nesse Clã encontram-se as catepsinas B, C, K, L e S dos mamíferos e atividades equivalentes, descritas em outros organismos, como os protozoários (catepsinas-*like*) (Rawlings, 2007; Sajid, McKerrow, 2002).

*1.6.1.1 Catepsinas-Like estudadas no gênero Trypanosoma*

Catepsinas L e B (CATL e CATB) são as cisteína proteases mais estudadas por serem as principais atividades identificadas como fatores de virulência nas espécies patogênicas de *Trypanosoma* e *Leishmania.*

Diferentes Catepsina *L-like* (*cpb*) têm sido descritas no gênero *Trypanosoma* e estas acabaram sendo nomeadas com base na espécie estudada. As tripanopaínas, descritas em *T. brucei brucei* (brucipaína) e *T. b. rhodesiense* (rhodesaína), compartilham aproximadamente 98,4% de similaridade na sequência de aminoácidos e são codificadas por mais de 20 cópias dispostas em *tandem* (Rosenthal, 1999). As congopaínas (as CPs de *T. cogolense*) possuem pelo menos duas isoformas de Catepsina *L-like*. Cruzipaínas, as principais CPs presentes em *T. cruzi*, são expressas diferencialmente nos diferentes estágios do ciclo celular do parasita. Em *T. rangeli,* genes que codificam CPs (rangelipaínas) similares à Cruzipaína1 foram identificados (Cazzulo et al., 2001; Klemba, Goldberg, 2002; Kosec et al., 2006a, b; Lalmanach et al., 2002; Martinez et al., 1995; McKerrow et al.,

2006; Mottram et al., 1998, 2003; Rodrigues et al., 2014; Rosenthal, 1999; Sajid, McKerrow, 2002; Tanaka et al., 1994).

*1.6.1.2 Catepsinas estudadas no gênero Leishmania*

Uma análise detalhada no banco de dados do genoma de *Leishmania major*, revelou aproximadamente 65 genes que codificam para CPs, agrupados em quatro Clãs e treze famílias (Mottram et al., 2004). Em *Leishmania major,* CPs distribuem-se em oito famílias do Clã CA. A família C1 contém CPA e CPB, ambas semelhantes à Catepsina L-*Like* em termos da sequência primária de aminoácidos, e CPC, que é uma catepsina B-*lik*e (Mottram et al., 1998; Van der Auwera, Dujardin 2015).

*1.6.1.2.1 Catepsinas L-Like*

A CPB possui uma extensão C-terminal de 100 aminoácidos, ausente nas demais CPs, e várias isoformas codificadas por um conjunto variado de genes semelhantes. São oito genes no genoma de *L. major* e 19 no de *L. mexicana,* arranjados em *tandem*, todos em um único lócus (Denise et al., 2003; Mottram et al., 1998).

A atividade de *cpb* tem sido relacionada à virulência, como demonstrado em modelo murino (camundongo BALB/c) para *L. mexicana.* Sua atividade foi associada ao aumento na produção de IL-4 e, portanto, da resposta Th2 (Alexander et al., 1998; Denise et al., 2003). Por outro lado, há estudos demonstrando a capacidade de CPB em inibir a resposta Th1 em vez de induzir uma resposta de Th2 (Buxbaum et al., 2003). De qualquer modo, seja inibindo a resposta Th1 ou aumentando a Th2, o resultado favorece a sobrevivência do parasita e a infecção no hospedeiro mamífero.

*1.6.1.2.2 Catepsina B-like*

A Catepsina B-*like* (CATB) é uma enzima lisossômica que possui três domínios característicos: pré-domínio (peptídeo sinal), pro-domínio e o domínio catalítico (Figura 5). Diversos estudos genômicos sugerem que no gênero *Leishmania* a CATB (*cpc*) é codificada por um gene de cópia única, igual nas demais

espécies de tripanossomatídeos. Diferindo de CATL, as Catepsinas B-*like* caracterizam-se pela presença de uma inserção peptídica no domínio catalítico, chamada “loop de oclusão”, responsável pela atividade de exopeptidase destas enzimas (Coombs, Mottram 1997; Mottram et al., 2004; Sakanari et al., 1997; Silva-Almeida et al., 2014).

No gênero *Leishmania,* tanto Catepsina L-*like* (*cpa* e *cpb*) quanto Catepsina B-*like* são alvos potenciais de drogas e vacinas (Gerbaba, Gedamu, 2013). Entretanto, mesmo que os aspectos funcionais associados às CATL sejam mais amplamente estudados em *Leishmania*, não estão claros os fenômenos biológicos e de virulência associados à CATB, que é expressa tanto em amastigotas quanto em promastigotas (Bart et al., 1997). O papel de CATB na sobrevivência do parasita em macrófagos do hospedeiro mamífero foi sugerido com a demonstração de que a enzima pode clivar o fator de necrose tumoral beta (TGF-□) à forma biologicamente ativa (Somanna et al., 2002). Por outro lado, alguns estudos demonstram que a interação parasita-macrófago não depende somente dessa enzima. A participação de CATB na morte celular do parasita também foi demonstrada (El-Fadili et al., 2010; Mottram et al., 2004).

Não obstante postular-se o envolvimento de CATB em importantes processos biológicos nas espécies de *Leishmania*, apenas um estudo filogenético foi realizado utilizando este gene de cópia única como marcador molecular e incluindo táxons da subfamília Leishmaniinae (Sakanari et al., 1997).

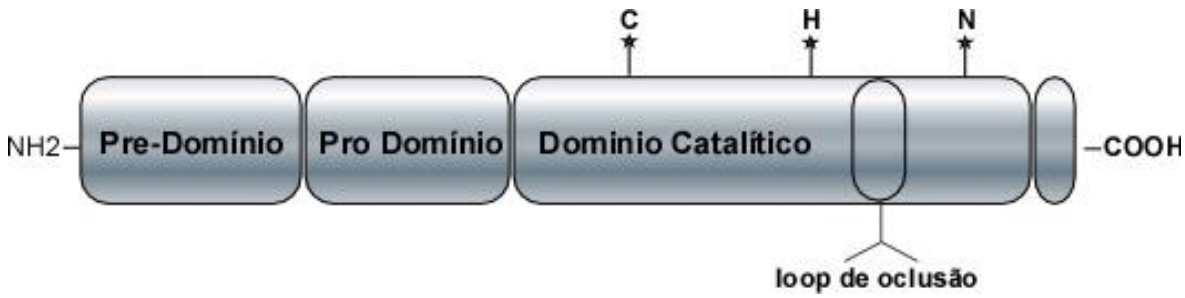



**Figura 7** - Representação esquemática dos domínios da enzima Catepsina B-*like.* As estrelas destacam as posições dos resíduos catalíticos: Cisteína (C); Histidina (H) e Asparagina (N).

### 1.6.2 HSP70

As proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) são uma classe de chaperonas moleculares que compreendem uma família de proteínas altamente conservadas. Essas proteínas desempenham um papel fundamental na coordenação de um número de processos celulares essenciais: a translocação de proteínas de membrana; controle de proteínas reguladoras; e degradação proteolítica de proteínas desnaturadas ou instáveis (Kabani, Martineau, 2008; Mayer, Bukau, 2005; Young, 2004).

Os organismos eucarióticos expressam vários tipos de HSP70 que são ligeiramente diferentes. Todos compartilham certas estruturas e domínios, mas cada um tem um padrão único de expressão ou localização subcelular. Os compartimentos celulares onde essas proteínas foram descritas são: citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático (Demand et al, 1998; Low et al., 2010).

As HSP70 citoplasmáticas possuem um domínio ATPase de 45 kDa na extremidade N-terminal, um domínio de ligação ao substrato de 15-18 kDa e um domínio de 10 kDa C-terminal (Figura 6). O domínio C terminal das HSP70 citoplasmáticas termina com um motivo EEVD conservado, que é crucial para as associações com as co-chaperonas, como a HSP40 e a HSP90 (Li et al., 2009; Louw et al., 2010).

Devido à sua importância nos processos biológicos dos protozoários parasitas e pela conservação evolutiva das sequências de nucleotídeos, os genes HSP70 citoplasmáticos foram os primeiros a serem clonados e estudados nos cinetoplastídeos. Assim, o locus HSP70 de *T. brucei* foi caracterizado, demonstrando-se que o mesmo compreendia cinco genes dispostos em *tandem* (genes 2-6) e um único gene (gene 1) separado por alguns Kb da matriz em *tandem*. Em *T. cruzi*, dez cópias do gene HSP70 foram encontradas organizadas em *tandem*. Em várias espécies de *Leishmania* (*L. infantum, L. major, L. tropica, L. mexicana* e *L. amazonensis*), duas classes de genes HSP70 foram descritas: HSP70 I e HSP70 II. Em geral, estes genes são organizados no mesmo locus, com cinco ou seis genes de HSP70 I organizados em *tandem,* seguidos por um gene de HSP70 II. Análises posteriores indicaram que todos estes cinco genes HSP70 I apresentam sequências de DNA idênticas (Folgueira et al., 2007; Glass et al., 1986; Lee et al., 1988; Ramírez et al., 2011; Requena et al., 1988).

O gene HSP70 encontra-se sob uma pressão seletiva estável que favorece a conservação de sua função. Nesse gene, as substituições sinônimas (6,3%) são favorecidas em relação às não sinônimas (1,9%), o que faz com que suas múltiplas cópias sejam idênticas. Todas essas características fazem o gene HSP70 um bom alvo para estudos filogenéticos (Fraga et al., 2010; Schönian et al., 2011).

Um estudo recente empregou o gene HSP70 citoplasmático como marcador molecular e incluiu, pela primeira vez, várias cepas de *Leishmania* de diferentes origens (Fraga et al., 2010). A filogenia resultante corroborou os dois subgêneros previamente descritos *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* (Lainson, Shaw 1987). Nesse estudo, no entanto, apenas uma espécie de leishmânia de lagarto *(L. tarentolae)* foi empregada e as espécies de leishmânias enigmáticas (Paraleishmania) não foram analisadas. Além disso, o gene HSP70 tem sido utilizado como uma ferramenta confiável na caraterização de esécies de Leishmania (Montalvo et al., 2014; Van der Awera et al.,2011; Van der Awera, Dujardin 2015).

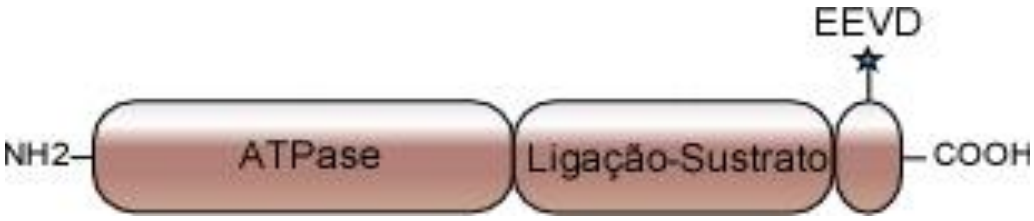



**Figura 8** - Representação esquemática da proteína de choque térmico de 70 kDa citoplasmática (HSP70). Destacam-se os principais domínios da Proteína: O domínio N-terminal ATPase de 45 kDa, domínio de ligação ao substrato de 15-18 kDa e o domínio de C-terminal de 10 kDa com o motivo EEVD.

## 2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, os métodos de diagnóstico e identificação molecular foram aprimorados, contribuindo consideravelmente para o descobrimento de novas espécies, linhagens e genótipos dentro da grande variedade de tripanossomatídeos de insetos. Por sua vez, várias das espécies isoladas de hemípteros de diferentes origens geográficas foram classificadas dentro dos gêneros que compreendem a subfamília Leishmaniinae com base nos morfotipos observados e, portanto, ignorando os dados moleculares. Essas classificações, considerando apenas os padrões morfológicos, resultaram na criação de grupos polifiléticos dentro da subfamília Leishmaniinae, de forma que o gênero *Leishmania* é considerado o único táxon natural (Jirkú et al., 2012).

Para uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre as espécies monoxênicas que formam os diferentes grupos da subfamília Leishmaniinae, são necessárias novas análises com um maior número de isolados dos diferentes gêneros que compõem essa subfamília. Igualmente, é necessário compreender as relações filogenéticas entre os gêneros heteroxênicos *Endotrypanum* e as chamadas leishmânias enigmáticas e suas relações com as espécies dos subgêneros *L.* (*Leishmania*)*, L (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania).* Além de compreender o relacionamento entre essas espécies, é importante estudar como se relacionam as espécies monoxênicas com as heteroxênicas a fim de entender a origem e a evolução da subfamília Leishmaniinae.

Além de estudar um maior número de isolados dos diferentes gêneros da subfamília Leishmaniinae, é necessário analisar novos marcadores moleculares com diferentes taxas de evolução. Para a investigação dos relacionamentos filogenéticos de tripanossomatídeos, os genes tradicionalmente utilizados são os de SSUrRNA e gGAPDH. As relações filogenéticas entre os grupos da subfamília Leishmaniinae não são bem resolvidas, tendo sido analisadas espécies de cada um dos gêneros desse clado com base apenas nos genes tradicionais, muito conservados para esses flagelados (Kostygov et al., 2014; Yurchenko et al., 2006b, 2014). O emprego de marcadores moleculares mais variáveis (ITSrDNA, HSP70 e Catepsina B) que os tradicionalmente utilizados, tem esclarecido melhor os relacionamentos filogenético entre espécies do gênero *Leishmania* (Fraga et al., 2010; Davila, Momen, 2000; Sakanari et al.,1997; Yang et al., 2010). Ainda não existem estudos filogenéticos que

utilizam esses genes com espécies representativas de outros gêneros da subfamília Leishmaniinae.

Estudar os genes tradicionais e novos marcadores moleculares e inclusive fazer análises concatenadas, podem contribuir para o entendimento da diversidade, complexidade das relações filogenéticas e da história evolutiva da subfamília Leishmaniinae.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo Geral

Sequenciar diversos genes (SSUrRNA, gGAPDH, CATB e HSP70) de isolados de tripanossomatídeos da subfamília Leishmaniinae, provenientes de diferentes origens geográfica e hospedeiros, insetos e vertebrados, a fim de conhecer a diversidade genética e inferir relações filogenéticas entre os gêneros e grupos que compõe este táxon.

## 3.2 Objetivos Específicos

a) Analisar a diversidade e as relações filogenéticas entre tripanossomatídeos monoxênicos classificados nos gêneros *Crithidia* e *Leptomonas* e grupos filogeneticamente relacionados posicionados na subfamília Leishmaniinae por DNA "barcoding", utilizando sequências de V7V8 SSUrRNA e gGAPDH;
b) Inferir relações filogenéticas utilizando novos marcadores moleculares, como HSP70 e Catepsina B.
c) Analisar por DNA *"barcoding"* isolados de flebotomíneos e de preguiças classificados no gênero *Endotrypanum* e comparar com as espécies "enigmáticas" *L. herreri, L. hertigi, L. deanei, L. colombiensis e L. equatorensis*; inferir relações filogenéticas (SSUrRNA, gGAPDH, HSP70 e CATB) entre essas espécies (Paraleishmania) e as do grupo Euleishmania;
   Caracterizar novos isolados de *Leishmania* de lagartos (Moçambique) e analisar as relações filogenéticas desses com as espécies disponíveis de *L.* (*Sauroleishmania*) e outros subgêneros com base em análises multigênicas.
d) Propor revisões taxonômicas dos gêneros da subfamília Leishmaniinae, com base na análise dos posicionamentos filogenéticos e das divergências entre espécies, baseado em análises multigênicas.

# 4 MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Organismos

Os tripanossomatídeos dos gêneros *Crithidia, Leptomonas*, *Endotrypanum* e *Leishmania* utilizados neste estudo estão criopreservados na coleção de tripanossomatídeos do Departamento de Parasitologia, ICB II - USP. Nesse estudo, foram empregadas espécies representativas de cada gênero, tendo sido selecionadas espécies que abrangem a diversidade genética de cada clado e seus subclados (Tabela 1).

**Tabela 1 – Lista de Isolados de tripanossomatídeos (TCC) da subfamília Leishmaniinae utilizados neste estudo**

| | | | Hospedeiro | | OrigemGeográfica | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **TCC** | **Espécie** | **Ordem** | **Família** | **Espécie** | **ES** | **País** |
| 050E | ***C. luciliae thermophila*** | Hemiptera | Reduviidae | *Zelus leucogrammus* | GO | Brasil |
| 71 | Isolado | Solanales | Solanaceae | *Solanum lycopersicum* | PR | Brasil |
| 268 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Zelus leucogrammus* | | Brasil |
| 392 | Isolado | hemiptera | Largidae | *Largus sp.* | RO | Brasil |
| 471 | Isolado | Hemiptera | Largidae | *Largus sp.* | RO | Brasil |
| 1664 | Isolado | Hemiptero | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | SO | Moçambique |
| 1265 | Isolado | Diptera | Muscidae | *Brontaea sp.* | SO | Moçambique |
| 1268 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | *Chrysomya putoria* | SO | Moçambique |
| 1269 | Isolado | Hemitpera | Alydidae | *Riptortus sp.* | SO | Moçambique |
| 1889 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SO | Moçambique |
| 1890 | Isolado | Hemiptera | Alydidae | *Riptortus sp.* | SO | Moçambique |
| 1892 | Isolado | Hemiptera | Alydidae | *Riptortus sp.* | SO | Moçambique |
| 1893 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SO | Moçambique |
| 1938 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SO | Moçambique |
| 2017 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | | Guine Bissau |
| 2042 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Rhynocoris albopilosus* | | Guine Bissau |
| 2073 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2074 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2075 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2076 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2077 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2078 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2079 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2082 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2084 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2085 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2086 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | MS | Brasil |
| 2456 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | TM | Colômbia |
| 2461 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Hypselonotus sp.* | TM | Colômbia |
| 2494 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | TO | Brasil |
| 2614 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | TO | Brasil |
| 2621 | Isolado | Diptera | Caliphoridae | ni | TO | Brasil |
| 2647 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Zelus sp.* | ZU | Venezuela |
| 2649 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *predador* | ZU | Venezuela |
| 2719 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 33 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | SP | Brasil |
| 47 | Isolado | Hemiptera | ni | ni | PR | Brasil |
| 241 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | PR | Brasil |
| 342 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Acanthischium sp* | RO | Brasil |
| 387 | Isolado | Hemiptera | Largidae | *Largus sp* | RO | Brasil |
| 389 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinolla* | RO | Brasil |
| 459 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Phthias picta* | | |
| 497 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinolla* | RO | Brasil |
| 503 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinolla* | RO | Brasil |
| 2710 | Isolado | Diptera | Mosca | ni | TO | Brasil |

| | | | Hospedeiro | | OrigemGeográfica | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **TCC** | **Espécie** | **Ordem** | **Família** | **Espécie** | **ES** | **País** |
| 2720 | Isolado | Diptera | Mosca | ni | TO | Brasil |
| 2375 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | SO | Moçambique |
| 2358 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | ni | SO | Moçambique |
| 2371 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | ni | ZU | Venezuela |
| 2372 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | ni | ZU | Venezuela |
| 2405 | Isolado | Diptera | Moscas | ni | ME | Venezuela |
| 2870 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | ni | AP | Venezuela |
| 2357 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | SO | Moçambique |
| 2358 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | ni | SO | Moçambique |
| 2371 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | ni | ZU | Venezuela |
| 2372 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | ni | ZU | Venezuela |
| 2405 | Isolado | Diptera | Mosca | ni | ME | Venezuela |
| 2870 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | ni | AP | Venezuela |
| 371 | Isolado | Hemiptera | Pyarrthochoridae | *Dysdercus sp.* | RO | Brasil |
| 460 | Isolado | Hemiptera | Largidae | *Largus sp.* | RO | Brasil |
| 505 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 509 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 039E | ***C. fasciculata*** | Diptera | Culicidae | *Anopheles quadrimaculata* | NY | EUA |
| 078E | *H. anglusteri* | Diptera | Sarcophagidae | *Liopygia ruficornis* | MG | Brasil |
| 278 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | PR | Brasil |
| 280 | Isolado | Hemiptera | Pentatomidae | *Nezara viriduia* | PR | Brasil |
| 040E | *C. f.* nogushi | Diptera | Culicidae | *Anopheles quadrimaculatus* | | EUA |
| 041E | *C. f.*minnesota | Diptera | Culicidae | *Culex pipens* | MI | EUA |
| 042E | *C. f.* noelleri | Diptera | Culicidae | *Culex sp.* | | EUA |
| 046E | *C. hutneri* | Hemiptera | Reduviidae | *Cosmoclopius sp.* | GO | Brasil |
| 075E | *C. guilhermei* | Diptera | Calliphoridae | *Phaenicea cuprina* | RJ | Brasil |
| 038E | C. luciliae | Diptera | Calliphoridae | *Phaenicea serricta* | MI | USA |
| 057E | Isolado | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | RJ | Brasil |
| 058E | Isolado | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | RJ | Brasil |
| 059E | Isolado | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | RJ | Brasil |
| 506 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 2695 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 2697 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 2603 | Isolado | Diptera | mosca | ni | MO | Madagascar |
| 2709 | Isolado | Diptera | mosca | ni | TO | Brasil |
| 240 | Isolado | Planta | | *Mourus sp.* | PR | Brasil |
| 89E | *L. occidentalis* | Hemiptera | Nabidae | *Nabicula flavomarginata* | KA | Rússia |
| 92E | *L. nabiculae* | Hemiptera | Nabidae | *Nabicula flavomarginata* | KA | Rússia |
| 011E | ***L. seymouri*** | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus suturelus* | Fl | EUA |
| 2478 | *L. pyrrhocoris* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 1906 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dydercus sp.* | SO | Moçambique |
| 1988 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Harpactor angulosus* | SP | Brasil |
| 1897 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dyscercus sp.* | SO | Moçambique |
| 103E | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SP | BR |
| 1661 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SO | Moçambique |
| 139E | Isolado | Hemiptera | Pentatomidae | *Loxa sp.* | SP | Brasil |
| 100E | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SP | Brasil |
| 1880 | Isolado | Hemiptera | Pentatomidae | *Chlorocoris sp.* | SP | Brasil |
| 377 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SP | Brasil |
| 1659 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | SO | Moçambique |
| 1662 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | SO | Moçambique |
| 1641 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | SO | Moçambique |
| 1849 | Isolado | Hemiptera | Lygaeidae | *Oncopeltus sp.* | SP | Brasil |
| 114E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Leptoglossus gonagra* | PR | Brasil |
| 108E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Leptoglossus gonagra* | PR | Brasil |
| 116E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Leptoglossus gonagra* | PR | Brasil |
| 142E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Diactor bilineatus* | SP | Brasil |
| 145E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Diactor bilineatus* | SP | Brasil |
| 188E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Leptoglossus sp.* | SP | Brasil |
| 180E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Megalotomus sp.* | SP | Brasil |
| 151E | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | SP | Brasil |
| 65 | Isolado | Solanales | Solanaceae | *Lycopersicum esculentum* | PR | Brasil |
| 1643 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | SO | Moçambique |
| 1674 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | SO | Moçambique |
| 1646 | Isolado | Hemiptera | Pyrrhocoridae | ni | SO | Moçambique |

| | | | Hospedeiro | | OrigemGeográfica | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **TCC** | **Espécie** | **Ordem** | **Família** | **Espécie** | **ES** | **País** |
| 2165 | ***L. costarricensis*** | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla simillima* | HE | Costa Rica |
| 169E | isolados | Hemiptera | Reduviidae | *Zelinae sp.* | AM | Brasil |
| 504 | isolados | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 356 | isolados | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 2696 | isolados | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 2750 | isolados | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 2547 | isolados | Hempiptea | Reduviidae | *Ricolla sp.* | PN | Panamá |
| 068E | *H. dedonderi* | Diptera | Culicidae | *Haemagogus janthinomys* | | Guiana Francesa |
| | | | | | | |
| 310 | **Rondônia** | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 338E | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Hypselonotus sp.* | RO | Brasil |
| 388 | Isolado | Hemiptera | Largidae | *Largus sp.* | RO | Brasil |
| 472 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Phytia picta* | RO | Brasil |
| 496 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| 2637 | Isolado | Hemiptera | Largidae | *Largus sp.* | ZU | Venezuela |
| 2722 | Isolado | Diptera | Mosca | ni | TO | Brasil |
| 2826 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Hypselonotus sp* | BO | Colômbia |
| 2829 | Isolado | Hemiptera | Alydidae | ni | BO | Colômbia |
| 2839 | Isolado | Diptera | Mosca | ni | BO | Colômbia |
| | | | | | | |
| 037E | ***C. acanthocephali*** | Hemiptera | Coreidae | *Acanthocephala femorata* | PA | Brasil |
| 49 | Isolado | Hemiptera | Coreidae | *Veneza zonata* | PR | Brasil |
| 50 | Isolado | Hemiptera | Phyrrochoridae | *Dysdercus sp.* | PR | Brasil |
| 275 | Isolado | Hemiptera | Phyrrochoridae | *Dysdercus sp.* | PA | Brasil |
| 368 | Isolado | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | RO | Brasil |
| | | | | | | |
| | ***Leishmana*** | | | | | |
| 250 | *L. deanei* | Xenartra | Megalonychidae | *Choloepus sp.* | PA | Brasil |
| 255 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 256 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 258 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 260 | *L. hertigi* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou rothsehildi* | | Panamá |
| 583 | *L. colombiensis* | Diptera | Psychodidae | *Lutzomia gomezi* | | Panamá |
| 586 | *L. colombiensis* | Primata | Hominidae | *Homo sapiens* | LA | Venezuela |
| 259 | *L. equatorensis* | Xenatra | Megalonychidae | *Choloepus hoffmani* | | Equador |
| 252 | *L. equatorensis* | Rodentia | Scuridae | *Sciurus granatensis* | | Equador |
| 251 | *L. herreri* | Xenatra | Megalonychidae | *Choloepus hoffmani* | | Costa Rica |
| 253 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 255 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 256 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 258 | *L. deanei* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou sp.* | PA | Brasil |
| 260 | *L. hertigi* | Rodentia | Erethizontidae | *Coendou rothsehildi* | | Panamá |
| 1063 | *L. australiana* | Diprotodontia | Macropodidae | *Macropus sp.* | | Austrália |
| 2114 | *L. enriettii* | Rodentia | Caviidae | *Cavia porcelus* | PA | Brasil |
| 2115 | *L. enriettii* | Rodentia | Caviidae | *Cavia porcelus* | PA | Brasil |
| | | | | | | |
| 224 | ***E. schaudinni*** | Xenatra | Megalonychidae | *Choloepus hoffmani* | | Panamá |
| 222 | *E. monterogeii* | Xenatra | Megalonychidae | *Choloepus hoffmani* | | Costa Rica |
| 226 | *Endotrypanum sp.* | Xenatra | Bradypodidae | *Bradypus infuscatus* | | Panamá |
| 102 | *Endotrypanum sp.* | Diptera | Pysychodidae | *Psanthyromya dendrophyla* | RO | Brasil |
| 286 | *Endotrypanum sp.* | Xenatra | Megalonychidae | *Choleopus hoffmani* | | Guiana Francesa |
| 230 | *Endotrypanum sp.* | Xenatra | Megalonychidae | *Choloepus didactylus* | PA | Brasil |
| 890 | *Endotrypanum sp.* | Diptera | Psychodidae | *Lutzomia gomezi* | AM | Brasil |
| 239 | *Endotrypanum sp.* | Xenartra | Megalonychidae | *Choloepus didactylus* | PA | Brasil |
| 231 | *Endotrypanum sp.* | Xenartra | Megalonychidae | *Choloepus didactylus* | PA | Brasil |
| 225 | *Endotrypanum sp.* | Xenatra | Megalonychidae | *Choloepus didactylus* | PA | Brasil |
| 889 | *Endotrypanum sp.* | Diptera | Psychodidae | *Psathyromyia dendrophyla* | AM | Brasil |
| | | | | | | |
| 017E | ***L. tarentolae*** | Reptilia | Lacertidae | *Tarentola mauritanica* | BI | Argélia |
| 717 | *L. adleri* | Lacertidae | Latastia | *Longicierda revoili* | | Quênia |
| 722 | *L. gymnoctali* | Sauria | Phylcodactylidae | *Gymnodactylus caspius* | | Turquemenistão |
| 723 | *L. hoostrali* | Squamata | Gekkonidau | *Hemidactylus turcicus* | | Rep. do Sudão |
| 1958 | Isolado | Squamata | Gerrhosauridae | *Gerrhosaurus vallidus* | SO | Moçambique |
| 1898 | Isolado | Squamata | Gekkonidau | *Hemidactylus platycephalus* | SO | Moçambique |
| 1899 | Isolado | Squamata | Gekkonidau | *Hemidactylus platycephalus* | SO | Moçambique |
| 1930 | Isolado | Squamata | Gekkonidau | *Hemidactylus platycephalus* | SO | Moçambique |

## 4.2 Cultivo de Parasitas

Para a manutenção das culturas, os tripanossomatídeos em fase exponencial de crescimento foram transferidos para tubos contendo 3 ml de BAB e 5 ml de LIT com 2-10% de soro fetal bovino (Tabela 2). Os tripanossomatídeos foram incubados entre 23-28 ºC, de acordo com a espécie. Após 7 dias de incubação, uma alíquota da cultura foi colhida para verificar o crescimento dos parasitas em microscópio de contraste de fase. Os parasitas obtidos em cultura foram lavados 3 vezes com PBS e os "pellets" obtidos foram estocados a –20 ºC ou imediatamente processados para extração de DNA.

**Tabela 2 - Meios de cultura utilizados neste estudo para o cultivo de tripanossomatídeos**

| Meio de Cultura | Composição | Quantidade | Armazenamento |
|---|---|---|---|
| LIT(1) | | | |
| | Triptose | 5,00 g/L | Autoclavado e armazenado a -20 ºC. |
| | Infuso de fígado | 5,00 g/L | |
| | NaCl | 4,00 g/L | |
| | KCl | 0,40 g/L | |
| | $Na_2HPO_4$ | 8,00 g/L | |
| | Glicose | 2,00 g/L | |
| | Hemina[a] | 0,01 g/L | |
| | Soro Fetal Bovino[b] | 100 ml/L | |
| BAB/LIT(2) | BAB (Blood Agar Base) a 4% | 850 ml | Armazenado a 4 ºC |
| | Sangue de coelho estéril e desfibrinado | 150 ml | |
| TC100 | Monocamadas de células HI-5 isolada de *Trichophlusia ni* | | |

(1) Camargo (1964); (2) Rodrigues et al. (2006); **a**, hemina dissolvida em NaOH 0.1N; **b**, soro fetal bovino inativado a 56 ºC por 30 minutos e armazenado a -20 ºC.

## 4.3 Microscopia óptica e Microscopia eletrônica de varredura

Para o estudo morfológico, os isolados foram cultivados a 28 ˚C em meio LIT suplementado com Soro Fetal Bovino. As culturas em fase logarítmica foram lavadas em PBS, preparados em lâmina, em seguida fixadas com metanol, corados com Giemsa e posteriormente fotografados. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), culturas em fase logarítmica foram fixadas em 2,5% (v/v) de glutaraldeído, mais 1% (w/v) de paraformaldeído em tampão cacodiolato de sódio 0,1M (pH 7,2)

acrescido de cloreto de cálcio 1mM , os parasitas foram aderidos em lamínulas redondas previamente revestidas com Poli-L-lisina 0,1% , pós-fixados com tretróxido de ósmio 1% em tampão cacodilado de sódio 0,1M, por 30 minutos, lavados em tampão cacodilato e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50% a 100%). As amostras foram secas pelo método de ponto crítico em $CO_2$ em aparelho Balzers CDP-20, em seguidas as lamínulas foram montadas em suporte de alumínio, metalizadas com fina camada de ouro em aparelho Sputter Coater SCD 050 Balzers e analisadas em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 250 (Fei Company).

### 4.4 Extração de DNA genômico de parasitas de cultura

Os “pellets” de tripanossomatídeos foram ressuspendidos em SE gelado a uma concentração de $10^9$ células/ml, com adição de Sarkosil (0.5%), PRONase (100 µg/ml) e RNAse (10 µg/ml). Em seguida, o material foi incubado a 55-60 ˚C durante 1-2 horas e o DNA então extraído uma vez com Fenol:Tris (1:1), duas vezes com Fenol:Clorofórmio (1:1), duas vezes com Clorofórmio:Álcool isoamílico (24:1) e uma vez com Clorofórmio. Após a última extração, o DNA foi precipitado com Acetato de Sódio (3M, pH 7.0) e 2 volumes de etanol gelado à 100%. Após lavagem com etanol à 70%, o DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em Tris EDTA (TE). As soluções utilizadas neste processo estão descritas na Tabela 3. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro e estocado a 4 ˚C.

### 4.5 Reações de PCR (V7V8 SSUrRNA, gGAPDH, ITS rDNA, HS70 e CATB)

As amplificações por PCR foram realizadas com volume final de 25 □l contendo 100 ng de cada primer, 200 uM de cada dNTP, 3 mM de MgCl2, 50-200 ng de DNA, 2.5 □l de Taq polimerase (*Thermo Scientific*) e 1X do respectivo tampão suplementado com (NH4)2SO4. Ocasionalmente, BSA (1 mg/ml) e DMSO (8%) foram utilizados para favorecer as condições de amplificação, principalmente quando da utilização de DNA extraído de sangue ou de outros tecidos preservados em etanol. As condições para cada reação de amplificação estão detalhadas na Tabela 4. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2%, purificados por centrifugação em colunas Spin-X 8160 Costar (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP,

Brasil), segundo as especificações do fabricante, e preservados a -20 °C até a clonagem e sequenciamento.

**Tabela 3 - Soluções utilizadas na obtenção de DNA dos tripanossomatídeos**

| Soluções | Preparação | Volume |
|---|---|---|
| PBS 1X | NaCl (8 g); KCl (0,2 g); $Na_2HPO_4$(1,15 g); $KH_2PO_4$ (0,2 g); em $H_2O$ bidestilada autoclavada. | 1000 ml |
| SE | 99,5 ml NaCl (0,5 M); 99,5 ml Tris (2,5 mM) pH 8; 1 ml EDTA (0,5 M) pH 8. Autoclavar | 200 ml |
| Sarkosil 10% | N-laurylsarcosine (1g) em $H_2O$ bidestilada autoclavada | 10 ml |
| Acetato de sódio (3M) | $CH_3COONa$ 3H2O mw:136.08 (20,41 g) em $H_2O$ bidestilada; acertar o pH a 7 com ácido acético glacial diluído (1:10). Autoclavar | 50 ml |
| TE (Tris-EDTA) | Tris-HCl 2 M pH 7,5 (1,25 ml); EDTA 0,5 M pH 8 (0,5 ml) em $H_2O$ bidestilada autoclavada | 250 ml |
| EDTA (0,5 M) | EDTA (93,06 g) em $H_2O$ bidestilada; acertar pH para 8 com NaOH (em lentilhas), aquecer para dissolver. Autoclavar | 500 ml |

## 4.6 Clonagem de fragmentos de DNA amplificados por PCR

Fragmentos de DNA obtidos por PCR e purificados foram clonados em vetor *pGEM-T Easy Vector* (Promega) e empregados em ensaios de transformação de células dH10β. A preparação das células competentes foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001), utilizando cloreto de cálcio. As células foram transformadas e ampliadas inicialmente em meio SOC e em seguida transferidas para placas de meio LB-agar contendo ampicilina em uma concentração final de 100 µg/ml.

Os clones positivos foram selecionados e cultivados por 16 horas a 37 ˚C a 120 rpm em meio LB líquido, contendo a mesma concentração de ampicilina das placas. Os clones positivos foram ampliados por cultivo (16h/37 $^0$C) em meio LB líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina e purificados utilizando o sistema "*Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System*" (Promega).

**Tabela 4 - Ciclos de amplificação e temperaturas utilizadas nas diferentes reações de PCR**

| Gene e oligonucletídeos | Condições de amplificação |
|---|---|
| **SSUrRNA (V7-V8)**<br>609F (5´ CAC CCG CGG TAA TTC CAG C 3´)<br>706R (5´ TTG AGG TTA CAG TCT CAG 3´) | 1 ciclo: 3 min 94 °C<br>30 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 48 °C; 1 min 72 °C<br>1 ciclo: 10 min 72 °C(Da Silva et al., 2004). |
| **gGAPDH**<br>GAP-TRYmodF (5´GGB CGC ATG GTS TTC CAG G 3´)<br>GAP-TRYR (5´CCC CAC TCG TTR TCR TAC C3´)<br><br>**Oligonucleotídeos utilizados somente no sequenciamento:**<br>GAP 5R (5´ CCG AGG ATG YCC TTC ATG 3 ´)<br>GAP 3F (5´GTG AAG GCG CAG CGC AAC 3´) | 1 ciclo: 3 min 94 °C<br>30 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C<br>1 ciclo: 10 min 72 °C(Hamilton et al., 2004) |
| **ITS rDNA**<br>IR1 (5´ GCT GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT 3´)<br>IR2 (5´ GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCAS GGT CTG 3´)<br>5.8SR (5´ GGA AGC CAA GTC ATC CAT C 3´) | 1 ciclo: 3 min 94 °C<br>30 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C<br>1 ciclo: 10 min 72 °C<br>(Cupolillo et al., 1995). |
| **HSP70**<br>HSPF 5´-TGC GCA TCA TCA ACG AGC C-3´<br>HSPR 5´-ATC TTG GTC ATGA TCG GGT TGC-3´ | 1 ciclo: 3 min 94 °C<br>30 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72 °C; 1 ciclo: 10 min 72 °C |
| **CATB-*Like***<br>CATBF 5´AAG GCG AAG GGY CAG TGG AC-3´<br>CATBR 5´-CCA GCT GTT SGC RAT CTT CC -3´ | 1 ciclo: 3 min 94 °C<br>30 ciclos: 1 min 94 °C; 1 min 55 °C; 1 min 72°C; 1 ciclo: 10 min 72 °C |

## 4.7 Sequenciamento de DNA

Fragmentos de DNA clonados foram sequenciados utilizando o Kit "*Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*" (*Applied Biosystems*). Para a reação de sequenciamento foram utilizados 100-200 ng de DNA plasmidial e 10 ng de oligonucleotideos (M13 *forward* ou M13 *reverse*) em volume final de 10 □l. Após a reação, o DNA foi precipitado e analisado no sequenciador automático *Apllied Biosystems* 3500 *Genetic Analizer*.

## 4.8 Alinhamento das sequências

Os cromatogramas das sequências foram analisados no programa DNAstar SeqMan (DNAstar Inc.). As sequências determinadas e as obtidas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) conforme Tabela 5 e 6, foram alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al., 1997) alterando os parâmetros relativos à inserção de "Gaps" (peso de inserção=1, extensão=1), e ajustadas manualmente utilizando o programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013).

**Tabela 5 - Sequências obtidas do *GenBank*, da região V7V8 SSUrRNA e do gene gGAPDH de espécies de tripanossomatídeos**

| | N° Acesso GeneBank | | | |
|---|---|---|---|---|
| Espécie | SSUrRNA | gGAPDH | Hospedeiro | Local |
| *Angomonas ambiguus* | HM593015.1 | HM593019.1 | *Chrysomya albiceps* | Brasil |
| *Angomonas deanei* | HM593011.1 | EU079132.1 | *Zelus leucogrammus* | Brasil |
| *Angomonas desouzai* | HM593016.1 | HM593020.1 | *Ornidia obesa* | Brasil |
| *Blastocrithidia miridarum* | EU079128.1 | EU084896.1 | *Leptopterna dolabrata* | Rússia |
| *Blechomonas danrayi* | KF054136.1 | KF054095.1 | *Chaetopsylla globiceps* | Rep. Checa |
| *Blechomonas pulexsimulantis* | KF054129.1 | KF054091.1 | *Pulex irritans* | Rep. Checa |
| *Crithidia abscondita* | EU079126.1 | EU076606.1 | *Largus sp.* | Equador |
| *Crithidia bombi* | FN546181.1 | GU321192.1 | *Bombus lucorum* | Suiça |
| *Crithidia brachyffagelli* | JF717839.1 | JF717835.1 | *Prepos cf. accinctus* | Costa Rica |
| *Crithidia brevicula* | AF153045.2 | AF316620.1 | *Nabis brevis* | Rússia |
| *Crithidia confusa* | JF717837.1 | JF717832.1 | *Largus maculatus* | Costa Rica |
| *Crithidia dedva* | JN624299.1 | --- | *Chaetopsylla globiceps* | Rep. Checa |
| *Crithidia expoeki* | GU321195.1 | GU321193.1 | *Bombus lucorum* | Suiça |
| *Crithidia fasciculata* | Genoma | AF047493.1 | *Anopheles quadrimaculatus* | EUA |
| *Crithidia inconstans* | AF153044.2 | EU076608.1 | *Colocoris sexgultatus* | Rússia |
| *Crithidia insperata* | EU079125.1 | EU076605.1 | *Leptopetalops sp.* | Equador |
| *Crithidia luciliae* | --- | AF053740.1 | *Phaenicea serricta* | EUA |
| *Crithidia mellifica* | KM066226.1 | JF423199.1 | *Apis mellifera* | Belgica |
| *Crithidia pachysarca* | JF717836.1 | JF717831.1 | *Largus maculatus* | Costa Rica |
| *Crithidia permixta* | EU079127.1 | EU076607.1 | *Heteroptera, Miridae* | Equador |
| *Crithidia pragensis* | KC205988.1 | KF482060.1 | *Cordilura albipes* | Rep. Checa |
| *Crthidia otongatchiensis* | KC205989.1 | KF482058.1 | *Eristalis sp.* | Equador |
| *Herpetomonas muscarum* | JQ359715 | JQ359749 | *Megaselia scalaris* | EUA |
| *Herpetomonas samuelpessoai* | JQ359716 | JQ359743 | *Zelus sp.* | Brasil |
| *Kentomonas sorsogonicus* | KM242075.1 | KM242072.1 | *Sarcophaga sp.* | Filipinas |
| *Leotomona acus* | DQ910923.1 | DQ910926.1 | *subtribo Eccritotarsina* | Equador |
| *Leptomonas barvae* | FJ968532.1 | FJ968529.1 | *C. oleosa* | Costa Rica |
| *Leptomonas bifurcata* | DQ910925.1 | DQ910928.1 | *Pachypoda sp.* | Costa Rica |
| *Leptomonas costarricensis* | DQ383648.1 | DQ383650.1 | *Ricolla simillima* | Costa Rica |
| *Leptomonas jadarae* | EU079123.1 | EU076603.1 | *Jadera obscura* | Costa Rica |
| *Leptomonas moramango* | KC205990.1 | KF482059.2 | *Pachycerina vaga* | Madagascar |
| *Leptomonas neopamarae* | DQ910924.1 | DQ910927.1 | *Neopamera sp.* | Costa Rica |
| *Leptomonas podlipaevi* | DQ383649.1 | DQ019000.1 | *Boisea rubrolineata* | EUA |
| *Leptomonas pyrrhocoris* | JN036653.1 | AY029072.1 | *Pyrrhocoris apterus* | Rep. Checa |
| *Leptomonas scantii* | JN036654.1 | JN036652.1 | *Scantius aegyptius* | Fança |
| *Leptomonas seymouri* | AF153040.2 | AF047495.1 | *Dysdercus suturalis* | EUA |
| *Leptomonas spiculata* | JF717838.1 | JF717833.1 | *Proba sallei* | Costa Rica |
| *Leptomonas tarcoles* | EF546786.1 | EF546787.1 | *Prepops sp.* | Costa Rica |
| *Leptomonas tenua* | JF717839.1 | JF717834.1 | *Monopsyllus sciurorum* | Rep. Checa |
| *Lotomaria passum* | KM066239.1 | KM066224.1 | *Apis mellifera* | Belgica |
| *Phytomonas serpens* | AF016323 | EU084894.1 | *Phtia picta* | Brasil |
| *Sergeia podlipaevi* | DQ394362.1 | DQ394365.1 | *Culicoides festivipennis* | Rep. Checa |
| *Strigomonas culicis* | U05679.1 | EU079136.1 | *Aedes vexans* | EUA |
| *Strigomonas galati* | HM593010.1 | HM593018.1 | *Lutzomyia almerioi* | Brasil |
| *Strigomonas oncopelti* | AF038025 | EU079134.1 | *Oncopeltus sp.* | EUA |
| *Trypanosoma mega* | AJ223567.1 | AJ620253 | *Bufo regularis* | Africa |
| *Trypanosoma rotatorium* | U39583.1 | AJ620256.1 | *Rana catesbeiana* | Canada |
| *Wallaceina raviniae* | KC205996.1 | KF482057.1 | *Ravinia sp.* | Equador |
| *Wallacemona collosoma* | AF153038.1 | EU084899.1 | *Gerris dissortis* | EUA |

**Tabela 6 - Sequências obtidas do *GenBank*, da região V7V8 SSUrRNA, gGAPDH, HSP70, CATB e ITS1rDNA de espécies do gênero *Leishmania***

| | N° Acesso GeneBank | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Espécie** | **SSUrRNA** | **gGAPDH** | **HSP70** | **ITS1** | **CATB** | **Origem** |
| *L. panamensis* | GQ332362.1 | TriTrypdb | EU599094 | FJ948442 | TriTrypdb | MHOM/PA/71/LS94 |
| *L. brazilensis* | GQ332355.1 | XM001566870 | FN395039 | AJ300484 | XM001566381 | MHOM/BO/–/CUM 180 |
| *L. guyanensis* | GQ332358.1 | Neste estudo | EU599093 | DQ182541 | Neste estudo | MHOM/BR/75/M4177 |
| *L. aethiopica* | GQ920678.1 | TriTrypdb | FN395020 | EU683620 | TriTrypdb | MHOM/ET/83/169-83 |
| *L. tropica* | GQ332363.1 | TriTrypdb | FN395025 | EF095751 | TriTrypdb | MHOM/IL/1990/P283 |
| *L. major* | GQ332361.1 | XM_00168485 | FN395023 | GQ47190 | U43705.1 | MHOM/IL/67/LRC-L137 |
| *L. donovani* | GQ332356.1 | TriTrypdb | FN395027 | EU330411 | AF233525.1 | MHOM/SD/68/1S |
| *L. infantum* | GQ332359.1 | XM001467109 | FN395031 | FM164420 | --- | MHOM/MT/85/Buck |
| *L. amazonensis* | GQ332354.1 | TriTrypdb | EU599090 | DQ182536 | TriTrypdb | MHOM/BR/73/M2269 |
| *L. mexicana* | GQ332360.1 | TriTrypdb | EU599091 | AF466382 | TriTrypdb | MNYC/BZ/62/M379 |
| *L. martiniquensis* | TriTrypdb | TriTrypdb | TriTrypdb | TriTrypdb | TriTrypdb | MHOM/MQ/1992/MAR1 |

## 4.9 Análises filogenéticas

As inferências filogenéticas foram realisadas pelos métodos de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e análise Bayesiana (B). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 1998) pelo algoritmo de busca heurística (100 replicatas) de adição aleatória dos terminais seguida de troca de ramos (“RAS – TBR”). As análises de suporte por “bootstrap” foram feitas com 100 replicatas e os mesmos parâmetros empregados na busca.

As análises de ML foram realizadas no programa RAxML v7.2.6 (Stamatakis, 2006). Foram empregadas 500 replicatas usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama e diagramas obtidos por parcimônia como árvores iniciais. Os parâmetros do modelo de substituição empregado foram estimados durante a busca. O suporte de ramos foi estimado em 500 replicatas de “bootstrap” no programa RAxML.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Foram empregadas 500.000 gerações usando GTR como modelo de substituição e quatro categorias de gama mais proporção de sítios invariáveis. Para a construção do dendrograma final foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 75 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos nas análises bayesianas foram utilizados os valores de probabilidade a posteriori obtidos com programa MrBayes.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de facilitar a compreensão dos resultados, discutiremos inicialmente a diversidade, a filogenia e a taxonomia dos tripanossomatídeos monoxênicos de insetos, em seguida os resultados dos gêneros espécies/isolados com ciclo heteroxênico e, finalmente, as relações entre ambos os grupos.

## 5.1 Diversidade, filogenia, taxonomia e origem de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae

A fim de estudar a diversidade entre as espécies de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae, amplificamos por PCR e sequenciamos a região V7V8 do gene SSUrRNA de um grande número de isolados de tripanossomatídeos de insetos (Hemiptera e Diptera) provenientes da América do Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela), América Central (Panamá) e África (Moçambique e Guiné Bissau). Grande parte dos isolados foi analisada pela primeira vez no presente estudo. Mediante busca no BLAST, comparamos as sequências obtidas com as disponíveis no *GenBank,* a fim de selecionar os isolados com sequências mais similares às das espécies já descritas da subfamília Leishmaniinae. As sequências selecionadas foram alinhadas com todas as disponíveis de espécies dos gêneros *Leptomonas* e *Crithidia* (Tabela 2).

### 5.1.1 DNA *Barcoding* de espécies/isolados monoxênicos da subfamília Leishmaniinae

Dentre os mais de 400 isolados de insetos analisados por DNA *Barcoding* V7V8 SSUrRNA, 86 isolados exibindo forma coanomastigota, considerada característica do gênero *Crithidia,* e 33 com forma promastigota, a única encontrada no gênero *Leptomonas,* foram posicionados na subfamiília Leishmaniinae. A análise preliminar de relacionamento entre as espécies analisadas revelou diversos grupos, que correspondem a clados nas análises filogenéticas, contendo novos isolados e espécies originalmente classificadas como *Crithidia* ou *Leptomonas* (Figura 9).

*5.1.1.1 Clado Fasciculata*

Subgrupo formado por isolados (genótipos) de *C. fasciculata, C. luciliae, C. guilhermei, H. anglusteri* e novos isolados brasileiros (TCC 057E, 58E, 278 e 280), separados por pequenas divergências de *L. tarcoles, L. acus, L. spiculata, C. brachyffagelli* (isolados de hemípteros da América Central e do Sul). Junto a estas espécies foram posicionados novos isolados do Brasil (TCC 506, 59E e 2709), do Panamá (TCC 2695 e 2697), *C. otongatchiensis* (de díptero do Equador) e *C. dedva, L. nabiculae* e *L. occidentalis* (de hemípteros da Rússia).

*5.1.1.2 CladoTermófilo*

Grupo heterogêneo, que reúne *C. insperata, C. confusa, C. pachysarca*e e *L. bifurcata* (das Américas Central e do Sul) com *C. luciliae thermophila,* além de 61 novos isolados de Moçambique, Guiné Bissau, Brasil, Colômbia, Panamá e Venezuela.

*5.1.1.3 Clado Leptomonas*

Formado por seis espécies de *Leptomonas* (*L. seymouri, L. podlipaevi, L. jaderae, L. neopamarae, L. pyrrhocoris* e *L. scantii*) e 25 isolados do Brasil, Moçambique e Panamá. Este clado corresponde ao gênero *Leptomonas,* pois contém a espécie-tipo *L. seymouri.*

*5.1.1.4 Clado Acanthocephali*

Compreende *C. acanthocephali,* três novos isolados 100% similares à espécie-referência e um isolado distinto (TCC 368), todos de hemípteros do Brasil.

*5.1.1.5 Clado Inconstans*

Esse subgrupo contém apenas *C. inconstans, C. brevicula* (de hemípteros da Rússia) próximos de *L. tenua,* da República Checa; não contém nenhum isolado do Novo Mundo.

*5.1.1.6 Clado Rondônia*

Formado por seis isolados do Brasil, de Rondônia e Tocantins (TCC 310, 338, 388, 472, 496 e 2722), um isolado da Venezuela (TCC 2637) e três isolados da Colômbia (TCC 2826, 2829, 2839).

*5.1.1.7 Clado Mellificae*

Formado por *C. bombi*, *C. expoeki, C. mellificae* e *Lotmaria passim,* espécies isoladas de abelhas (*Bombus* sp. e *Apis mellifera*). Estes tripanossomatídeos possuem uma distribuição cosmopolita (Langridge, McGhee 1967; Lipa, Triggiani 1988; Schmid-Hempel et al., 2010; Schwarz et al., 2015).

*5.1.1.8 Clado Costarricensis*

Composto por *L. costarricensis,* isolados brasileiros TCC 169E, 356 e 504 (da Amazônia Brasileira), TCC 2547, TCC 2696 e 2750 (do Panamá). Também posicionaram-se neste clado *Herpetomonas dedonderi* e o tripanossomatídeo G775, isolado de flebotomíneo da Guatemala. Essas espécies são muito divergentes de todos os grupos descritos na subfamília Leishmaniinae (Figura 11).

Os valores que suportam os grupos, definidos com base na topologia dos dendrogramas e nas divergências de sequências de V7V8 SSUrRNA são: Fasciculata, 84%; Termófilo, 100%; Leptomonas, 80%; Acanthocephali, 100%; *C. inconstans,* 100%; Rondônia, 100%; e Costarricensis, 100%. Portanto, são suficientemente altos para corroborar o forte relacionamento intra-grupo desses grupos, exceto o grupo Mellificae, cujo valor de suporte foi inferior a 50%. O relacionamento entre esses grupos não foi bem resolvido, como esperado para análises de sequências V7V8 SSUrRNA.

O polimorfismo entre e intra-grupos foi analisado por comparação de sequências de SSUrRNA (DNA *Barcoding*). As distâncias entre os grupos variaram de 2.0% a 3.4%. O grupo Fasciculata apresentou divergência de ~2.5%, sendo um dos grupos mais heterogêneos. Estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório revelaram certa heterogeneidade no grupo Termófilo, que foi dividido em três subgrupos (T1, T2 e T3) com base em morfotipos, tamanho de minicírculos de kDNA e divergência de ~1% de sequências da região V7V8 SSUrRNA (Santos, 2004). Apesar de muito conservadas, as sequências de V7V8 SSUrRNA corroboraram os três grupos determinados anteriormente.

A similaridade entre as sequências dos grupos Acanthocephali e Rondonia foi de ~100-99%; portanto, foram os clados mais homogêneos entre os estudados. O clado Costarricencis, com divergências entre os isolados de ~1.7%, e Leptomonas, com divergências entre as sequências de V7V8 SSUrRNA ~1.8%, foram outros dois

grupos heterogêneos dentre os descritos. O grupo Mellificae apresentou divergências de ~4.7% entre as sequências V7V8 SSUrRNA, sendo o grupo mais divergente.

Portanto, V7V8 SSUrRNA é muito conservado em todas as espécies da subfamília Leishmaniinae, como já era conhecido quando da designação do grupo como "Slowly Evolving" (Merzlyak et al., 2001), embora possua grupos com distribuição cosmopolita (Figrua 10). Mesmo entre os subgêneros de *Leishmania*, as divergências máximas encontradas foram de ~1% (Tabela 7).

V7V8 SSUrRNA

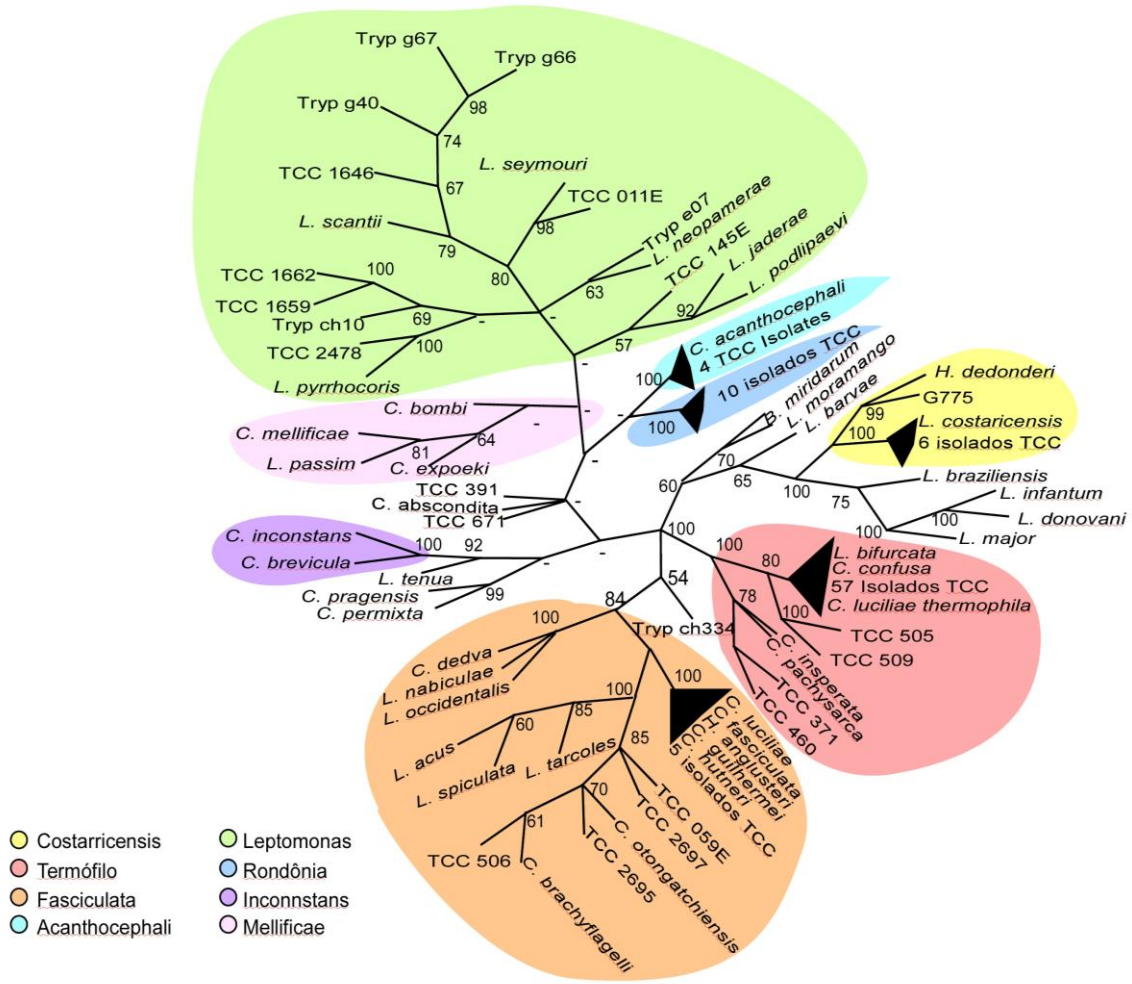



**Figura 9**- DNA *Barcoding* de tripanossomatídeos da subfamília Leishmaniinae. Dendograma baseada em sequências V7V8 SSUrDNA pelo método de Máxima Parcimônia. Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).

**Tabela 7 - Matriz de divergências das sequências da região V7V8 SSUrDNA entre os clados definidos da subfamília Leishmaniinae**

| V7V8 SSUrDNA | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Leishmania* | Paraleishmania | Costarricensis | Termófilo | Fasciculata | Leptomonas | Mellificae | Acanthocephali | Rondônia | Inconstans |
| *Leishmania* | 0,93% | | | | | | | | | |
| *Paraleishmania* | 4,05% | 0,30% | | | | | | | | |
| Costarricensis | 5,33% | 5,37% | 1,75% | | | | | | | |
| Termófilo | 6,24% | 6,73% | 6,34% | 0,32% | | | | | | |
| Fasciculata | 7,00% | 8,14% | 7,67% | 5,44% | 2,49% | | | | | |
| Leptomonas | 5,68% | 6,86% | 6,49% | 3,77% | 4,11% | 1,82% | | | | |
| Mellificae | 7,04% | 8,33% | 7,84% | 5,62% | 5,67% | 3,78% | 4,70% | | | |
| Acanthocephali | 4,95% | 6,44% | 5,47% | 2,91% | 3,59% | 1,50% | 3,44% | 0.10% | | |
| Rondônia | 5,14% | 6,34% | 5,46% | 3,76% | 4,15% | 1,95% | 3,79% | 1,23% | 0,16% | |
| Inconstans | 6,25% | 7,69% | 6,85% | 4,26% | 4,50% | 2,75% | 4,76% | 2,21% | 2,66% | 2,21% |
| | | | | | | | | | | |

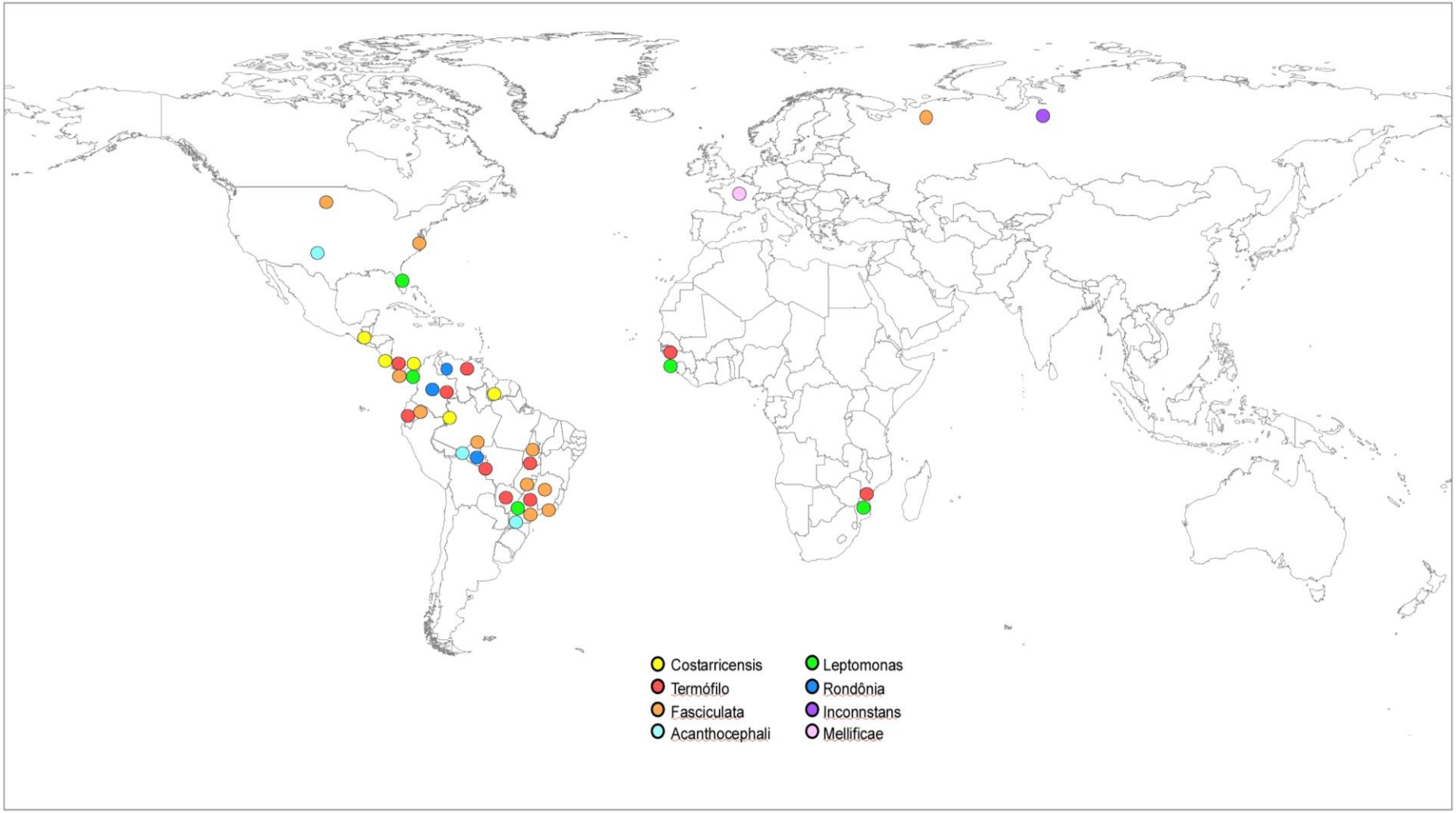



**Figura 10** – Distribuição geográfica das espécies e isolados dos clados da sufamília Leishmaniinae descritos no dendograma V7V8 SSUrRNA.

### 5.1.2 Relações filogenéticas entre os grupos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae

Sequências dos genes gGAPDH e Catepsina B-*Like* foram determinadas para tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae*,* selecionados por DNA *Barcoding*. Estas sequências foram alinhadas com sequências disponíveis no *GenBank* (Tabela 5). Árvores filogenéticas foram geradas pelos métodos de máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e Análise Bayesiana (AB). Os resultados obtidos com os dois genes corroboraram as análises baseadas em sequências de V7V8 SSUrRNA, revelando sete clados que correspondem aos grupos definidos com as análises de DNA *Barcoding*.

Com base nas análises filogenéticas de sequências isoladas ou concatenadas de V7V8 SSUrDNA e gGAPDH, os grupos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae foram divididos em três principais subclados: um clado compreende os subgrupos Acanthocephali, Inconstans, Rondônia, Leptomonas e Mellificae, além das espécies *C. permixta* e *C. pragensis*; outro subclado contém os grupos Termófilo e Fasciculata; e o terceiro subclado, mais próximo aos gêneros que abrigam tripanossomatídeos heteroxênicos (*Endotrypanum-Leishmania*), corresponde ao grupo Costarricensis (Figura 11).

Embora o relacionamento entre esses clados não esteja bem resolvido, todos são consistentes em todas as análises e os relacionamentos intra-clados bem resolvidos. Os valores de suporte obtidos para os clados Acanthocephali, Inconstans e Rondônia foram de 100% em todas as análises (MP, ML e BI); o clado Leptomonas apresentou valores de suporte de 80, 84 e 95%; o clado Fasciculata de 99, 94 e 100%; o clado Termófilo de 96, 99 e 100%; e o clado Costarricensis 100%; Mellificae 73, 62 e 91% nos três métodos utilizados.

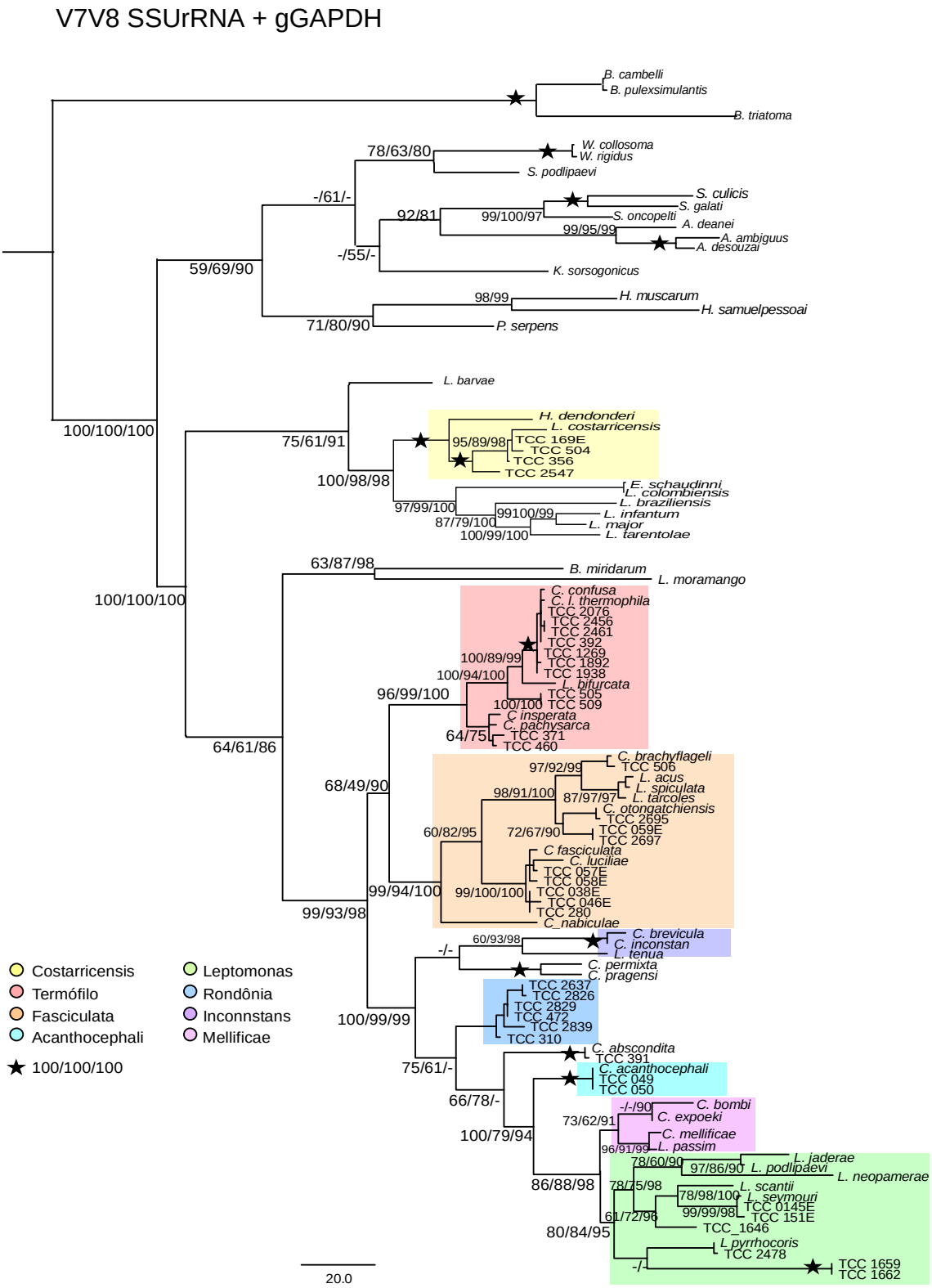



**Figura 11** - Análises filogenéticas de sequências concatenadas da região V7V8 SSUrDNA e do gene gGAPDH dos isolados e espécies da subfamília Leishmaniinae (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).

**Tabela 8 - Matriz de divergências das sequências do gene gGAPDH entre os clados definidos da subfamília Leishmaniinae**

| gGAPDH | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Leishmania* | Paraleishmania | Costarricensis | Termophila | Fasciculata | Leptomonas | Mellificae | Acanthocephali | Rondônia | Inconstans |
| *Leishmania* | 6% | | | | | | | | | |
| Paraleishmania | 8% | 3% | | | | | | | | |
| Costarricensis | 9% | 13% | 3% | | | | | | | |
| Termophila | 11% | 14% | 9% | 1% | | | | | | |
| Fasciculata | 11% | 15% | 10% | 5% | 2% | | | | | |
| Leptomonas | 13% | 16% | 11% | 7% | 8% | 5% | | | | |
| Mellificae | 11% | 15% | 11% | 6% | 6% | 6% | 5% | | | |
| Acanthocephali | 12% | 14% | 11% | 6% | 6% | 7% | 6% | 1% | | |
| Rondônia | 12% | 13% | 10% | 5% | 6% | 6% | 5% | 4% | 0% | |
| Inconstans | 12% | 15% | 12% | 7% | 7% | 9% | 8% | 8% | 7% | 5% |

**Tabela 9 - Matriz de divergências das sequências do gene CATB entre os clados definidos da subfamília Leishmaniinae**

| CATB | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Leishmania* | Paraleishmania | Costarricensis | Termófilo | Fasciculata | Leptomonas | Mellificae | Acanthocephali | Rondônia | Inconstans |
| *Leishmania* | 15% | | | | | | | | | |
| Paraleishmania | 25% | 5% | | | | | | | | |
| Costarricensis | 26% | 23% | 5.87% | | | | | | | |
| Termófilo | 27% | 23% | 16% | 3% | | | | | | |
| Fasciculata | 28% | 25% | 16% | 12% | 5% | | | | | |
| *Leptomonas* | 31% | 28% | 23% | 18% | 17% | 18% | | | | |
| Mellificae | 27% | 26% | 17% | 13% | 13% | 13% | --- | | | |
| Acanthocephali | 26% | 23% | 16% | 12% | 1% | 18% | 11% | 1% | | |
| Rondônia | 26% | 23% | 16% | 11% | 7% | 17% | 10% | 7% | 0% | |
| Inconstans | 28% | 24% | 17% | 11% | 11% | 17% | 14% | 12% | 11% | 0% |

### 5.1.3 Diversidade genética, geográfica e de hospedeiros dos tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae

#### *5.1.3.1 Clado Fasciculata*

Graus variados de diversidade genética intra-clados foram observados, observando-se, igualmente, diversidade de hospedeiros e distribuição geográfica. Contudo, clados restritos a zonas geográficas específicas apresentaram-se mais homogêneos.

O clado Fasciculata, que representa o gênero *Crithidia,* é um grupo homogêneo que inclui *C. fasciculata*, espécie tipo do gênero *Crithidia,* isolada de *Anopheles maculipennis* (Diptera, Culicidae) nos Estados Unidos (Léger 1902). Além de *C. fasciculata, stricto sensu*, foram analisados três genótipos desta espécie, também isolados de *Anopheles* sp: *C. fasciculata* nogushi, minnesota e noelli, todas também dos Estados Unidos. Posicionaram-se no mesmo subclado de *C. fasciculata* isolados de moscas Calliphoridae do Brasil *(C. luciliae*, *C. guilhermei* e *H. anglusteri)* e outros isolados de Diptera (*Anopheles scapulatus)* (TCC 057E, 058E) e de Hemiptera (TCC 278, 280) do Brasil.

Basal à *C. fasciculata* posicionou-se um clado de isolados de hemípteros, *L. tarcoles e L. spiculata* (Costa Rica), *L. acus* (Equador) e *C. brachyflagelli* (Costa Rica), e *C. otongatchiensis* de Diptera (Syrphidae) do Equador. Também posicionaram-se nesse clado os isolados brasileiros TCC 059E (*Anopheles*), TCC 506 (Hemiptera), TCC 2709 (Diptera) e os panamenhos TCC 2695 e 2697 (Hemiptera) (Figura 12). Portanto, este clado possui uma grande diversidade de hospedeiros, já que inclui insetos das ordens Hemiptera (fitófagos e predadores) e Diptera (Calliphoridae, Culicidae e Syrphiridae). Igualmente possui uma distribuição, até o momento, predominantemente nas Américas. A maioria dos isolados é da América do Sul e apenas *C. fasciculata* foi isolada na América do Norte.

Duas espécies de *Leptomonas* (*L. nabiculae* e *L. occidentalis*) foram posicionadas como as mais basais do grande clado formado por todas as espécies acima mencionadas (Figura 12).

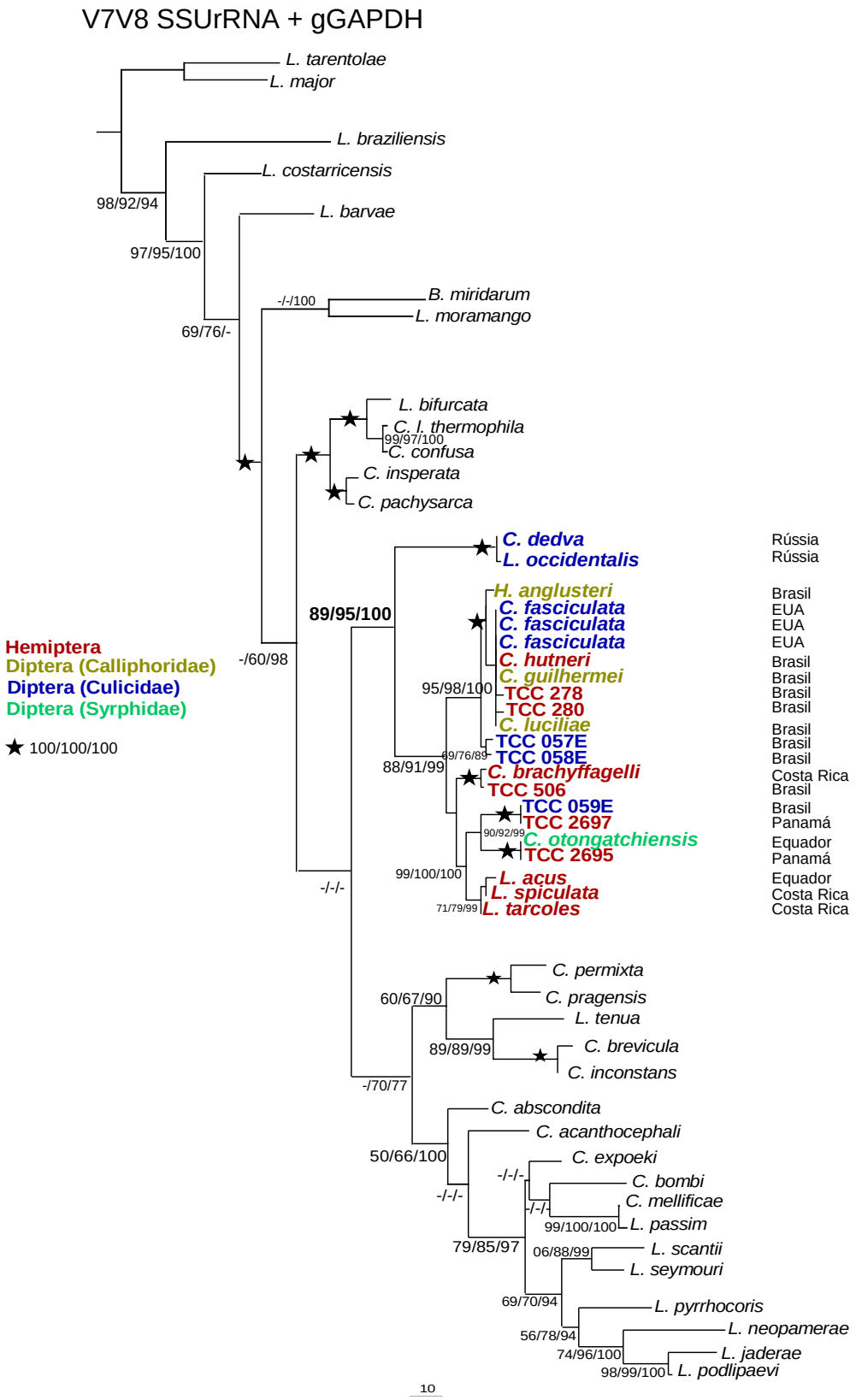
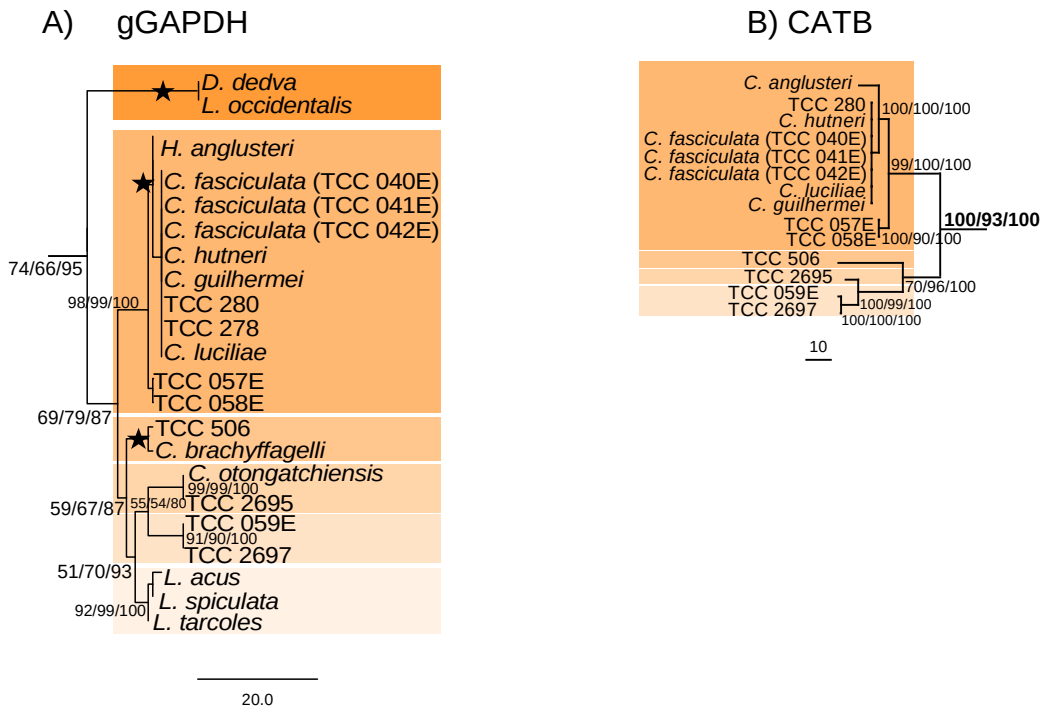



**Figura 12** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenética de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados e espécies do Clado Fasiculata (MP, ML e Bayesiana). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).




**C)**

gGAPDH

| | Fasciculata | Brachyflagely | Octogatchiensis | tarcoles, acus, spiculata |
|---|---|---|---|---|
| Fasciculata | 0,7% | | | |
| Brachyflagely | 3,2% | 0,5% | | |
| Octogatchiensis | 3,4% | 2,7% | 1,6% | |
| tarcoles, acus, spiculata | 3,0% | 2,0% | 2,2% | 0,5% |

CATB

| | *C. fasciculata* | *C. brachyflageli* | *C. octogatchiensis* |
|---|---|---|---|
| *C. fasciculata* | 0,9% | | |
| *C. brachyflageli* | 10,1% | 0,0% | |
| *C. octogatchiensis* | 9,2% | 7,7% | 1,2% |

**Figura 13** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e isolados do Clado Fasciculata. **A)** Árvore filogenética baseada em sequências do gene gGAPDH. **B)** Árvore filogenéticas baseada em sequências do gene Catepsina B-*Like*.**C)** Taxas de divergência das sequências dos genes cGAPDH e Catepsina B-*Like*.

Com base nos resultados das análises filogenéticas realizadas neste estudo, propõe-se que o clado Fasciculata seja o clado do gênero *Crithidia.* Portanto, as espécies de *Leptomonas* nele posicionadas devem ser reclassificadas (*C. acus, C. tarcoles* e *C. spiculata*). Igualmente, para todas as espécies de *Crithidia* que se posicionam fora deste clado (*C. acanthocephali, C. permixta, C. pragensis, C. bombi,*

*C. mellifica* e *C. expoeki*) será necessária uma revisão taxonômica destes organismos com a finalidade de reclassificá-los em novos gêneros.

No clado Fasciculata, as divergências entre todas as espécies/isolados foram de ~2% entre as sequências de gGAPDH e de ~5% entre as de Catepsina B-*Like* (Figura 13).

Uma vez definido um clado que pode ser validado como gênero *Crithidia*, contendo *C. fasciculata* e bem suportado em todas as análises, passamos a analisar as divergências intra-clado, baseadas em sequência dos dois genes mais polimórficos e que geraram filogenias congruentes, a fim de definir o número de espécies válidas nesse gênero. As análises realizadas com os genes isolados e as divergências entre os isolados baseadas nesses genes estão apresentadas abaixo. Foram consideradas válidas as espécies que apresentam divergências de sequências a partir de ~1.5% quando comparadas a *C. fasciculata.* Portanto, as espécies definidas são: *C. fasciculata, C. brachyflagelli* e *C. otongatchiensis.* Os isolados TCC 059E e 2597 são candidatos a uma nova espécie de *Crithidia*.

*5.1.3.2 Clado Termófilo*

O clado Termófilo foi muito bem apoiado em todas as filogenias baseadas nos genes gGAPDH e Catepsina B-*Like,* e todas as análises corroboraram sua divisão em três subgrupos: T1, T2 e T3. No primeiro, posicionaram-se junto a *Crithidia luciliae thermophila* (espécie-tipo) 58 isolados TCC, dos quais 29 foram obtidos de hemípteros, tanto predadores quanto fitófagos, de Moçambique, Guiné Bissau, Colômbia, Panamá, Venezuela e Brasil. Os outros 29 isolados foram obtidos de moscas (Calliphoridae) do Brasil, Colômbia, Guiné Bissau e Moçambique. *Leptomonas bifurcata e Crithidia confusa,* de hemípteros fitófagos da Costa Rica (Jirkú et al., 2012; Yurchenko et al., 2008) também foram posicionadas no subgrupo T1. No clado T2, foram agrupados os isolados brasileiros TCC 371 e 460, junto com *C. insperata* (Equador) e *C. pachysarca* (Costa Rica) (Votýpka et al., 2012b; Yurchenko et al., 2009), sendo todos isolados de hemípteros fitófagos. O subgrupo T3 foi composto apenas pelos isolados TCC 505 e 509, de hemípteros predadores do Brasil (Figura 14).

O clado Termófilo apresenta ampla distribuição geográfica, compreendendo isolados da África (oeste e leste) e Américas Central e do Sul e também uma

variedade de hospedeiros de várias famílias de Hemiptera (fitófagos e predadores) e Diptera (Calliphoridae). Uma característica dos isolados desse clado é a capacidade de crescer em cultivos contínuos a 37 ˚C, enquanto a maioria dos tripanossomatidoes monoxênicos não pode ser mantida nessa temperatura (Roitman 1972, 1977).

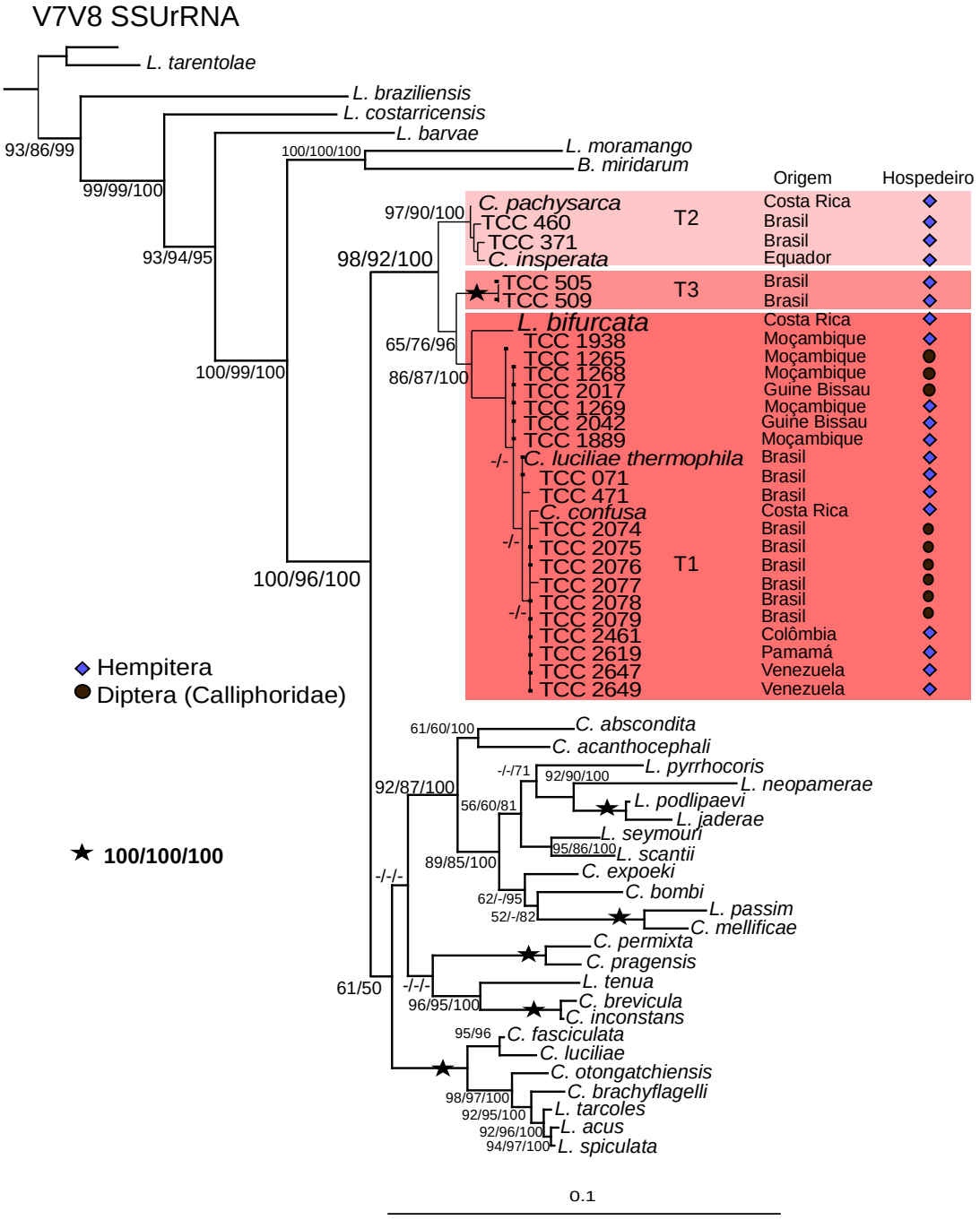
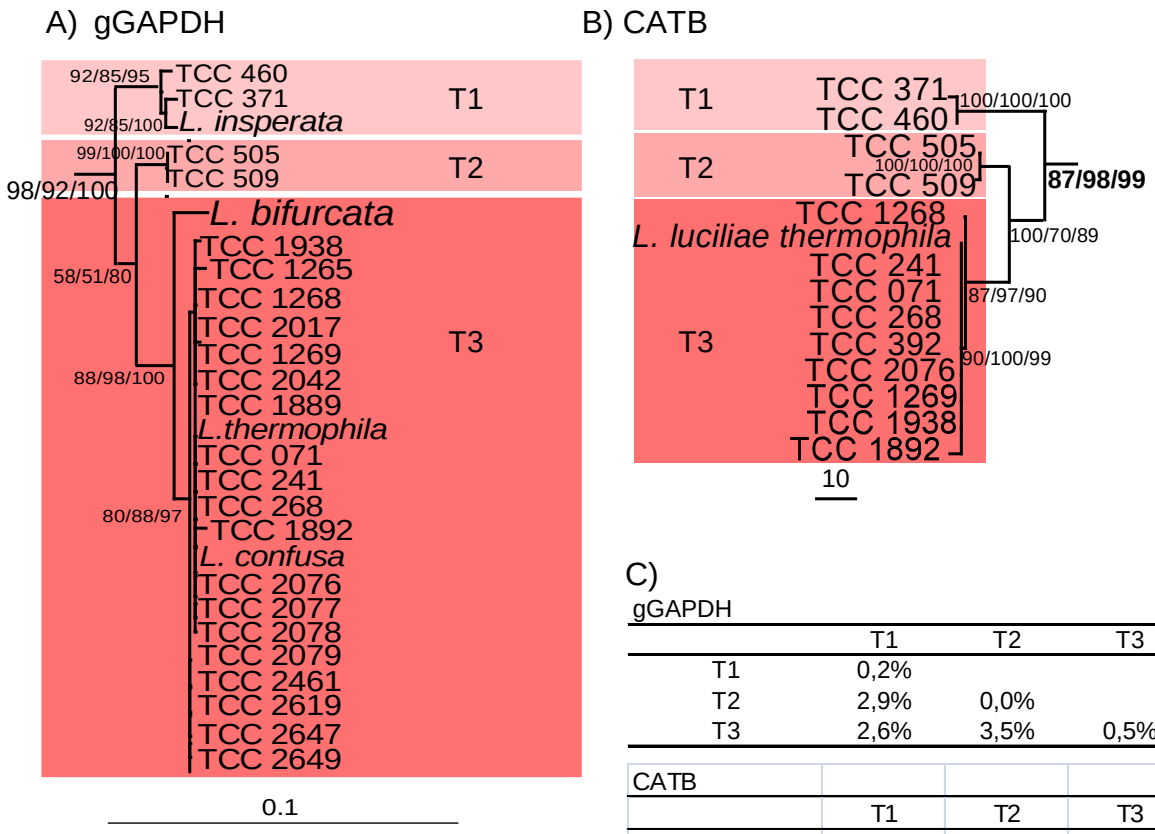



**Figura 14** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenética de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados e espécies do Clado Termófilo (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).




C)

gGAPDH

| | T1 | T2 | T3 |
|---|---|---|---|
| T1 | 0,2% | | |
| T2 | 2,9% | 0,0% | |
| T3 | 2,6% | 3,5% | 0,5% |

CATB

| | T1 | T2 | T3 |
|---|---|---|---|
| T1 | 0,0% | | |
| T2 | 6,4% | 0,3% | |
| T3 | 3,1% | 5,7% | 0,2% |

**Figura 15** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e isolados do Clado Termófilo proposto como gênero *Legeria.* **A)** Árvore filogenética baseada em sequências do gene gGAPDH. **B)** Árvore filogenética baseada em sequências do gene Catepsina B-*Like.***C)** Taxas de divergência das sequências dos genes gGAPDH e Catepsina B-*Like.*

A presença no clado Termófilo de isolados classificados nos gêneros *Crithidia* e *Leptomonas* corrobora a necessidade de revisar taxonomicamente este grupo. Neste estudo foi proposta a classificação taxonômica do clado Termófilo no gênero *Legeria* (Figura 15).

A análise das sequências de gGAPDH do novo gênero *Legeria* revelou divergência de ~3% entre T1 e T2 e porcentagem similar entre T1 e T3. Para as sequências de Catepsina B, a divergência foi de ~3% entre T1 e T3 e de ~6% entre T1 e T2 (Figura 15). As espécies do clado Termófilo foram separadas por ~58% de divergência de ITS1rDNA. Foram consideradas espécies válidas para cada grupo: T1 = *Legeria .luciliae thermophila*; T2 = *L. insperata*; T3 = isolados TCC 505 e 509, candidatos a nova espécie.

*5.1.3.3 Clado Leptomonas*

O clado Leptomonas corresponde a um grupo monofilético que compreende *L. seymouri* (espécie-tipo), *L. jaderae, L. neopamarae, L. podlipaevi, L. scantii e L. pyrrochoris.* Neste estudo, foram posicionados nesse clado 25 isolados de hemípteros do Brasil, Moçambique, Guiné Bissau e Panamá.

*L. seymouri* (Hemiptera do EUA) posicionou-se com outros dois isolados do Brasil (TCC 151E e TCC 065) e com *L. scantii* (Costa Rica), o que limita esse grupo às Américas. *L. pyrrhocoris*, de hemípteros da família Pyrrhocoridae (gêneros *Pyrrhocoris, Scantius* e *Dysdercus*) (Votýpka et al., 2012a), agrupou com 10 isolados de hemípteros da família Pentatomidae (gêneros *Loza* e *Nesara*) do Brasil, Moçambique, Guiné Bissau e Panamá. Portanto, a diversidade de hospedeiros de *L. pyrrhocoris*, amplamente distribuída geograficamente, é maior que a relatada na literatura (Votýpka et al., 2012a). O clado Leptomonas compreende outros três grupos homogêneos, dois formados por isolados exclusivos de Moçambique e um exclusivo de isolados brasileiros. Por último, o clado formado pelas espécies *L. podlipaevi - L. jaderae* não agrupa com nenhum isolado TCC (Figura16).

No clado *Leptomonas,* a divergência entre as sequências de gGAPDH e Catepsina B-*Like* é de ~5 e ~19%, respectivamente, sendo que a análise de ITS1rDNA indicou similaridade de ~63% (Figura 17). Apesar da ampla distribuição geográfica e diversidade genética, os isolados são restritos a hemípteros fitófagos e formam um clado monofilético com pelo menos seis subclados. O fato de *Leptomonas* compreender espécies que se posicionam em outros clados demonstra a necessidade de uma revisão taxonômica do gênero. Com base nos dados de filogenia molecular obtidos neste estudo, é proposto que este clado seja considerado o gênero *Leptomonas*. Para as espécies de *Leptomonas* posicionadas fora deste clado, torna-se necessária uma revisão taxonômica e sua reclassificação.

Em nossas análises, o grupo Mellificae, composto por *C. bombi*, *C. expoeki, C. mellificae* e *Lotmaria passim,* espécies isoladas de abelhas (*Bombus* sp. e *Apis mellifera*), posicionaram-se em um clado monofilético irmão do clado Leptomonas, com valores de suporte de 88, 86 e 98% nos três métodos filogenéticos utilizados (Figura 16).

V7V8 SSurRNA + gGAPDH

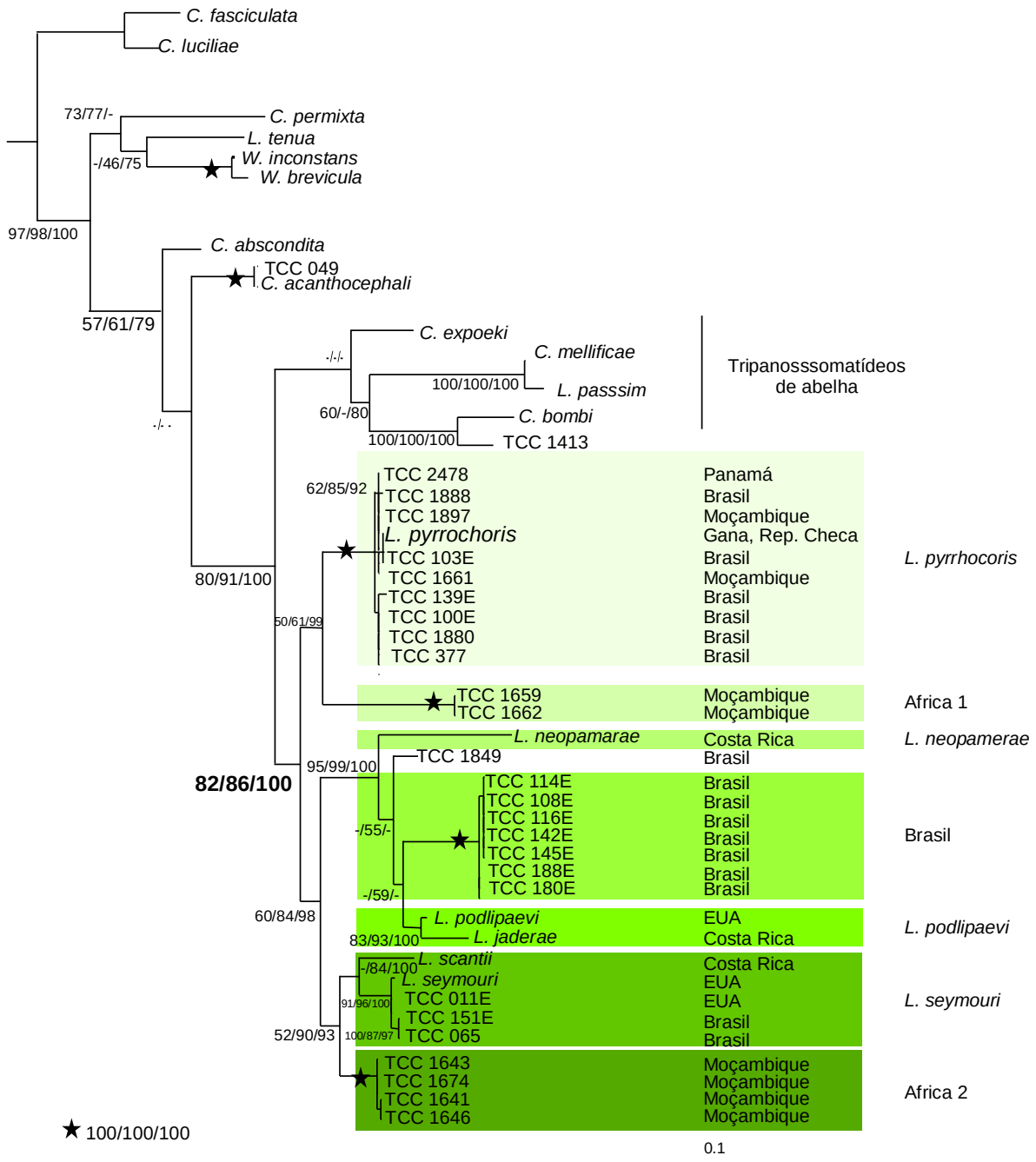
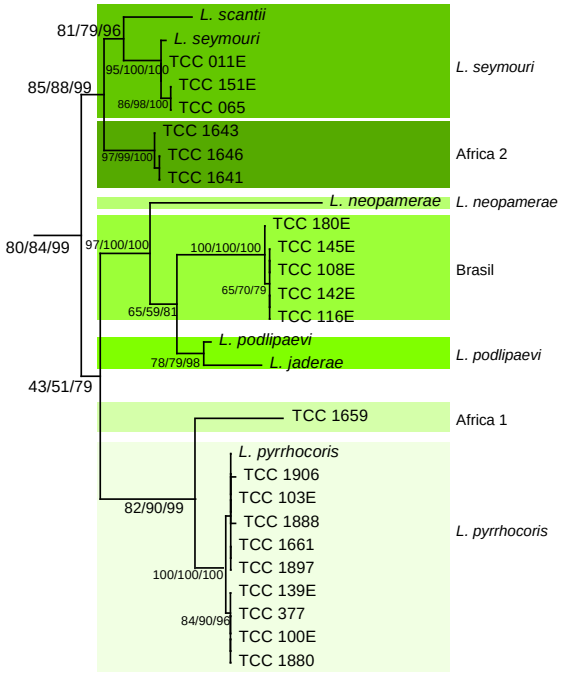
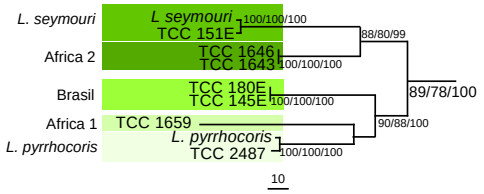



**Figura 16** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenética de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados e espécies do Clado Leptomonas (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).

**A) gGAPDH**




**B) CATB**




**C)**

gGAPDH

| | *L. pyrrhocoris* | Africa 1 | *L. neopamerae* | Brasil | *L. seymouri* | *L. jaderae, L. podlipaevi* | Africa 2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *L. pyrrhocoris* | 1% | | | | | | |
| Africa 1 | 6% | 0% | | | | | |
| *L. neopamerae* | 7% | 9% | 0% | | | | |
| Brasil | 5% | 7% | 7% | 2% | | | |
| *L. seymouri* | 5% | 7% | 7% | 5% | 1% | | |
| *L. jaderae, L. podlipaevi* | 6% | 8% | 6% | 4% | 5% | 2% | |
| Africa 2 | 4% | 6% | 7% | 4% | 3% | 5% | 0% |

CATB

| | *L. pyrrhocoris* | Africa 1 | Brasil | *L. seymouri* | Africa 2 |
|---|---|---|---|---|---|
| *L. pyrrhocoris* | 1% | | | | |
| Africa 1 | 18% | 0% | | | |
| Brasil | 19% | 22% | 0% | | |
| *L. seymouri* | 19% | 23% | 21% | 1% | |
| Africa 2 | 17% | 20% | 17% | 17% | 0% |

**Figura 17** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e isolados do Clado Leptomonas. **A)** Árvore filogenética baseada em sequências do gene gGAPDH. **B)** Árvore filogenéticas baseada em sequências do gene Catepsina B-*Like.* **C)** Taxas de divergência das sequências dos genes gGAPDH e Catepsina B-*Like*.

*5.1.3.4 Clado Acanthocephali, Inconstans e Rondônia*

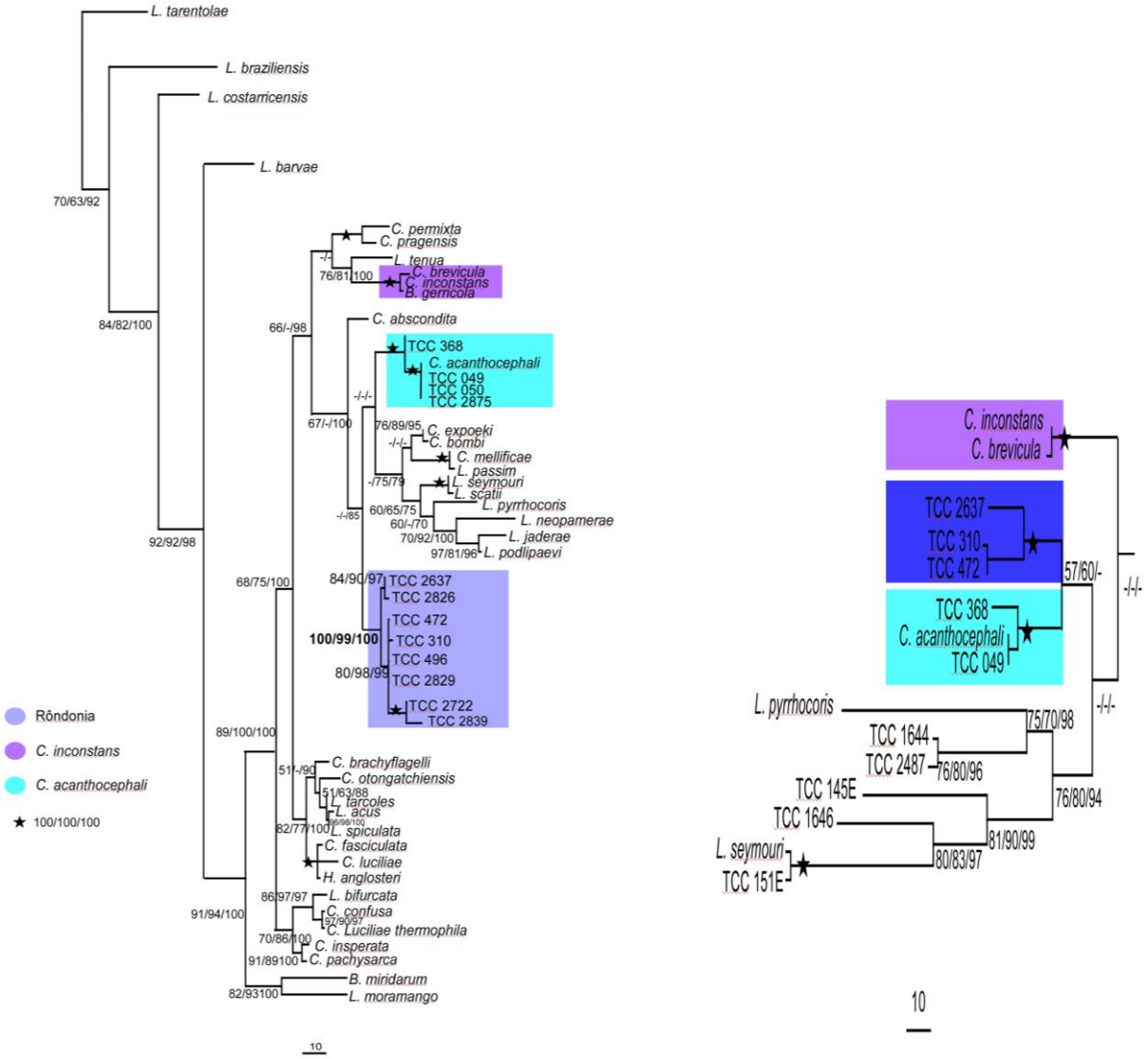
Os clados Acanthocephali, Inconstans e Rondônia são todos ainda formados por um pequeno número de isolados, que apresentaram a menor diversidade intra-clados tanto quanto à distribuição geográfica dos isolados, como em relação aos hospedeiros de origem, o que refletiu em menor divergência entre as sequências de todos os genes estudados. Para os três grupos, a similaridade intra-clado entre as sequências de gGAPDH e de Catepsina B foi de 99 e 98,5%, respectivamente (Figura 18). Entretanto, as divergências entre os três clados são bastante significativas, assim como entre esses clados e os definidos como *Crithidia* e *Legeria*. De acordo com o posicionamento nas filogenias e divergências entre esses clados e os já atribuídos aos gêneros *Crithidia* e *Legeria*, os clados Acanthocephali, Inconstans e Rondônia são candidatos a novos gêneros.

O clado Acanthocephali, formado por isolados de hemípteros brasileiros, contém *Crithidia acanthocephali* e três isolados, TCC 049, 50 e 275, idênticos entre si, além de um isolado ~1% divergente (TCC 368). *C. acanthocephali* foi originalmente classificada no gênero *Crithidia* com base em marcadores morfológicos. Contudo, posicionou-se distante de *C. fasciculata*, espécie-tipo do gênero *Crithidia*, o que indica a necessidade de uma revisão taxonômica e sua reclassificação (Figura 18).

O clado Inconstans compreende três espécies classificadas anteriormente como *Wallaceina* e que foram reclassificadas no gênero *Crithidia: C. inconstans, C. brevicula, C. podlipaevi*todas, de hemípteros da Rússia (Votýpka et al., 2012b; Yurchenko et al., 2014;). A espécie *L. tenua,* isolada de *Monopsyllus sciurorum* (Siphonaptera) na República Checa, é a espécie mais relacionada com este clado (Figura 18). De acordo com nossas análises, Wallaceina pode ser revalidado, sendo necessário apenas redefinir as características morfológicas do gênero como descrito originalmente (Merzlyak et al 2001).

O clado Rondônia, formado por seis isolados brasileiros (TCC 310, 338, 388, 472, 496, 2722), um isolado da Venezuela (TCC 2637), todos obtidos de hemípteros predadores ou fitófagos, além de 3 isolados da Colômbia, (TCC 2826, 2829, 2839), dois de hemípteros fitófagos e um de mosca. Todos os isolados desse clado são iguais, exceto os isolados TCC 2722 e 2839 que divergem ~3.5%. Portanto esse clado pode ser nomeado como um novo gênero contendo duas espécies (Figura 18).

V7V8 SSUrRNA + gGAPDH




**C)**

| gGAPDH | | | |
|---|---|---|---|
| | Acanthocephali | Rondonia | Inconstans |
| Acanthocephali | 1% | | |
| Rondonia | 4% | 1% | |
| Inconstans | 8% | 7% | 2% |
| | | | |

| CATB | | | |
|---|---|---|---|
| | Acanthocephali | Rondônia | Inconstans |
| Acanthocephali | 0% | | |
| Rondônia | 8% | 0% | |
| Inconstans | 12% | 13% | 0% |
| | | | |

**Figura 18** – **(A)** Análises filogenéticas dos isolados e espécies dos clados Acanthocephali, Rondônia e *C. inconstans* de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA (MP, ML e BA). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-). **(B)** Árvore filogenéticas baseada em sequênciasdo gene Catepsina B-*Like.* **(C)** Taxas de divergência das sequências dos genes gGAPDH e Catepsina B-*Like*.

*5.1.3.5 Clado Costarricensis*

O clado Costarricensis compreende dois subclados, o primeiro formado por *Leptomonas costarricensis* (espécie tipo), da Costa Rica (Yurchenko et al., 2006b), isolados do Brasil (TCC 169E, 356 e 504) e os isolados TCC 2696 e 2750 do Panamá, todos de Hemiptera (predadores). Basal a esse grupo posicionou-se um isolado do Panamá, TCC 2547, também de predador. Como grupo irmão foram posicionados o tripanossomatídeo G775 (apenas SSUrRNA), isolado de flebotomíneo da Guatemala (Noyes et al., 1997), e *Herpetomonas dedonderi*, de *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), da Guiana Francesa (Figura 19).

*L. costarricensis* e os isolados TCC169E, 356, 504 (do Brasil) e 2696 e 2750 (do Panamá) possuem ~99% de similaridade nas sequências de V7V8 SSUrRNA e ~98% nas de gGAPDH e Catepsina B. Por outro lado, a maior porcentagem de divergência observada entre *L. costarricencis* e o isolado TCC 2547 (~3% para o gene gGAPDH e ~9% para Catepsina B) coloca este isolado como candidato a uma nova espécie do clado (Figura 20). Por último, a similaridade entre as sequências V7V8 SSUrRNA de *H. dedonderi* e do tripanossomatídeo G775 foi de 100%.

A divergência média entre os dois subclados do clado Costarricensis foi de ~2.0 e ~6.0% nas sequências de gGAPDH e Catepsina B, respectivamente. Esse clado foi confirmado como o mais relacionado com os membros dos gêneros *Endotrypanum* (~4.0%, 10% e ~22% de divergência para V7V8 SSUrRNA, gGAPDH e Catepsina B, respectivamente) e *Leishmania* (~5.0%, 12% e ~25% para os mesmos marcadores).

O Clado Costarricensis compreende isolados da América Central, Guiana Francesa, Panamá e Amazônia brasileira. Quanto à diversidade de hospedeiro de origem, este é o único grupo de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leshmaniinae no qual um flebotomíneo aparece como hospedeiro, como é o caso do tripanossomatídeo G775. *L. costarricensis* está mais relacionada com os gêneros heteroxênicos (*Endotrypanum-Leishmania*) do que com *L. seymouri,* confirmando a necessidade de reclassificação desta espécie com a criação de um novo gênero com pelo menos três espécies.

V7V8 SSUrRNA + gGAPDH

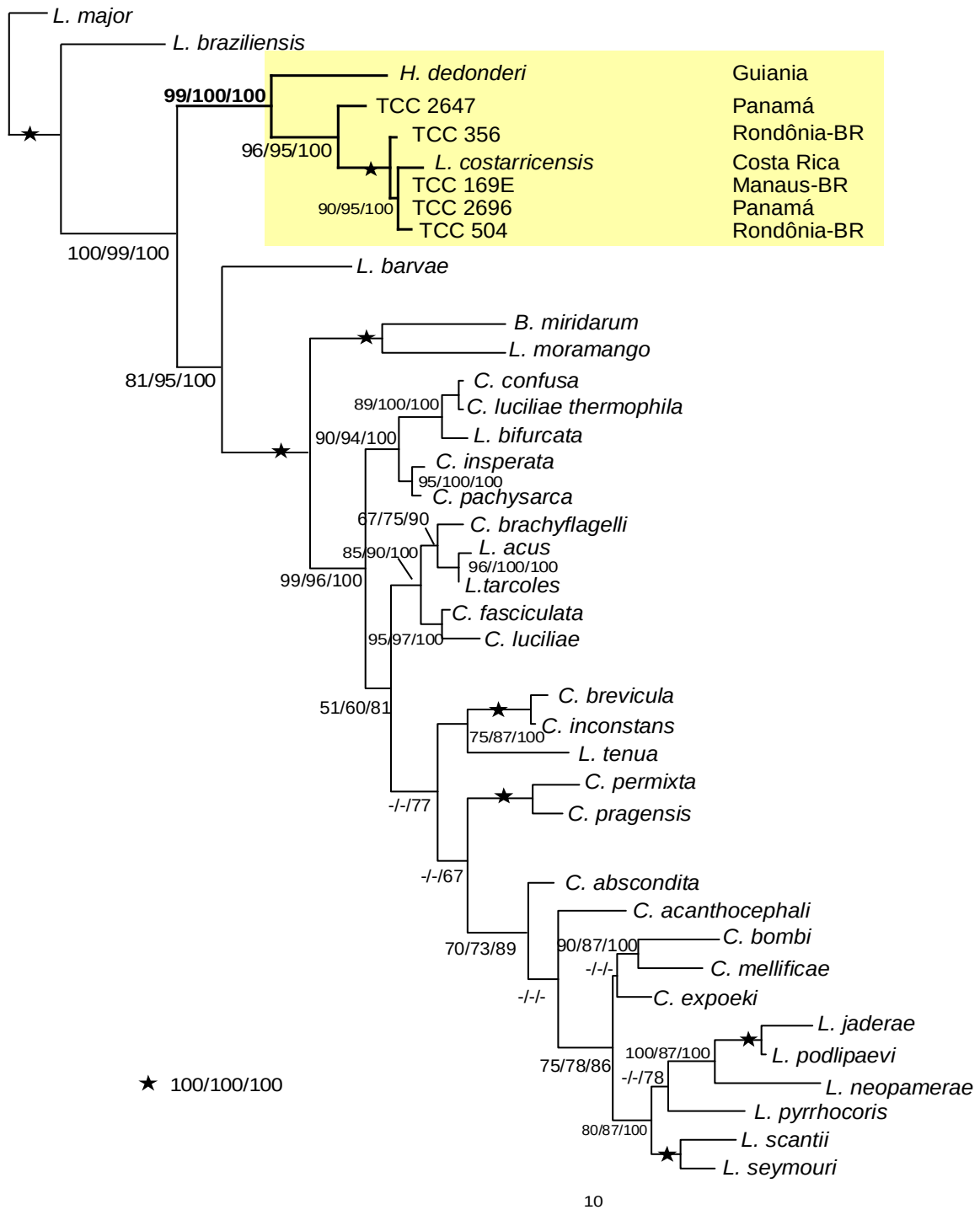
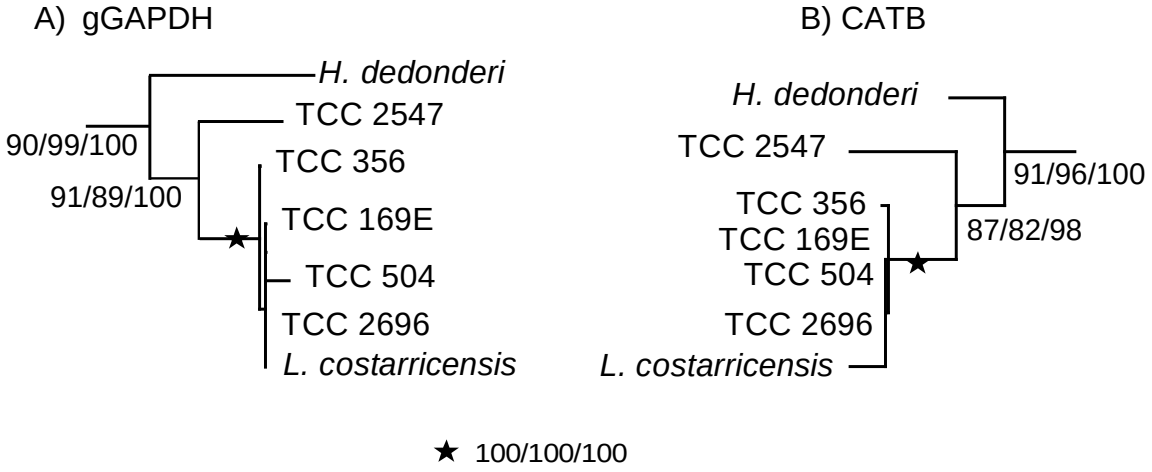



**Figura 19** - Distribuição geográfica e análises filogenética de sequências concatenadas gGAPDH e V7V8 SSUrDNA dos isolados e espécies do Clado Costarricensis (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).




C)

gGAPDH

| | *H. dedonderi* | *L. costarrisensis* | TCC 169E | TCC 504 | TCC 356 | TCC 2457 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *H. dedonderi* | | | | | | |
| *L. costarrisensis* | 6,42 | | | | | |
| TCC 169E | 4,61 | 2,55 | | | | |
| TCC 504 | 4,85 | 2,67 | 0,24 | | | |
| TCC 356 | 4,48 | 2,79 | 0,12 | 0,36 | | |
| TCC 2457 | 5,21 | 3,27 | 3,39 | 3,64 | 3,27 | |

CATB

| | *H. dedonderi* | *L. costarricensis* | TCC 169E | TCC 356 | TCC 504 | TCC 2547 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *H. dedonderi* | | | | | | |
| *L. costarricensis* | 8,11 | | | | | |
| TCC 169E | 8,11 | 0 | | | | |
| TCC 356 | 8,11 | 0,48 | 0,48 | | | |
| TCC 504 | 9,54 | 1,75 | 1,75 | 2,23 | | |
| TCC 2547 | 9,17 | 8,06 | 8,06 | 8,22 | 9,81 | |

**Figura 20** - Análises filogenéticas dos genes gGAPDH e CATB de espécies e isolados do Clado Costarrcensis. **A)** Árvore filogenética baseada em sequências do gene gGAPDH. **B)** Árvore filogenéticas baseada em sequências do gene Catepsina B-*Like.* **C)** Taxas de divergência das sequências dos genes cGAPDH e Catepsina B-*Like*.

### 5.1.4 Análises filogenéticas baseadas em dados multigênicos

Com a finalidade de melhor resolver o relacionamento filogenético entre os clados de tripanossomatídeos monoxênicos e suas relações com os gêneros heteroxênicos foi realizada uma análise multigênica, concatenando as sequências da região V7V8 SSUrRNA e dos genes gGAPDH e Catepsina B-*Like* (Figura 21). A

árvore obtida sugere a segregação das espécies e isolados que compõe a subfamília Leishmaniinae em dois subclados, ambos com suporte de 100%, nos três métodos filogenéticos empregados.

No primeiro subclado posicionaram-se, em um agrupamento monofilético, as espécies dos gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum*. Basal ao subclado *Leishmania-Endotrypanum* posicionaram-se as espécies do grupo Costarricensis. Este resultado confirma, mais uma vez, que *Leptomonas costarricensis* é a espécie monoxênica mais próxima dos tripanossomatídeos heteroxênicos da subfamília Leishmaniinae (Yurchenko et al., 2016b).

No segundo subclado posicionaram-se todas as espécies de *Crithidia* e as demais espécies de *Leptomonas* que formam a subfamília Leishmaniinae. Este segundo grupo, por sua vez, apresenta dois grupos: um contendo as espécies e isolados do grupo Termófilo e outro que reúne as espécies e isolados dos clados Fasciculata, Inconstans, Rondônia, Acanthocephali, Mellificae e Leptomonas. Embora os valores que suportam o relacionamento entre estes clados não sejam suficientes para estabelecer relações entre eles, nesta análise podemos observar que as espécies do clado Fasciculata são as mais divergentes. Por outro lado, os grupos homogêneos Rondônia e Acanthocephali (todos de Hemiptera da América do Sul) formam um clado monofilético (Acan-Ro) com 95 (MP), 91 (ML) e 100 (AB) % de valores de suporte. Por sua vez, o clado Acanto-Rond posiciona-se de forma basal ao clado formado por *C. mellificae* e Leptomonas. O estreito relacionamento entre Leptomonas e *C. mellificae,* único representante do clado de parasitas de abelhas, atualmente classificados como *Crithidia e Lotmaria,* foi confirmado novamente nestas análises multigênicas, com suportes de 100 e 79% (MP, ML) (Langridge, McGhee 1967; Lipa, Triggiani 1988; Schmid-Hempel et al., 2010; Schwarz et al., 2015).

A análise multigênica realizada no presente estudo foi a primeira a utilizar o gene de Catepsina B-*Like* como marcador molecular e a incluir todos os grupos que compõem a subfamília Leishmaniinae. Os resultados das análises corroboram a topologia das árvores filogenéticas obtidas nas análises de genes isolados ou concatenados de SSUrRNA e gGAPDH. Além disso, essas análises resultaram em topologias mais resolvidas, com valores maiores de suporte para os diversos clados, contribuindo bastante para entender o relacionamento entre os grupos de

tripanossomatídeos de insetos da subfamília Leishmaniinae, principalmente entre os clados Rondônia, Acanthocephali, Leptomonas e Mellificae.

V7V8 SSUrRNA + gGAPDH + CATB

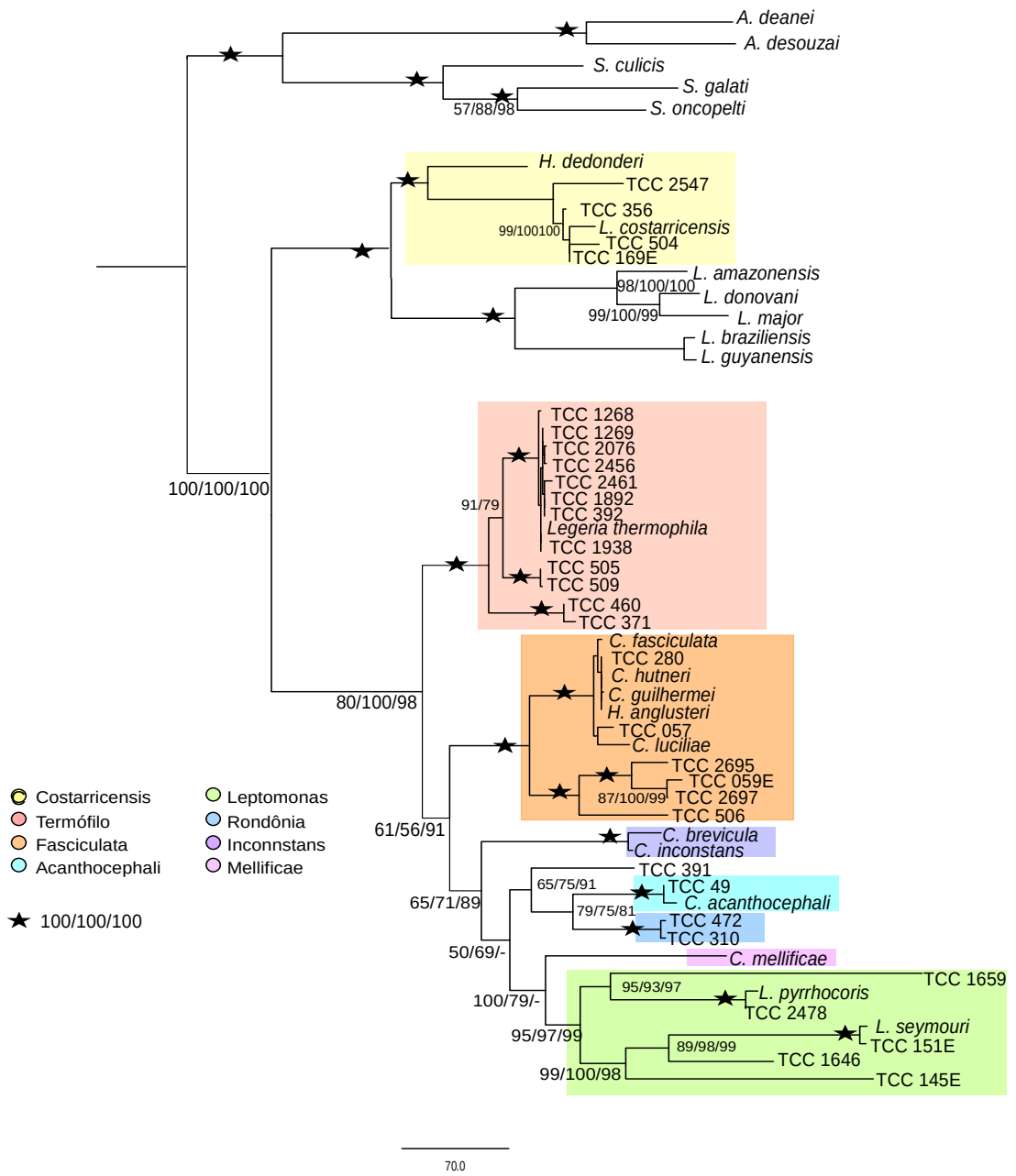



**Figura 21** - Análises filogenéticas de sequências concatenadas da região V7V8 SSUrDNA e dos genes gGAPDH e CATB dos isolados e espécies da subfamília Leishmaniinae (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-).

## 5.2 Diversidade de isolados classificados no gênero *Endotrypanum* e relações filogenéticas com espécies de leishmânias "enigmáticas"

Estudos moleculares prévios demonstraram que algumas espécies do gênero *Leishmania* denominadas "enigmáticas", porque não agrupam com as espécies classificadas como Euleishmania e apresentam diversos aspectos em relação a hospedeiros, vetores, distribuição geográfica e capacidade de infectar o homem, são mais relacionadas com espécies do gênero *Endotrypanum,* com ele formando um grupo polifilético denominado Paraleishmania (Croan et al., 1997; Cupolillo et al., 1998, 2000). A correta classificação desses organismos é fundamental para a compreensão da evolução do gênero *Leishmania* e dos tripanossomatídeos em geral (Lukes et al., 2007; Marcili et al., 2014; Noyes, et al., 1997; Van der Auwera, Dujardin, 2015).

### 5.2.1 *Barcoding* dos isolados de *Endotrypanum* e leishmânias enigmáticas relacionadas do grupo Paraleishmania

Nesse estudo, foram caracterizados isolados-referência de *E. schaudinni* e *E. monterogeii,* além de novos isolados classificados nesse gênero com base em padrões de isoenzimas: 6 de preguiça (*Choloepus hoffmani, Choloepus didactylus e Bradypus infuscatus*) e 3 de flebotomíneos (*Lutzomyia gomezi* e *Psathyromyia dendrophyla)*.

Foram analisadas, também nesse estudo, as sequências de V7V8 SSUrRNA de todas espécies disponíveis de leishmania que não se posicionam no grupo Euleishmania. Das espécies analisadas, *L. equatorensis, L. colombiensis, L. herreri, L. hertigi e L. deanei* se revelaram relacionadas com isolados de *Endotrypanum,* inclusive as espécies-referência *E. schaudinni e E. monterogeii,* formando um clado com 3 grupos principais. Todos os organismos desse clado se revelaram muito relacionados, compartilhando sequências muito conservadas, divergência máxima de apenas ~2.8% entre *E. schaudinni* e *L. hertigi*.

### 5.2.2 Relações filogenéticas entre isolados de *Endotrypanum* e leishmânias enigmáticas do grupo Paraleishmania

Com a finalidade de resolver o relacionamento entre *Endotrypanum* e as leishmânias enigmáticas do grupo Paraleishmania, foram sequenciados os genes gGAPDH, HSP70 e CATB das espécies-referência, *E. schaudinni* e *E. monterogeii,* além de novos isolados de preguiça e flebotomíneo classificados nesse gênero. Sequências de *L. herreri, L. hertigi, L. deanei, L. colombiensis e L. equatorensis* (Zeledón et al., 1979; Kreutzer et al., 1991; Grimaldi et al., 1992), assim como de espécies do *complexo L. enriettii* e dos subgêneros *L. (Viannia), L. (Leishmania)* e *L. (Sauroleishmania)* foram incluídas nos alinhamentos. *Leishmania costarricensis* foi utilizada como outgroup. Nas análises filogenéticas inferidas, esses organismos formaram um grupo monofilético, com alto valor de suporte (100%) nos três métodos utilizados (Figura 22).

Em todas as análises, utilizando os genes isoladamente ou concatenados, foram observados três clados principais (100% de suporte).

O grupo monofilético contendo a maioria dos isolados, *L. herreri, L. equatorensis, Endotrypanum* e *L. colombiensis* (Zeledón et al., 1979; Kreutzer et al., 1991; Grimaldi et al., 1992) foi dividido em dois subclados (100% de suporte): *L. herreri* e *Endotrypanum*, separados por divergências de ~2%, ~4% e ~5% nas sequências dos genes HSP70, gGAPDH e Catepsina B-*Like*, respectivamente.

O subclado *L. herreri* agrupou apenas *L. herreri* (espécie-referência, isolado de preguiça da Costa Rica) com os isolados TCC889 e 890 (de flebotomíneos do Estado do Amazonas, Brasil) e os isolados TCC225 *(Choloepus didactylus),* 230, 231 e 239 (*Choloepus hoffmani*), todos do Pará, Brasil, com novos isolados de preguiças e flebotomíneos do Brasil (Pará e Amazonas, Manaus). Este grupo foi suportado com valores de 97, 97 e 100% (respectivamente, métodos de Parcimônia, ML e AB). Os organismos do grupo *L. herreri* apresentaram similaridade de ~99% tanto para gGAPDH quanto para HSP70, e de ~98% para CATB. Até o momento, *L. herreri* havia sido descrita somente na América Central, de forma que os isolados brasileiros caracterizados nesse estudo correspondem à primeira descrição dessa espécie no Brasil.

O subclado Equatorensis agrupou com altos valores de suporte (98, 99, 100%, Parcimônia, ML, AB, respectivamente) *L. colombiensis* (isolados de paciente

da Venezuela e de *Lutzomyia gomezi* do Panamá) e todos os isolados de *Endotrypanum,* TCC 226 (preguiça, *Bradypus infuscatus,* Panamá), TCC 102 (*Psanthyromya dendrophyla,* Rondônia, Brasil), além das espécies-referência *E. monterogeii* (Costa Rica, *C. hoffmani*) e *E. schaudinni* (Panamá, *C. hoffmani*). A similaridade entre as sequências foi de 100% para os genes gGAPDH e HSP70 e de 99% para os genes CATB. *Leishmania equatorensis* (de *Sciurus granatensis* - esquilo - e *Choloepus hoffmani* do Equador) foi posicionada na base do subclado.

Os resultados desse estudo, que incluiu um número muito maior de isolados do que nos estudos anteriores (Asato et al., 2009; Croan et al., 1996, 1997; Cupolillo et al; 1998; Dougall et al., 2011), confirmaram o estreito relacionamento entre *Endotrypanum* e *L. colombiensis,* agente etiológico de raros casos de leishmanioses cutânea e visceral em humanos (Kreutzer, et al., 1991; Rodriguez-Bonfante, et al., 2003), assim como *L. equatorensis*. Entretanto, *L. herreri* resolveu como um grupo irmão desse clado, até o momento restrito a isolados de preguiças e flebotomíneos (Figura 22).

O clado mais basal do grupo Paraleishmania foi composto apenas por parasitas de porco espinho, *L. hertigi* do Panamá e *L. deanei* do Brasil, com valores de suporte de 100% em todas as análises. Esse é o grupo mais divergente do restante do grupo Paraleishmania. Quanto à relação do complexo *hertigi-deanei* com os outros grupos de Paraleishmania, foram observadas divergências de ~12%, ~5.0% e ~14% (gGAPDH, HSP70 e CATB, respectivamente). Este subgrupo, classificado anteriormente como complexo *hertigi-deanei* (Herrer, 1971; Lainson, Shaw, 1977) foi, por sua vez, subdivido em três ramos: a) *L. deanei (strictu sensu);* b) novos isolados posicionados mais relacionados com *L. deanei;* c) *L. hertigi.* Essa subdivisão do complexo *hertigi-deanei* foi reportada em estudo prévio baseado em diferenças enzimáticas (Miles et al., 1980). O clado *hertigi-deanei* apresentou uma grande similaridade nas sequências de gGAPDH, HSP70 e CATB (99, 100 e 97,5%, respectivamente).

gGAPDH + HSP70 + CATB

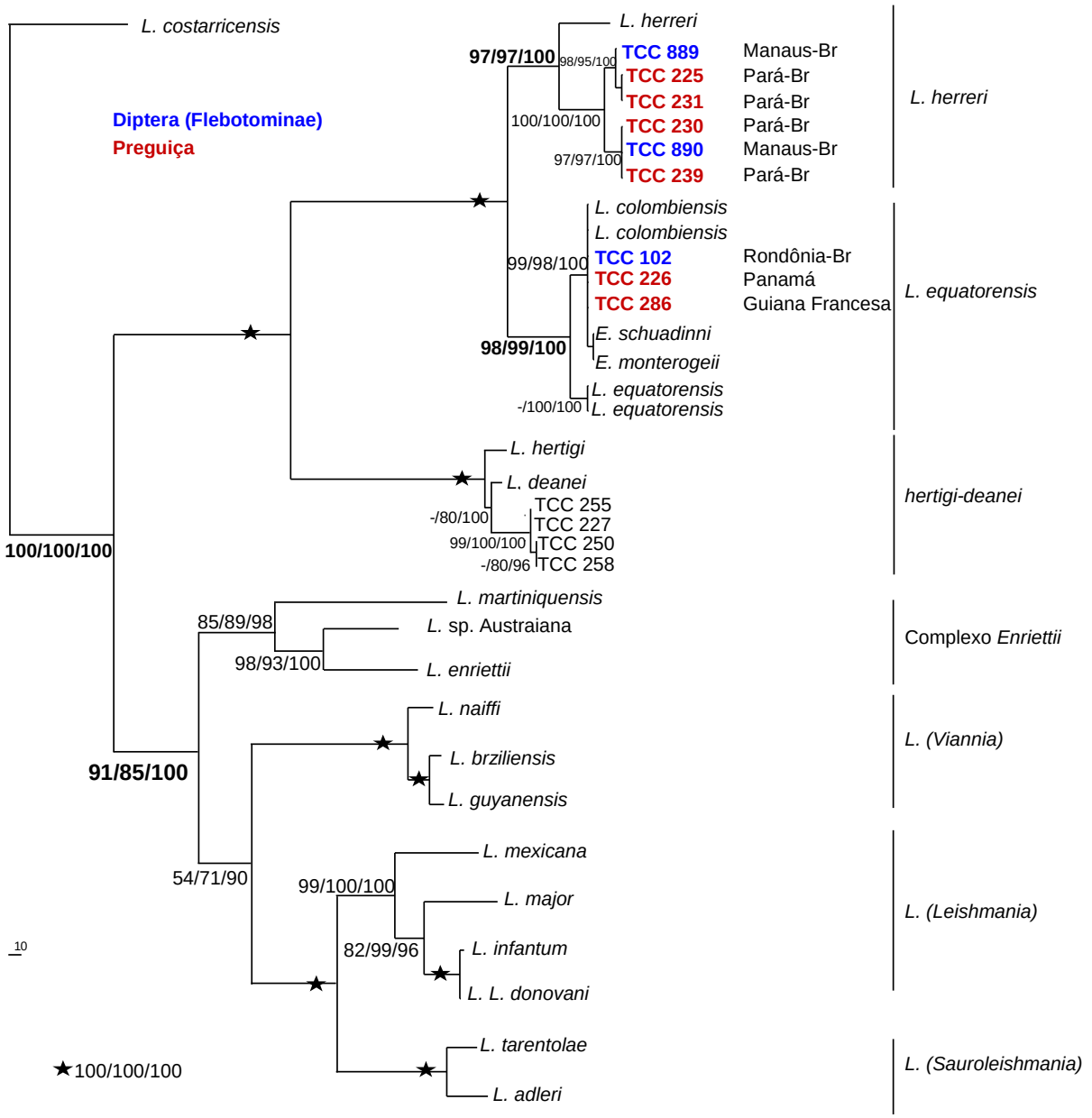



**Figura 22** - Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenética de sequências concatenadas gGAPDH e HSP70 dos isolados e espécies de *Endotrypanum* e leishmânias enigmáticas (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-). Destaca-se também a relação entre o complexo *L. enriettii* e as demais espécies de *Leishmania*.

### 5.2.3 Complexo *Leishmania enriettii*

*Leishmania enriettii* (Muniz, Medina, 1948) é uma espécie descrita na América do Sul (Brasil) e responsável pela leishmaniose tegumentar em cobaia (*Cavia porcellus)*. O reservatório silvestre e vetores de *L. enriettii* não são conhecidos e não há relatos de infecção humana por essa espécie. Estudos recentes relacionaram *L. enriettii* com um isolado de canguru (*Leishmania* sp. AUS) da Austrália (Rose et al., 2004; Dougall et al., 2011) e à espécie *L. martiniquensis,* agente de leishmaniose tegumentar e difusa na ilha de Martinica, acometendo pacientes imunocompetentes e HIV positivos (Boisseau-Garsaud et al., 2000; Dedet et al., 1995; Desbois et al., 2014; Noyes et al., 2002). Um estudo recente (Pothirat et al., 2014) identificou como *L. martiniquensis* isolados classificados como *Leishmania* sp. 'siamensis', agentes de leishmaniose visceral na Tailândia e de leishmaniose tegumentar em equinos no centro de Europa e em bovinos na Suíça (Chiewchanvit et al., 2015; Lobsiger et al., 2010; Müller et al., 2009) (Figura 22).

O relacionamento filogenético entre as três espécies que formam o complexo *L. enriettii* ainda precisa ser bem resolvido. Entretanto, o posicionamento desse complexo basal ao clado formado por todas as espécies do grupo Euleishmania foi bem suportado em todas as análises inferidas com gGAPDH, HSP70 e CATB. As sequências de *L. enriettii* e *Leishmania* sp. da Austrália foram obtidas nesse estudo e alinhadas com sequências do genoma de *L. martiniquensis*. Análises com genes independentes agruparam essas espécies (porém com valores baixos de suporte), formando um clado basal ao gênero *Leishmania* (Euleishmania) (91, 85 e 100% de suporte: MP, ML e AB). As divergências médias observadas nas sequências de gGAPDH, HSP70 e CATB nesse complexo foram de 5.0%, 4.0% e 13%, respectivamente. Os resultados demonstram ainda que o complexo *L. enriettii* apresenta maior similaridade nas sequências dos genes gGAPDH, HSP70 e CATB com a espécies do subgênero *L.* (*Leishmania*) (92%, 96% e 80%, respectivamente) do que com espécies do subgênero *L.* (*Viannia*) (89%, 94% e 76%, respectivamente).

*Leishmania enriettii* é um complexo extremamente enigmático. Ainda não são conhecidos os vetores de suas espécies, havendo, contudo, evidências indicando o envolvimento de *Lutzomyia monticolla* no ciclo de vida de *L. enriettii* (Luz et al., 1967). Um estudo de espécies de flebotomíneo em zonas endêmicas sugere

*Sergentomyia (Neophlebotomus) gemmea* como um potencial vetor de *L. martiniquensis* no sul da Tainlândia (Kanjanopas et al., 2013). Há evidências sugerindo um Diptera da família Ceratopogonidae como vetor de *Leishmania* sp. na Austrália, sendo esta a primeira espécie do gênero *Leishmania* cujo vetor biológico não seria um flebotomíneo (Dougall et al., 2011).

## 5.3 O subgênero *L.* (*Sauroleishmania*) e relações filogenéticas com espécies de *L.* (*Leishmania*) e *L.* (*Viannia*)

A classificação atualmente aceita do gênero *Leishmania* reconhece três subgêneros: *L. (Leishmania),* que consiste de espécies tanto do Novo quanto do Velho Mundo; *L. (Viannia),* composto exclusivamente de espécies do Novo Mundo; e, finalmente, *L. (Sauroleishmania),* incluindo todas e tão somente as leishmânias de lagartos (Lainson, Shaw, 1987). As espécies do subgênero *L. (Sauroleishmania)* são restritas ao Velho Mundo e transmitidas por flebotomíneos do gênero *Sergentomyia* (Killick-Kendrick et al., 1986). Embora existam pelo menos 12 espécies descritas, apenas 4 foram validadas por estudos moleculares (Garnham 1971; Belova 1971; Lainson, Shaw, 1987; Shaw 1994).

### 5.3.1 Caracterização de novos isolados de leishmânias de lagarto

Durante a realização desse projeto, nosso laboratório isolou e estabeleceu culturas de tripanossomatídeos de lagartos capturados em Moçambique (Província de Sofala, região Central). Todos foram analisados por DNA *Barcoding* V7V8 SSUrRNA e quatro foram identificadas como leishmânia: uma de *Gerrhosaurus vallidus* (TCC1958) e três de *Hemydactilus platycephalus* (TCC1898, 1899, 1930) (Figura 23A).

Tal como observado em todas as espécies de *Leishmania,* que apresentaram 98 e 100% de similaridade de V7V8 SSUrRNA entre os subgêneros, altos valores de similaridade foram também observados entre as espécies de referência do subgênero *Sauroleishmania* e os novos isolados de Moçambique. Dos quatro novos isolados de lagartos africanos, três (TCC1898, 1899 e 1930) apresentaram 100% de similaridade com *L. hoogstraali*, enquanto o isolado TCC1958 apresentou 99.9% de similaridade com *L. gymnodactyli*.

Foram então analisadas sequências de ITS1rDNA e dos genes gGAPDH, HSP70 e CATB dos quatros isolados de lagartos de Moçambique, juntamente com as espécies-referência desse subgênero: *L. tarentolae, L. hoogstraali, L. gymnodactyli e L. adleri*. As sequências determinadas para esse grupo foram alinhadas com sequências de representantes dos subgêneros *L*. (*Leishmania*) e *L.* (*Viannia*), disponíveis no GenBank*,* e os alinhamentos foram utilizados em análises filogenéticas, utilizando *Endotrypanum* como grupo externo (Figura 23). As análises agruparam as espécies de *L.* (*Sauroleishmania)*.

Análises baseadas em sequências do gene gGAPDH revelaram dois clados principais (100% de suporte) dentro do gênero *Leishmania*, um formado pelo subgênero *L.* (*Viannia*) e outro pelos subgêneros *L.* (*Leishmania*) *e L.* (*Sauroleishmania*). As similaridades das sequências de gGAPDH entre *L.* (*Sauroleishmania)* e os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* foram de 92 e 87%, respectivamente, enquanto que entre os subgêneros *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)* a similaridade foi de 89%. Foi alta a similaridade de sequências de gGAPDH (~99%) entre as espécies de *L. (Sauroleishmania)*. Foram também analisadas as sequências dos genes HSP70 e CATB das espécies de *L.* (*Sauroleishmania)* e as topologias obtidas corroboraram maior relação do subgênero *L.* (*Sauroleishmania*) com *L.* (*Leishmania*)*.* Observou-se também o agrupamento das espécies de Sauroleishmania em dois sub-clados, também definidos por gGAPDH: um grupo contendo *L. hoogstraali* agrupada com os isolados africanos TCC1898, 1899 e 1930 (100% de similaridade para HSP70 e 95% para CATB*)*; e outro agrupando *L. adleri, L. gymnodactyli* e *L. tarentolae* com o isolado africano TCC1958. Este novo isolado mostrou-se mais relacionado com *L. gymnodactyli* quando da comparação de sequências de GAPDH (~99%) e CATB (~98%) (Figura 23B).

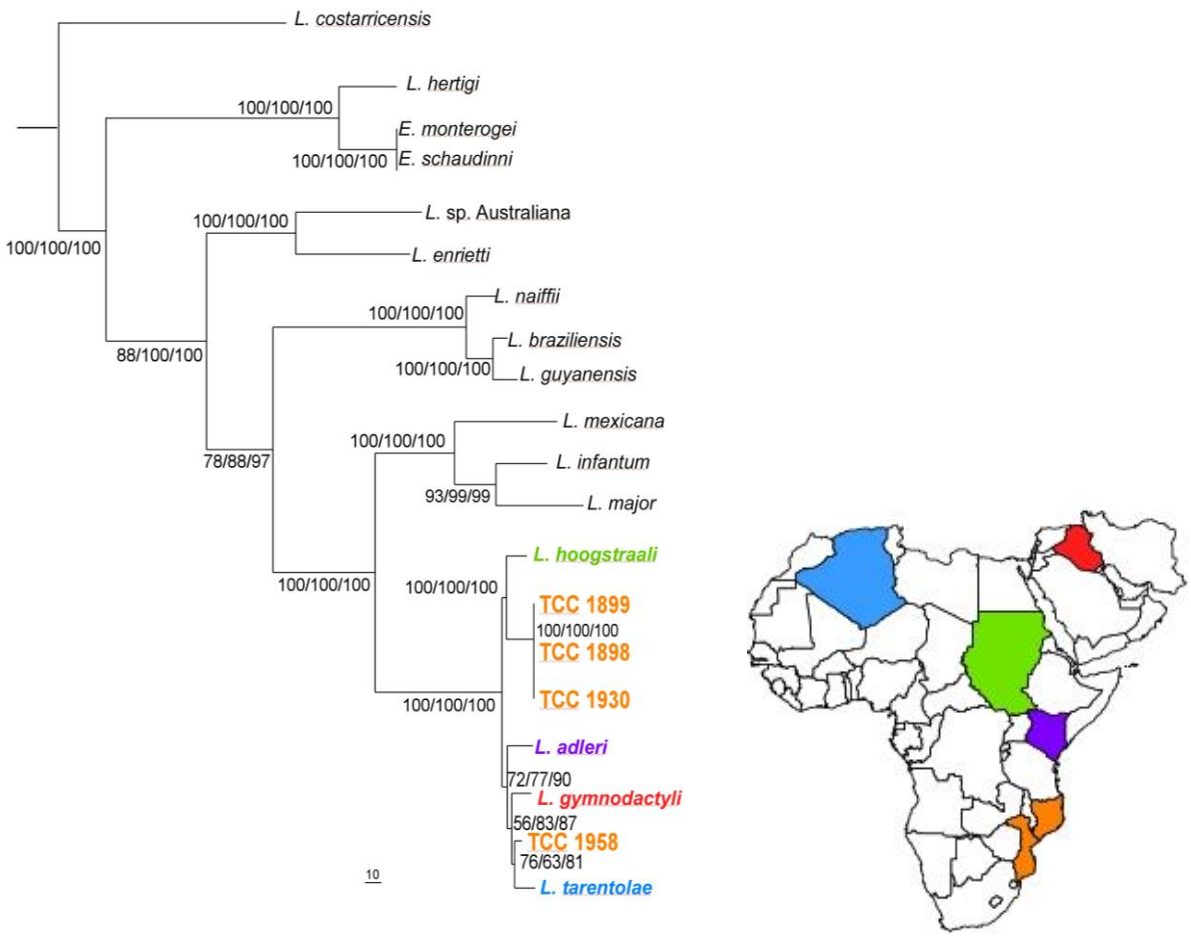
Com o objetivo de melhor distinguir os novos isolados das espécies-referência, analisamos sequências polimórficas de ITS1rDNA. As análises revelaram ~7,0% de divergência dos isolados de Moçambique (TCC1898, 1899 e 1930) em relação a *L. hoogstraali* e ~6,0% de divergência entre o isolado TCC 1958 e *L. gymnodactyli.* Portanto, os novos isolados de Moçambique, TCC 1898, 1899 e 1930, de *Hemidactylus platycephalus*, são bastante similares a *L. hoogstraali de Hemidactylus turcicus* (Sudão). Por outro lado, o isolado TCC 1958 de *Gerrhosaurus vallidus* posicionou-se mais relacionado com *L. gymnodactyli,* de *Gymnodactylus*

*caspius,* do Turcomenistão. Portanto, os isolados de lagartos de Moçambique não são idênticos a nenhuma das espécies descritas.

Nossos resultados mostraram que as espécies de *L. (Sauroleishmania)* formam um grupo monofilético, fortemente suportado, e apoiando a validação de *L. (Sauroleishmania)* como um subgênero mais relacionado com *L. (Leishmania)*. Este relacionamento filogenético concorda com estudos de outros autores, baseados em diversas sequências, como SSUrRNA, ITSrDNA, polA, rpoIILS e HSP70, sugerindo que as leishmânias de lagartos divergiram no Velho Mundo, provavelmente, de um ancestral parasita de mamíferos (Briones et al., 1992; Davila, Momen 2000, Croan et al.,1996, 1997; Fraga et al., 2010, Lukes et al., 2007; Novo et al., 2015; Orlando et al., 2002).

Com as análises realizadas nesse estudo, demostramos que os genes gGAPDH e, especialmente, CATB são mais polimórficos que SSUrRNA e HSP70, revelando-se assim marcadores filogenéticos úteis para inferir relações filogenéticas e classificar espécies de *Leishmania* em subgêneros/complexos, espécies até genótipos. Portanto, os genes gGAPDH e CATB foram identificados neste estudo como marcadores mais adequados do que SSU rRNA e HSP70 para estudos filogenéticos e taxonômicos de toda a subfamília Leishmaniinae.

gGAPDH + HSP70 + CATB




B)

| gGAPDH | *L. tarentolae* | TCC 1958 | *L. gymnodactyli* | *L. adleri* | *L. hoogstraali* | TCC 1898 | TCC 1899 | TCC 1930 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *L. tarentolae* | | | | | | | | |
| TCC 1958 | 1,63 | | | | | | | |
| *L. gymnodactyli* | 1,9 | 1,76 | | | | | | |
| *L. adleri* | 2,10 | 2,20 | 1,60 | | | | | |
| *L. hoogstraali* | 2,17 | 2,30 | 1,76 | 1,63 | | | | |
| TCC 1898 | 2,00 | 2,03 | 1,70 | 1,36 | 0,95 | | | |
| TCC 1899 | 2,00 | 2,03 | 1,70 | 1,36 | 0,95 | 0,00 | | |
| TCC 1930 | 2,00 | 2,03 | 1,70 | 1,36 | 0,95 | 0,00 | 0,00 | |

| CATB | *L. tarentolae* | TCC 1958 | *L. gymnodactyli* | *L. adleri* | *L. hoogstraali* | TCC 1898 | TCC 1899 | TCC 1930 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *L. tarentolae* | | | | | | | | |
| TCC 1958 | 2,3% | | | | | | | |
| *L. gymnodactyli* | 3,1% | 1,8% | | | | | | |
| *L. adleri* | 4,5% | 3,5% | 3,7% | | | | | |
| *L. hoogstraali* | 5,5% | 4,8% | 5,6% | 5,8% | | | | |
| TCC 1898 | 6,4% | 5,3% | 5,8% | 5,8% | 5,0% | | | |
| TCC 1899 | 6,4% | 5,3% | 5,8% | 5,8% | 5,0% | 0,0% | | |
| TCC 1930 | 6,4% | 5,3% | 5,8% | 5,8% | 5,0% | 0,0% | 0,0% | |

**Figura 23** - **A)** Diversidade, distribuição geográfica e análises filogenética de sequências concatenadas gGAPDH, HSP70 e CATB dos isolados e espécies *L. (Sauroleishmania)* (MP, ML e AB). Valores de suporte menores a 50% são representados por (-). Destaca-se também a relação entre os subgêneros *L. (Leishmanias)* e *L. (Viannia).* **B)** Taxas de divergência das sequências dos genes gGAPDH e CATB.

**5.4 Caracterização morfológica de novos gêneros propostos.**

Os tripanossomatídeos da subfamília Leishmanniiae apresentam formas bastante variadas, porém, de acordo com os parâmetros morfológicos tradicionais, em todas as espécies caracterizadas foram observadas formas coanomastigotas e promastigotas. Ao contrário dos trabalhos iniciais, que descreviam a morfologia observada nos hospedeiros naturais, atualmente, a caracterização morfológica das espécies de tripanossomatídeos se baseia essencialmente nas formas observadas em cultivo.

No grande conjunto de isolados analisados durante esse trabalho, observamos que a essas formas tradicionais, coanomastigotas e promastigotas, têm sido atribuídas uma grande diversidade morfológica. Com a comparação das formas apresentadas pelos flagelados incluídos nas análises filogenéticas foram identificados padrões morfológicos (morfotipos) característicos de clados (gêneros), considerável pleomorfismo entre espécies de alguns clados e pequeno polimorfismo intra-isolados de uma determinada espécies (exceto no clado Costarricensis). De acordo com as análises dos isolados nos mesmos meios e condições de cultivo foi possível agrupar os isolados de acordo com características morfológicas gerais. Os grupos obtidos são coerentes com os clados definidos nas árvores filogenéticas.

As espécies-referência *C. fasciculata, Legeria thermophila, C. acanthocephali e L. seymouri*, representantes de gêneros estabelecidos nesse estudo, diferem no formato, largura, tamanho do corpo, posição do cinetoplasto e comprimento do flagelo livre. Os morfotipos caracterizados para estas espécies-referência são claramente distintos (Figura 24). Outros clados identificados como candidatos a novos gêneros, Rondonia e Costarricensis, também apresentam peculiaridades morfológicas

Para ilustrar a diversidade morfológica e a definição de morfotipos, selecionamos as espécies tipos e alguns isolados representantes de cada clado para um estudo morfológico comparativo. Os flagelados foram todos cultivados em meio LIT e amostras de culturas em fase logarítmica foram examinadas por coloração com Giemsa. De acordo com os resultados obtidos, os generos definidos nesse estudo podem ser carateridos pelos seguintes morfotipos:

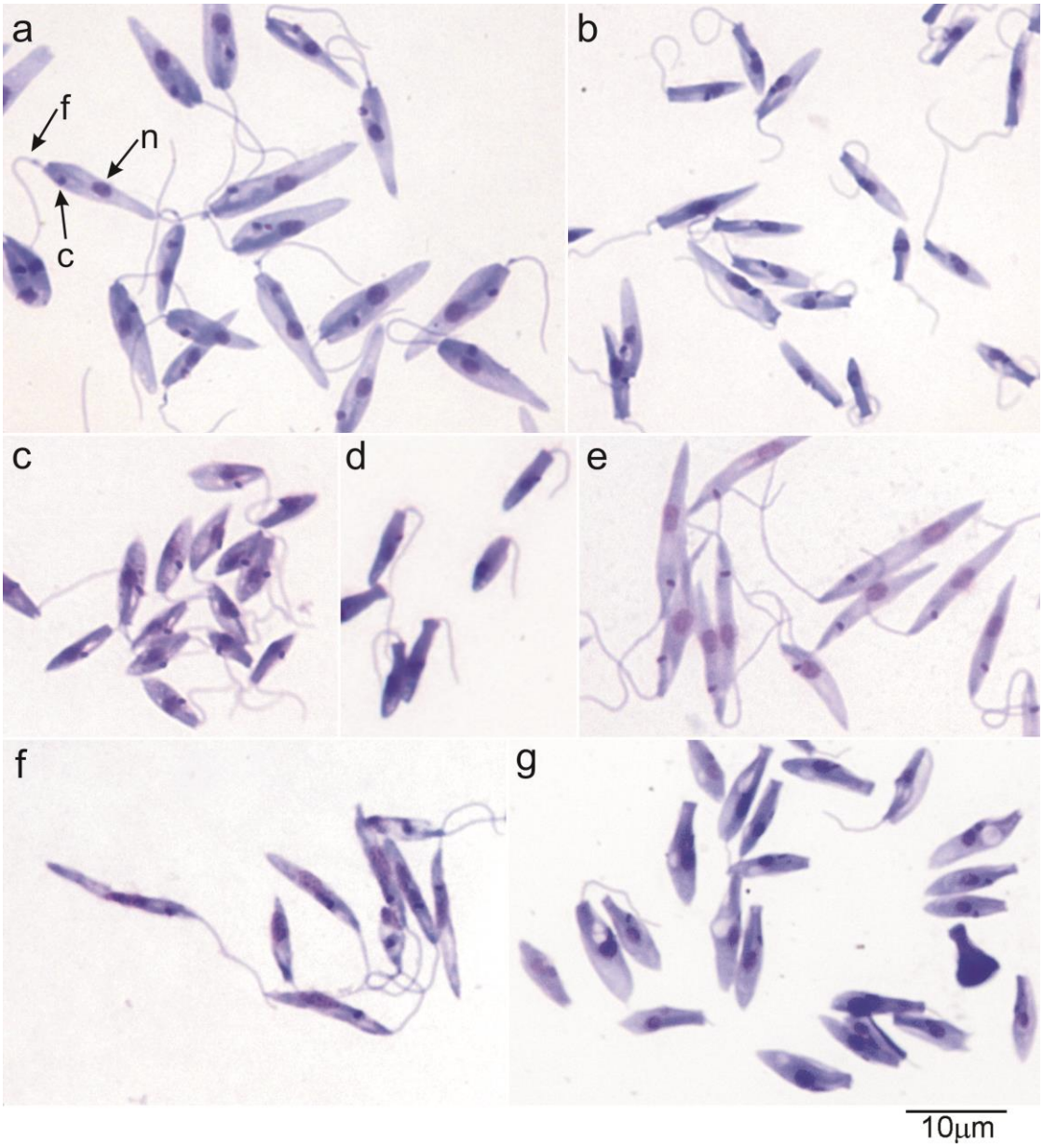



**Figura 24 –** Microscopia de luz de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae corados com Giemsa: (a) *Critidia*; (b) *Legeria*; (c) *Cecilmonas*; (d) Clado Rondônia; (e) *Leptomonas*; (f) Clado Costarricencis; (g) *C. inconstans.* Setas indicam: n: núcleo; c: cinetoplasto; f: flagelo. Barra = 10μm.

### 5.4.1 Gênero *Crithidia*: espécie-tipo *C. fasciculata*

Os organismos classificados no gênero *Crithidia* não apresentam formas coanomastigotas, isto é, formas pequenas com extremidade posterior arredondadas (Wallace, 1966). Como exemplificado com as microfotografias de *C. fasciculata* e isolados agrupados nesse gênero. As espécies desse gênero apresentam corpo relativamente grande no comprimento e bastante variados na largura. A região posterior pode ser bastante afilada

ou mais arredondada enquanto a extremidade anterior apresenta-se, em geral, truncada na emergência do flagelo livre. O cinetoplasto é sempre anterior ao núcleo e, na maioria das formas, apresenta uma posição lateral e não justaposto ao núcleo. O flagelo das espécies de *Crithidia* é geralmente longo. O pleomorfimso intra-specifico não é muito acentuado nas espécies desse gênero (Figura 25a).

5.4.2 Gênero *Legeria*: espécie-tipo *Legeria thermophila*

Este gênero é composto por *L. thermophila* e diversos isolados que apresentam corpos com tamanhos menores do que os apresentados pelas espécies do gênero *Crithidia*, com acentuado polimorfismo de tamanho. De acordo com o posicionamento nas árvores filogenéticas, esse grupo foi dividido em três grupos caracterizados por 3 diferentes morfotipos aqui representados. O morfotipo t1 (Figura 25 b-c), representado por *L. thermophila,* se caracteriza por flagelados alongados com extremidade posterior afiladas. O morfotipo t2 (TCC371) diferem no tamanho, sendo os menores desse gênero, e na região anterior afunilada (Figura 26). O morfotipo t3, isolados TCC 505 e 509 são os mais diferentes desse grupo, com formas mais largas e com extremidade posterior arredondas (Figura 26). Praticamente todas as formas, de todos os morfotipos, apresentam cinetoplasto lateral e sempre anterior e muito próximo do núcleo, que pode estar situado no centro ou até mesmo na extremidade posterior (Figura 26).

5.4.3 Gênero *Cecilmonas*: espécie tipo *C. acanthocephali*

O gênero *Cecilmonas* criado nesse trabalho é constituído por apenas uma espécie, *Ce. acanthocephali* (anteriormente classificada como *Crithidia acanthocephali)* representada por 4 isolados. Os flagelados desse gênero apresentam formas de tamanho intermediário comparado as dos gêneros *Crithidia* e *Legeria*. As culturas são bastante homogêneas, com forma em geral arredondadas exibindo um longo flagelo livre. O cinetoplasto é pequeno e se posiciona próximo e lateralmente ao núcleo, não foram observadas formas com cinetoplasto posterior ao núcleo (Figura 25 d-e).

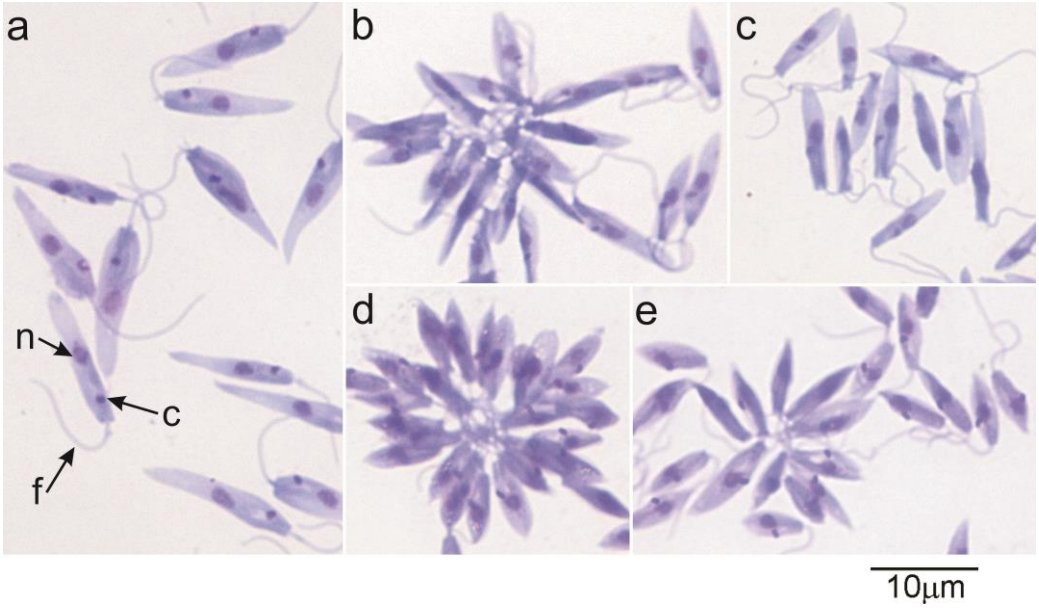



**Figura 25 –** Microscopia de Luz de tripanossomatídeos monoxênicos da subfamília Leishmaniinae corados com Giemsa: (a) *Critidia*; (b,c) *Legeria*; (d,e) *Cecilmonas.* Setas indicam: n: núcleo; c: cinetoplasto; f: flagelo. Barra = 10μm.

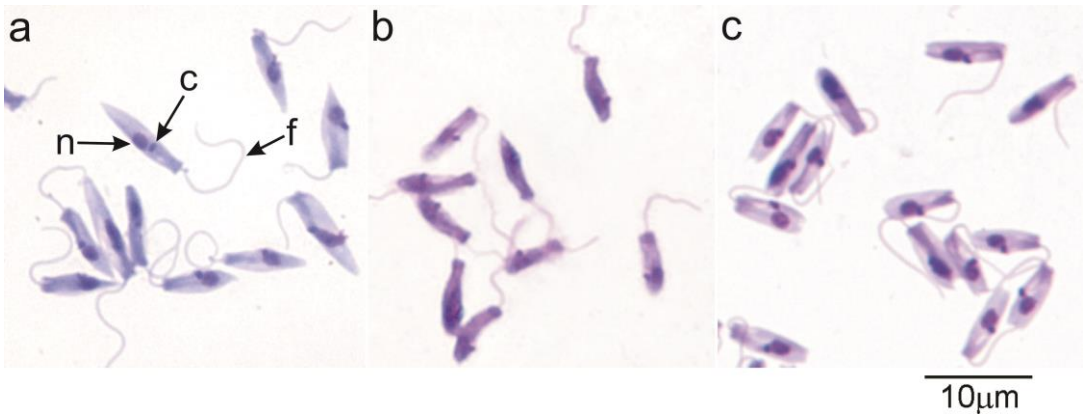



**Figura 26 –** Microscopia de Luz dos subgrupos que compreendem o gênero *Legeria*: (a) T1: *Legeria termophila*; (b) T2: TCC371; (c) T3: TCC509. Setas indicam: n: núcleo; c: cinetoplasto; f: flagelo. corados com Giemsa. Barra = 10μm.

### 5.4.4 Clado Rondonia: novo gênero

Os flagelados do Clado Rondonia apresentam um morfotipo caracterizado por formas de tamanho médio, alongadas, com extremidade anterior arredondada e afunilada na emergência do flagelo livre que é de tamanho médio. O cinetoplasto também é pequeno e posicionado próximo e lateral ao núcleo (Figura 27).

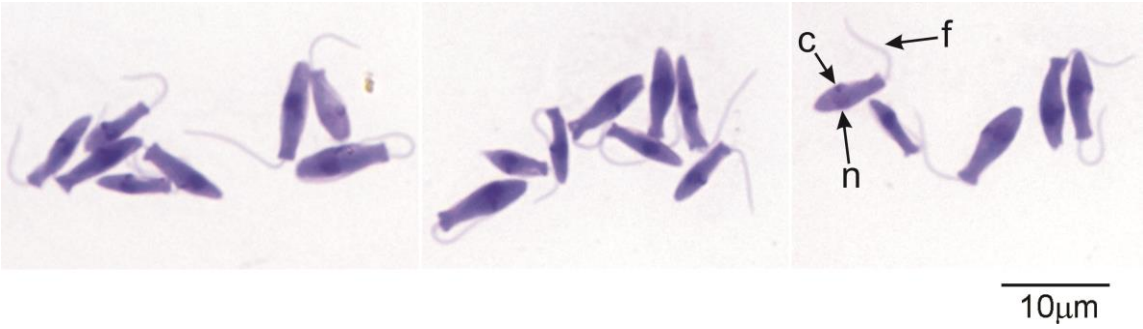



**Figura 27 -** Microscopia de luz do isolado TCC310 (Clado Rondônia) corado com Giemsa. Setas indicam: n: núcleo; c: cinetoplasto; f: flagelo. Bara = 10μm.

5.4.5 Gênero *Leptomonas*: espécie tipo: *L. seymouri*

As espécies do gênero *Leptomonas* diferem em tamanho, largura e formatos das descritas para os gêneros acima: As formas apresentadas pelos organismos desses gêneros são maiores e mais largas, mas todas apresentam formas promastigotas. A espécie-tipo *L. seymouri* apresenta flagelados bastante longos com extremidades anteriores afiladas, somente um pouco menores das apresentados pelo isolado TCC1646 (candidato a nova espécies), que possuem as formas mais espiraladas. O cinetoplasto nesses organismos é sempre anterior e distante do núcleo, que é grande e pode estar deslocado (Figura 28 i-j). Entretanto, na outra espécie-referência desse clado, *L. pyrrochoris,* os flagelados podem ser muito menores e mais arredondados, especialmente no início da fase logarítmica. Aparentemente, cada espécie desse gênero apresenta algumas peculiaridades morfológicas, como observado com o isolado TCC114E cujas formas são bastante arredondadas e largas (Figura 28 g-h).

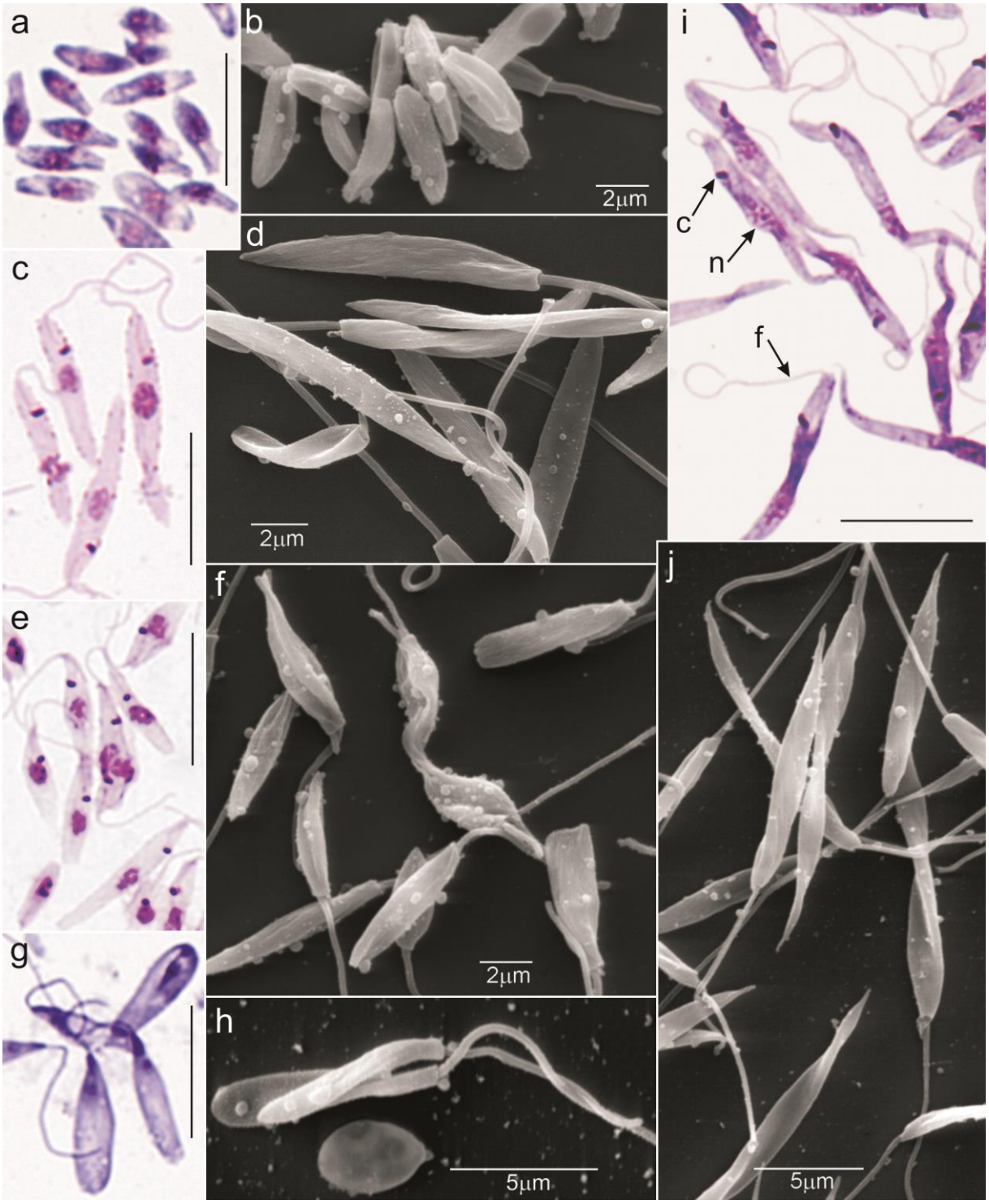



**Figura 28** - Clado Leptomonas: Isolados observados por microscopia de luz corados com Giemsa (a, c, e, g, i); e microscopia eletrônica de varredura (b, d, f, h, j). (a, b) Isolado TCC1897; (c, d) TCC100E; (e, f) TCC151E; (g, h) TCC114E; (i, j) TCC1646. Núcleo (n); cinetoplasto (c); flagelo (f). Bars = microscopia de luz = 10μm

### 5.4.6 Clado Costarricenses: novo gênero

O clado Costarricenses, consistente com a grande diversidade desse grupo, apresenta também uma diversidade de morfotipos de acordo com as espécies. Formas diferentes são observadas não apenas entre as espécies, mas também entre isolados de uma mesma espécie. Após uma fase inicial de cultura com a presença de muitas rosáceas, as formas apresentadas pelas espécies desse clado são em geral longas e finas, com as duas extremidades afiladas (Figura 29). O tamanho e a posição do núcleo e cinetoplasto diferem bastante entre as espécies, assim como o comprimento do flagelo livre. Alguns isolados apresentam uma pequena torção no corpo. Uma característica importante desse grupo é a presença de formas, que podem variar de pequenas e arredondadas até longas e afiladas, com cinetoplasto posterior ao núcleo (compatível com formas opistomastigotas). Devido à presença dessas formas, uma das espécies desse grupo foi classificada como *Herpetomonas dedonderi* (Figura 29b). A presença de formas promastigotas e "opistomoastigotas" foi um critério taxonômico que deixou de ser aceito como exclusivo do gênero *Herpetomonas* (Borghesan et al., 2013). As diferentes formas apresentadas por esses organismos resultam da diferenciação de promastigotas de fase logarítmica a "opistomoastigotas" de fase estacionária.

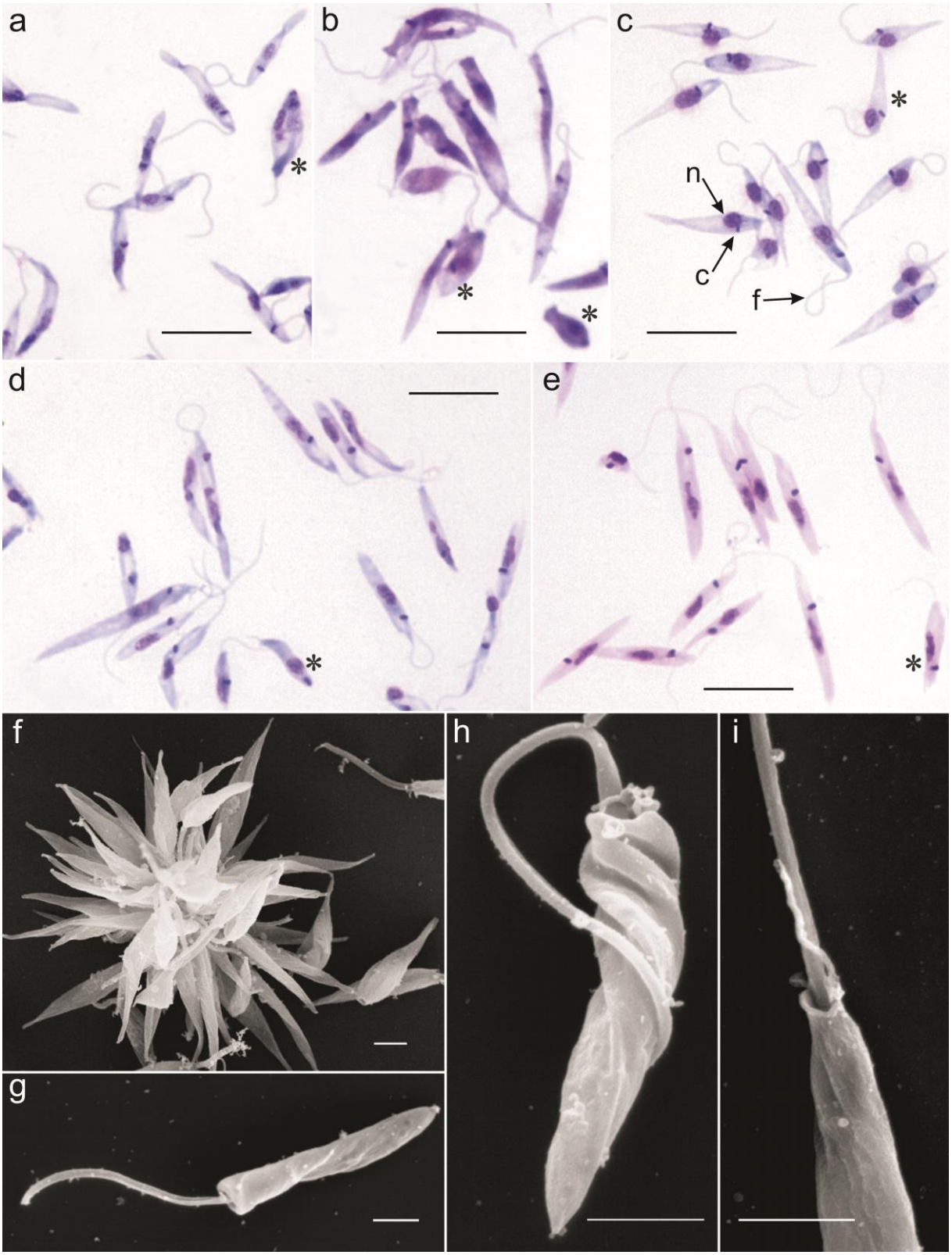



**Figura 29** – (a-e) Microscopia de luz do Clado costarrisensis corados com Giemsa (a) TCC356; (b) *H. dedonderi*; (c) TCC2547; (d) *L. costarricencies*; (e) TCC169E. (f-i) Microscopia eletrônica de varredura. (f) TCC2547; (g-h) *H.dedonderi*; (i) TCC169E. Formas opistomastigotas estão indicadas com (*). Bars = microscopia de luz = 10μm; Microscopia de varredura = 2μm.

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo foram caracterizados mais de cem novos isolados de tripanossomatídeos monoxênicos de insetos da subfamília Leishmaniinae, utilizando como marcador molecular a região V7V8 SSUrRNA *(DNA Barcoding)*. Sequências de ITS1rDNA e dos genes gGAPDH e CATB foram determinadas e comparadas com as das espécies integrantes da subfamília, tanto as monoxênicas quanto as heteroxênicas, visando examinar a diversidade genética e as relações filogenéticas entre os Leishmaniinae. Os resultados foram correlacionados com a origem geográfica e hospedeiros de origem. Este estudo indicou:

1. Que a subfamília Leishmaniinae representa um táxon heterogêneo, contendo tanto espécies cosmopolitas como restritas a um determinado bioma e capazes de parasitar diversas famílias de insetos das ordens Hemiptera (Alydidae, Coreidae, Miridae, Pyrrhocoridae e Reduviidae), Diptera (Calliphoridae, Culicidae, Phlebotominae, Muscidae, Sarcophagidae e Syrphidae) e Hymenoptera (Apidae).

2. A análise de relacionamento entre as espécies/isolados distribuiu os tripanossomatídeos monoxênicos de insetos em 8 grupos ou clados (Fasciculata, Termófilo, Leptomonas, Acanthocephali, Inconstans, Rondonia, Mellificae, Costarricensis), contendo novos isolados e espécies originalmente classificadas como *Crithidia* ou *Leptomonas.*

3. Os clados restritos a um bioma (Acanthocephali e Rondônia na América do Sul e Inconstans na Rússia) foram os que apresentaram as menores taxas de divergência nas sequências dos genes estudados. No entanto, análises baseadas em genes separados e concatenados de V7V8 SSUrRNA, gGAPDH e CATB indicaram sua estreita relação filogenética com o clado Leptomonas-Mellificae, que possui maior diversidade de hospedeiros de origem e ampla distribuição geográfica.

4. O clado Fasciculata, apesar de ocorrer em toda a América e possuir maior variedade de hospedeiros de origem se comparado aos clados homogêneos (Acanthocephali, Rondônia e Inconstans), apresentou uma maior variedade genética. Este clado corresponde ao gênero *Crithidia,* pois abriga a espécie-tipo, *C. fasciculata*. e foram reclassificadas as espécies de *Leptomonas* nele incluídas (*L.*

*acus, L. tarcoles* e *L. spiculata*) bem como as espécies de *Crithidia* filogeneticamente posicionadas fora dele.

5. O presente estudo indica *Crithidia luciliae thermophila* como a espécie tipo do clado Termófilo, formado por isolados com ampla distribuição geográfica (costa leste e oeste da África, América Central e do Sul) e que exibe a maior variabilidade genética. Os dados corroboraram a segregação deste clado nos subgrupos T1, T2 e T3 anteriormente descritos. O conjunto de resultados permite propor a criação de um novo gênero, *Legeria,* para albergar as espécies exibindo formas coanomastigotas e capazes de crescer em meio de cultura a 37 °C (*L. thermophila, L. confusa, L. bifurcata* e *L. insperata*).

6. O Clado Acantocephali, embora seja homogêneo, representa um táxon consistente em todas as análises realizadas, independente do método e do gene estudado. Neste trabalho foi proposto o gênero Cecimonas para acomodar *C. acantocephali* e isolados relacionados a esta espécie.

7. Nossos dados corroboram *Leptomonas costarricensis,* isolada de hemíptero predador (*Ricolla similima*) na Costa Rica, como a espécie monoxênica de inseto mais próxima dos Leishmaniinae com ciclo heteroxênico. Este é o primeiro estudo a revelar a existência de genótipos de *L. costarricensis* circulando em hemípteros predadores (*Ricolla* sp.) em regiões do Brasil (Rondônia, Manaus) e Panamá. Também contribuiu com a identificação de uma nova espécie do grupo Costarricensis (isolado TCC 2547), originária de hemíptero predador (*Ricoll*a sp.) do Panamá. Os resultados permitem propor a criação de um novo gênero para acomodar as espécies exibindo formas promastigotas que compõem o clado Costarricensis, único, dentre os demais formados pelos tripanossomatídeos monoxênicos, a incluir espécies isoladas de insetos flebotomíneos, também vetores de *Endotrypanum* e *Leishmania*.

Este estudo também inferiu o relacionamento filogenético entre tripanossomatídeos monoxênicos e heteroxênicos da subfamília Leishmaniinae, mediante análise de sequências da região V7V8 SSUrRNA e dos genes gGAPDH e CATB. Além de posicionar o Clado Costarricensis como o mais próximo dos grupos

formados pelos tripanossomatídeos heteroxênicos dos gêneros *Endotrypanum* e *Leishmania,* esta parte do estudo evidenciou:

1. A presença de *Leishmania colombiensis* e *Leishmania herreri,* porém não de *Endotrypanum,* em amostras isoladas de flebotomíneos e de preguiças.

2. A identificação de duas novas espécies de *L. (Sauroleishmania),* isoladas de lagartos (*Gerrhosaurus vallidus* e *Hemidactylus platycephalusboth)* de Moçambique.

3. O estreito relacionamento entre espécies de *Endotrypanum* e espécies de leishmânias "enigmáticas" do grupo Paraleishmania (*L. herreri, L. hertigi, L. deanei, L. colombiensis e L. equatorensis*). Os hospedeiros mamíferos destes tripanossomatídeos têm hábito de vida arbóreo e distribuição Neotropical, compartilhando as mesmas zonas geográficas que as espécies do clado Costarricensis (clado basal aos gêneros heteroxênicos).

4. *Leishmania colombiensis* como a espécie mais proximamente relacionada ao gênero *Endotrypanum*, seguida de *L. equatorensis, L. herreri* e, por último, espécies do complexo *hertigi-deanei,* estas resolvendo como o clado mais basal do grupo.

5. Maior similaridade nas sequências dos genes gGAPDH, HSP70 e CATB de representantes do complexo *L. enriettii* com as espécies do subgênero *L.* (*Leishmania*) (92%, 96% e 80%, respectivamente) do que com as do subgênero *L.* (*Viannia*)

6. O posicionamento de isolados de diversos lagartos, incluindo novas espécies provenientes da África (Moçambique), no subgênero *L*. (*Sauroleishmania*), que, por sua vez, posicionou-se mais próximo do subgênero *L*. (*Leishmania*) do que de *Viannia*, apoiando a hipótese de que leishmânias de lagartos divergiram no velho mundo.

Este Estudo demonstrou que os genes gGAPDH e, especialmente, CATB são mais polimórficos que SSUrRNA e HSP70, revelando-se assim marcadores filogenéticos úteis para inferir relações filogenéticas e classificar espécies de *Leishmania* em subgêneros/complexos, espécies até genótipos. Mostraram-se, portanto, marcadores mais adequados do que SSUrRNA e HSP70 para estudos filogenéticos e taxonômicos de toda a subfamília Leishmaniinae. A análise abrangente realizada neste estudo, com grande número e diversidade de isolados e o conjunto de marcadores moleculares avaliados, revelou vários grupos fortemente apoiados que representam gêneros, bem como diversas novas espécies e sinonímias. Portanto, este estudo fornece as bases fundamentais necessárias para uma ampla revisão taxonômica de Leishmaniinae.

# REFERÊNCIAS*


Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. Cell. 1990;61(7):1157-60.

Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. J Immunol. 1998;161(12):6794-801.

Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, Mimori T, Gomez EA, Hashiguchi Y, Uezato H. Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. Exp Parasitol. 2009;121(4):352-61.

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

Barrett AJ. Classification of peptidases. Methods Enzymol. 1994;244:1-15.

Barrett AJ, McDonald JK. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. Biochem J. 1986;237(3):935-43.

Barrett AJ, McDonald JK. Nomenclature: a possible solution to the 'peptidase anomaly'. Biochem J. 1985;231(3):807-16.

Bart G, Frame MJ, Carter R, Coombs GH, Mottram JC. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol. 1997;88(1-2):53-61.

Belova EM. Reptiles and their importance in the epidemiology of leishmaniasis. Bull World Health Organ. 1971;44(4):553-60.

Boisseau-Garsaud AM, Cales-Quist D, Desbois N, Jouannelle J, Jouannelle A, Pratlong F, Dedet JP. A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(1):51-2.

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

Briones MR, Nelson K, Beverley SM, Affonso HT, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. Mol Biochem Parasitol. 1992;53(1-2):121-7.

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

Buxbaum LU, Denise H, Coombs GH, Alexander J, Mottram JC, Scott P. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. J Immunol. 2003;171(7):3711-7.

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, Sbravate C, Teixeira MM, Uliana SR, Soares MB, Affonso HT, Floeter-Winter L. Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. J Parasitol. 1992;78(1):40-8.

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.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? Microbes Infect. 2003;5(13):1231-40.

Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. Parasitol Today. 2000;16(2):78-82.

Cao DP, Guo XG, Chen DL, Chen JP. Species delimitation and phylogenetic relationships of Chinese *Leishmania* isolates reexamined using kinetoplast cytochrome oxidase II gene sequences. Parasitol Res. 2011;109(1):163-73.

Cazzulo J, Stoka V, Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. Curr Pharm Des. 2001;7(12):1143-56.

Chiewchanvit S, Tovanabutra N, Jariyapan N, Bates MD, Mahanupab P, Chuamanochan M, Tantiworawit A, Bates PA. Chronic generalized fibrotic skin lesions from disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis* in two HIV-infected patients from northern Thailand. Br J Dermatol; 2015.

Clark CG. Riboprinting: a tool for the study of genetic diversity in microorganisms. J Eukaryot Microbiol. 1997;44(4):277-83.

Coombs GH, Mottram JC. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. Parasitol. 1997;114:61-80.

Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. Mol Biochem Parasitol. 1997;89(2):149-59.

Croan D, Ellis J. Phylogenetic relationships between *Leishmania*, *Viannia* and *Sauroleishmania* inferred from comparison of a variable domain within the RNA polymerase II largest subunit gene. Mol Biochem Parasitol. 1996;79(1):97-102.

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitol Today. 2000;16(4):142-4.

Cupolillo E, Pereira LO, Fernandes O, Catanho MP, Pereira JC, Medina-Acosta E, Grimaldi G, Jr. Genetic data showing evolutionary links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(5):677-83.

Cupolillo E, Grimaldi Junior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995;73(1-2):145-55.

Davila AM, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol. 2000;94(6):651-4.

De Lima AC, Zampieri RA, Tomokane TY, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CE, Floeter-Winter LM, Gomes CM. *Leishmania* sp. identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stored for more than 30 years. Parasitol Res. 2011;108(6):1525-31.

Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. Infect Immun. 2003;71(6):3190-5.

Dedet JP, Roche B, Pratlong F, Cales-Quist D, Jouannelle J, Benichou JC, Huerre M. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89(6):644-6.

Demand J, Luders J, Hohfeld J. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. Mol Cell Biol. 1998;18(4):2023-8.

Desbois N, Pratlong F, Quist D, Dedet JP. *Leishmania* (*Leishmania*) *martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). Parasit. 2014;21:12.

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

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

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The spliced leader RNA gene array in phloem-restricted plant trypanosomatids (*Phytomonas*) partitions into two major groupings: epidemiological implications. Parasitol. 2001;122(Pt 3):289-97.

Dollet M, Sturm NR, Sanchez-Moreno M, Campbell DA. 5S ribosomal RNA gene repeat sequences define at least eight groups of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): phloem-restricted pathogens form a distinct section. J Eukaryot Microbiol. 2000;47(6):569-74.

Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. Int J Parasitol. 2011;41(5):571-9.

Dougall A, Shilton C, Low Choy J, Alexander B, Walton S. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. Epidemiol Infect. 2009;137(10):1516-20.

Downing T, Stark O, Vanaerschot M, Imamura H, Sanders M, Decuypere S, de Doncker S, Maes I, Rijal S, Sundar S, Dujardin JC, Berriman M, Schonian G. Genome-wide SNP and microsatellite variation illuminate population-level epidemiology in the *Leishmania donovani* species complex. Infect Genet Evol. 2012;12(1):149-59.

El-Fadili AK, Zangger H, Desponds C, Gonzalez IJ, Zalila H, Schaff C, Ives A, Masina S, Mottram JC, Fasel N. Cathepsin B-like and cell death in the unicellular human pathogen *Leishmania*. Cell Death Dis. 2010;1:e71.

Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CS, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MM. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of Crocodylus at the Miocene. Parasit Vectors. 2013;6(1):313-21.

Fernandes O, Teixeira MM, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degrave WM, Campbell DA. Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. J Eukaryot Microbiol. 1997;44(6):535-9.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degrave WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol. 1994;66(2):261-71.

Fernandes O, Degrave W, Campbell DA. The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. Parasitol. 1993;107 (3):219-24.

Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MM. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in brazilian amazonia. J Eukaryot Microbiol. 2008;55(5):427-35.

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

Folgueira C, Canavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. Parasitol. 2007;134(3):369-77.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. 2010;10(2):238-45.

Garnham PC. The genus *Leishmania*. Bull World Health Organ. 1971;44(4):477-89.

Gerbaba TK, Gedamu L. Cathepsin B gene disruption induced *Leishmania donovani* proteome remodeling implies cathepsin B role in secretome regulation. PLoS One. 2013;8(11):e79951.

Gibson W, Bingle L, Blendeman W, Brown J, Wood J, Stevens J. Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. Mol Biochem Parasitol. 2000;107(2):269-77.

Glass DJ, Polvere RI, Van der Ploeg LH. Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol. 1986;6(12):4657-66.

Godoi MM, Serrano MG, Teixeira MM, Camargo EP. A PCR-based survey on *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in phytophagous hemipterans of the Amazon region. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(4):275-9.

Grimaldi G, Kreutzer RD, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB. Description of *Leishmania equatorensis* Sp-N (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), a New Parasite Infecting Arboreal Mammals in Ecuador. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87(2):221-8.

Guan W, Cao DP, Sun K, Xu JN, Zhang JR, Chen DL, Chen JP. Phylogenic analysis of Chinese *Leishmania* isolates based on small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA) and 7 spliced leader RNA (7SL RNA). Acta Parasitol. 2012;57(2):101-13.

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

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

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

Hamilton PB, Stevens JR, Holz P, Boag B, Cooke B, Gibson WC. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. Mol Ecol. 2005b;14(10):3167-75.

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

Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. Int J Parasitol. 2004;34(12):1393-404.

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

Hanson WL, McGhee RB. The Biology and Morphology of *Crithidia acanthocephali* n. sp., *Leptomonas Zeptoglossi* n. sp., and *Blastocrithidia euschisti* n. sp. J Protozol. 1961;8(2):200-04.

Henze K, Badr A, Wettern M, Cerff R, Martin W. A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;2(20):9122-6.

Hernandez R, Rios P, Valdes AM, Pinero D. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 1990;41(2):207-12.

Herrer A. *Leishmania hertigi* sp. n., from the tropical porcupine, Coendou rothschildi Thomas. J Parasitol. 1971;57(3):626-9.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford, In: Blackwell Scientific Publications; 1972, 750 p.

Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature. 1966;212:1385-6.

Hollar L, Lukes J, Maslov DA. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. J Eukaryot Microbiol. 1998;45(3):293-7.

Hury A, Goldshmidt H, Tkacz ID, Michaeli S. Trypanosome spliced-leader-associated RNA (SLA1) localization and implications for spliced-leader RNA biogenesis. Eukaryot Cell. 2009;8(1):56-68.

Jirku M, Yurchenko VY, Lukes 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(6):537-47.

Kabani M, Martineau CN. Multiple hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: mere redundancy or functional specificity? Curr Genomics. 2008;9(5):338-48.

Kanjanopas K, Siripattanapipong S, Ninsaeng U, Hitakarun A, Jitkaew S, Kaewtaphaya P, Tan-ariya P, Mungthin M, Charoenwong C, Leelayoova S. *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. BMC Infect Dis. 2013;13:333-6.

Katakura K, Mimori T, Furuya M, Uezato H, Nonaka S, Okamoto M, Gomez LE, Hashiguchi Y. Identification of *Endotrypanum* species from a sloth, a squirrel and *Lutzomyia sandflies* in ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini-exon gene. J Vet Med Sci. 2003;65(5):649-53.

Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, Bailly I, Righton LA. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(1):138-42.

Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annu Rev Biochem. 2002;71:275-305.

Kosec G, Alvarez VE, Aguero F, Sanchez D, Dolinar M, Turk B, Turk V, Cazzulo JJ. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. Mol Biochem Parasitol. 2006b ;145(1):18-28.

Kosec G, Alvarez V, Cazzulo JJ. Cysteine proteinases of *Trypanosoma cruzi*: from digestive enzymes to programmed cell death mediators. Biocell. 2006a ;30(3):479-90.

Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. Protist. 2014;165(5):594-604.

Kostygov A, Malysheva MN, Frolov AO. Investigation of causes of the conflict between taxonomy and molecular phylogeny of trypanosomatids by the example of *Leptomonas nabiculae podlipaev*, 1987. Parazitol. 2011;45(6):409-24.

Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Jr., Grogl M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, Tesh RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. Am J Trop Med Hyg. 1991;44(6):662-75.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In: Collier L, Balows A, Sussman M, (eds).. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology. 10th ed. London: Arnold; 2005. v 5,. p. 313-349.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds).The leishmaniases in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. v. 1, p. 1-120.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. J Trop Med Hyg. 1977;80(2):29-35.

Lalmanach G, Boulange A, Serveau C, Lecaille F, Scharfstein J, Gauthier F, Authie E. Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate. Biol Chem. 2002;383(5):739-49.

Langridge DF, McGhee RB. *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera.* J Protozool. 1967; 14(3):485-7.

Leblois R, Kuhls K, Francois O, Schonian G, Wirth T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi.* Infect Genet Evol. 2011;11(5):1091-5.

Lee MG, Atkinson BL, Giannini SH, Van der Ploeg LH. Structure and expression of the hsp 70 gene family of *Leishmania major*. Nucleic Acids Res. 1988;16(20):9567-85.

Leger L. Sur un flagellé parasite de l'*Anopheles maculipennis*. C R Seances Soc Fil. 1902;54:354-6.

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

Li J, Qian X, Sha B. Heat shock protein 40: structural studies and their functional implications. Protein Pept Lett. 2009;16(6):606-12.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. Eukaryot Cell. 2003;2(5):830-40.

Lima L, Espinosa-Alvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MM. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. Parasit Vectors. 2013;6(1):221-38.

Lima L, Ortiz PA, da Silva FM, Alves JM, Serrano MG, Cortez AP, Alfieri SC, Buck GA, Teixeira MM. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. PLoS One. 2012;7(6):383-5.

Lipa J.J. and Triggiani O. *Crithidia bombi* Sp N. A flagellated parasite of a bumblebee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae). Acta Protozool. 1988; 27(4):287-90

Lobsiger L, Muller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, Gottstein B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. Vet Parasitol. 2010;169(3-4):408-14.

Louw CA, Ludewig MH, Mayer J, Blatch GL. The Hsp70 chaperones of the Tritryps are characterized by unusual features and novel members. Parasitol Int. 2010;59(4):497-505.

Lukes J, Skalicky T, Tyc J, Votypka J, Yurchenko V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. Mol Biochem Parasitol. 2014;195(2):115-22.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholova E, Haralambous C, Pratlong F, Obornik M, Horak A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(22):9375-80.

Luz E. Giovannoni M., Borba AM. Infecção de *Lutzomyia monticola* por *Leishmania enriettii*. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná. 1967;9:121–8.

Machado MI, Milder RV, Pacheco RS, Silva M, Braga RR, Lainson R. Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii*. Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from Sao Paulo, Brazil. Parasitol. 1994;109(2):135-8.

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

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

Marcili A, Speranca MA, da Costa AP, Madeira Mde F, Soares HS, Sanches Cde O, Acosta Ida C, Girotto A, Minervino AH, Horta MC, Shaw JJ, Gennari SM. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania* (*L*.) *infantumchagasi* in South America. Infect Genet Evol. 2014;25:44-51.

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

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

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

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

Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci. 2005;62(6):670-84.

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

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

Miles MA, Povoa MM, de Souza AA, Lainson R, Shaw JJ. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1980;74(2):243-52.

Mesnil F, Brimont E. Sur un hématozaire nouveau (*Endotrypanum* n.gen.) dún édenté de Guyane. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris. 1908;65:581-3.

Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(4):583-8.

Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, Van der Auwera G. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 80(1):35-9.

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

Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. Curr Opin Microbiol. 2004;7(4):375-81.

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

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

Muller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Boghenbor KK, Hilbe M, Gottstein B, Frey CF, Geyer C, von Bomhard W. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. Vet Parasitol. 2009;166(3-4):346-51.

Muniz J, Medina H. Cutaneous leishmaniasis of the guinea pig, *Leishmania enriettii* n. sp. Hospital (Rio J). 1948;33(1):7-25.

Novo SP, Leles D, Bianucci R, Araujo A. *Leishmania tarentolae* molecular signatures in a 300 hundred-years-old human Brazilian mummy. Parasit Vectors. 2015;8(72):1-8.

Noyes H, Pratlong F, Chance M, Ellis J, Lanotte G, Dedet JP. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* spp. Parasitol. 2002;124(Pt 1):17-24.

Noyes HA, Chance ML, Croan DG, Ellis JT. *Leishmania* (*sauroleishmania*): a comment on classification. Parasitol Today. 1998;14(4):167-75.

Noyes HA, Arana BA, Chance ML, Maingon R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida. Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. J Eukaryot Microbiol. 1997;44(5):511-7.

Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida. Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida. Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1996;80(1):119-23.

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

Orlando TC, Rubio MA, Sturm NR, Campbell DA, Floeter-Winter LM. Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(5):695-701.

Paiva BR, Secundino NF, Nascimento JC, Pimenta PF, Galati EA, Junior HF, Malafronte RS. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Trop. 2006;99(2-3):252-9.

Podlipaev SA, Sturm NR, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, Campbell DA, Lukes J. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. J Eukaryot Microbiol. 2004;51(3):283-90.

Podlipaev S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol. 2001;31(5-6):648-52.

Poinar G, Jr. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. Parasit Vectors. 2008;1(1):22-9.

Poinar G, Jr., Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. Protist. 2004;155(3):305-10.

Popp M, Lattorff HM. A quantitative in vitro cultivation technique to determine cell number and growth rates in strains of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), a parasite of bumblebees. J Eukaryot Microbiol. 2011; 58(1):7-10.

Pothirat T, Tantiworawit A, Chaiwarith R, Jariyapan N, Wannasan A, Siriyasatien P, Supparatpinyo K, Bates MD, Kwakye-Nuako G, Bates PA. First isolation of *Leishmania* from Northern Thailand: case report, identification as *Leishmania martiniquensis* and phylogenetic position within the *Leishmania enriettii* complex. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(12):33-9.

Ramirez CA, Requena JM, Puerta CJ. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. Parasit Vectors. 2011;4:166.

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

Rawlings ND. Unusual phyletic distribution of peptidases as a tool for identifying potential drug targets. Biochem J. 2007;15.401(2):5-7.

Requena JM, Lopez MC, Jimenez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C. A head-to-tail tandem organization of hsp70 genes in *Trypanosoma cruz*i. Nucleic Acids Res. 1988;16(4):1393-406.

Rodrigues AC, Ortiz PA, Costa-Martins AG, Neves L, Garcia HA, Alves JM, Camargo EP, Alfieri SC, Gibson W, Teixeira MM. Congopain genes diverged to become specific to Savannah, Forest and Kilifi subgroups of *Trypanosoma congolense*, and are valuable for diagnosis, genotyping and phylogenetic inferences. Infect Genet Evol. 2014;23:20-31.

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

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

Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G, Jr., Momen H, Cupolillo E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. Infect Genet Evol. 2003;3(2):119-24.

Roitman I, Mundim MH, Azevedo HPD, Kitajima EW. Growth of *Crithidia* at High Temperature: *Crithidia hutneri* sp. n. and *Crithidia luciliae thermophila* ssp. n.. The J of Protozool. 1977 24(4):553-56.

Roitman C, Roitman I, de Azevedo HP. Growth of an Insect Trypanosomatid at 37 C in a Defined Medium. The J of Protozool. 1972; 19(2):346-49.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 2003;19:1572-4.

Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. Int J Parasitol. 2004;34(6):655-64.

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

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

Runckel C, DeRisi J, Flenniken ML. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae*. PLoS One. 2014; 9(4):1-10.

Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol. 2002;120(1):1-21.

Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. Exp Parasitol. 1997;85(1):63-76.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 v.

Santos MAC. Filogenia e revisão taxonômica de tripanossomatídeos com formas coanomastigotas. [tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2004.

Schmid-Hempel R, Tognazzo M. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. J Eukaryot Microbiol. 2010; 57(4):337-45.

Schonian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitol. 2011;138(4):405-25.

Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. J Eukaryot Microbiol. 2015;0:1–17.

Serin MS, Waki K, Chang KP, Aslan G, Direkel S, Otag F, Kayar B, Koksal F, Emekdas G. Consistence of miniexon polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(3):295-9.

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. Exp Parasitol. 1999b;91(3):268-79.

Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MM. *Phytomonas*: analysis of polymorphism and genetic relatedness between isolates from plants and phytophagous insects from different geographic regions by RAPD fingerprints and synapomorphic markers. J Eukaryot Microbiol. 1999a;46(6):618-25.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89(3):471-8.

Shaw JJ. The haemoflagellates of sloths, vermilinguas (anteaters), and armadillos, In: Montgomery GG. (ed.) The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilingues. Washington: Smithsonian Institution Press; 1985. p. 279-292.

Shaw JJ, Bird RG. The endoerythrocytic habitat of a member of the Trypanosomatidae, *Endotrypanum schaudinni*, Mesnil and Brimont, 1908. Z Tropenmed Parasitol. 1969;20(2):144-50.

Shaw JJ. A Possible Vector of *Endotrypanum Schaudinni* of the Sloth Choloepus Hoffmanni, in Panama. Nature. 1964;201:417-8.

Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimaraes ML, Alves CR. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. Parasit Vectors. 2014;7:387-93.

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

Sogin ML, Silberman JD. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. Int J Parasitol. 1998;28(1):11-20.

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

Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. J Biol Chem. 2002;277(28):25305-12.

Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 2006;22(21):2688-90.

Stevens JR. Free-living bodonids and derived parasitic trypanosomatids: but what lies in between? Trends Parasitol. 2014;30(3):113-4.

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

Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. Infect Genet Evol. 2001;1(2):143-50.

Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, Kongkaew W, Bumrungsana K, Chanachai K, Apiwathanasorn C, Rujirojindakul P, Wattanasri S, Ungchusak K, Leelayoova S. A suspected new species of *Leishmania*, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. Int J Parasitol. 2008;38(6):617-22.

Svobodova M, Zidkova L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votypka 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 4.0. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1998. 197 p.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30:2725-9.

Tanaka T, Kaneda Y, Iida A, Tanaka M. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. Int J Parasitol. 1994;24(2):179-88.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. Protist. 2011;162(3):503-24.

Teixeira MM, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. Exp Parasitol. 1996;84(3):311-9.

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.

Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(2):265-94.

Van der Auwera G, Fraga J, Montalvo AM, Dujardin JC. *Leishmania* taxonomy up for promotion? Trends Parasitol. 2011;27(2):49-50.

Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MM. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. Exp Parasitol. 2001;99(1):37-48.

Vermelho AB, Simone SG, Levy CMD, Santos ALS, De Melo ACN, Silva Jr FP. Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. Current Enzym Inhibit. 2007;3(1):19-46.

Vickerman K. The Evolutionary Expansion of the Trypanosomatid Flagellates. Int J Parasitol. 1994;24(8):1317-31.

Vickerman K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In: Lumdsen WHR, Evans DA (eds.). Biology of the Kinetoplastida. New York, NY: Academic Press; 1976. p 1-34.

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

Votypka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesarova M, Grybchuk D, Lukes J, Yurchenko V. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. Protist. 2014;165(6):825-38.

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

Votypka J, Klepetkova H, Yurchenko VY, Horak A, Lukes J, Maslov DA. Cosmopolitan distribution of a trypanosomatid *Leptomonas pyrrhocoris*. Protist. 2012b;163(4):616-31.

Votypka J, Klepetkova H, Jirku M, Kment P, Lukes J. Phylogenetic relationships of trypanosomatids parasitising true bugs (Insecta: Heteroptera) in sub-Saharan Africa. Int J Parasitol. 2012a;42(5):489-500.

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. Biology of the kinetoplastida of arthropods. In: Lumsden WHR, Evans DA, (eds.) Biology of the knetoplastida. New York: Academic Press; 1979. p. 213-240.

Wallace FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol. 1966;18(1):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. Parasitol. 2004;129(5):537-47.

Yang BB, Chen DL, Chen JP, Liao L, Hu XS, Xu JN. Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. Parasit Vectors. 2013; 5(6):32-40.

Yang BB, Guo XG, Hu XS, Zhang JG, Liao L, Chen DL, Chen JP. Species discrimination and phylogenetic inference of 17 Chinese *Leishmania* isolates based on internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. Parasitol Res. 2010;107(5):1049-65.

Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(10):781-91.

Yourth CP, Schmid-Hempel P. Serial passage of the parasite *Crithidia bombi* within a colony of its host, *Bombus terrestris*, reduces success in unrelated hosts. Proc Biol Sci. 2006; 273(1587):655-9.

Yurchenko V, Votypka J, Tesarova M, Klepetkova H, Kraeva N, Jirku M, Lukes J. Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*. Folia Parasitol (Praha). 2014;61(2):97-112.

Yurchenko VY, Lukes J, Jirku 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(4):893-909.

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

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

Yurchenko V, Lukes 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.

Zeledon R, Ponce C, Murillo J. *Leishmania herreri* sp. n. from sloths and sandflies of Costa Rica. J Parasitol. 1979;65(2):275-9.

# Towards a taxonomic revision of insect trypanosomatids included in the genera *Crithidia* and *Leptomonas* of the subfamily Leishmaniinae: delimiting genera and species boundaries by taxon-rich phylogenetic analysis of five locus

Espinosa OE, Campaner M, Marcia AS, Takata CSA, Borda CC, Matsumoto T, Teixeira MMG, Camargo EP.

---

**Abstract**

The trypanosomatids parasites of insects are classified in 9 genera: *Angomonas, Blastocrithidia, Blechomonas, Crithidia, Herpetomonas, Leptomonas, Sergeia, Strigomonas* and *Wallacemonas*. In recent years, their taxonomy has been reviewed using molecular phylogenetic approaches. However, the taxonomy of the genera *Crithidia* and *Leptomonas*, currently positioned within the Leishmaniinae subfamily, paradoxically the first two genera described, still relies on the insufficient criteria of morphology and host origin. The main purpose of this study was to perform a comprehensive study of molecular diversity and phylogenetic relationships of trypanosomatids classified as *Crithidia* or *Leptomonas*. In order to do that, we selected 493 cultures of our collection (TCC-USP) exhibiting pro- and choanomastigotes and barcoded them by means of V7V8 SSU rRNA sequencing. The barcodes obtained permitted to identify all species of Leishmaniinae and exclude from subsequent analyses 305 trypanosomatids from other genera. The analysis of V7V8 SSU rRNA confirmed that the genera *Crithidia* and *Leptomonas* are polyphyletic. Then, 188 cultures attributable to *Crithidia* and *Leptomonas* were comparatively analyzed through taxon rich phylogenetic analyses of five loci: SSU rRNA, gGAPDH and Cathepsin B. Results demonstrated that the genus *Crithidia* is indeed polyphyletic and actually can be divided in three clearly distinct genera, which we named as *Crithidia, Legeria* and *Cecilmonas*. Each genus corresponds to one strongly supported monophyletic assemblage. Sequences divergences were assessed to delineate the boundaries of both genera and species. The validated genera was constituted by species already known and new species yet to be described. This is the most comprehensive study regarding the number of organisms characterized and the number of loci analyses developed to propose a consistent taxonomic revision of the two hundred years old genus *Crithidia.* In addition to *Leishmania*, the inferred phylogenetic analyses strongly supported a monophyletic assemblage harboring exclusively species of *Leptomonas,* and disclosed other consistent clades supporting the creation of additional genera within the subfamily Leishmaniinae of the Trypanosomatidae family.

---

## Introduction

The flagellates of the family Trypanosomatidae (Euglenozoa, Kinetoplastea) are all parasites. The genera *Trypanosoma and Leishmania* comprise parasites of vertebrates whereas the genus *Phytomonas* comprises parasites of plants. The parasites of invertebrates were initially classified in three genera, *Leptomonas* and *Herpetomonas,* created by Kent (1880) plus *Crithidia* created by Léger (1902). Unfortunately, the criteria defining these three genera were quite fragile and thereafter became a source of problems for the taxonomy of insect trypanosomatids.

According to original description, the needle-like shape distinguished the flagellates of the genera *Leptomonas* and *Herpetomonas* (Kent 1880) from the free-living and rounded flagellates of the genus *Monas,*

whereas *Leptomonas* and *Herpetomonas* differed from each other by the greater cellular body flexibility of the latter. The genus *Leptomonas* was defined as comprising "animalcules, persistent in shape elongate fusiform or aciculate, bearing a single undulating flagellum at the anterior extremity; no distinct oral aperture yet detected." In his description of *Leptomonas* and *Herpetomonas*, Kent provided no drawings and measurements. For *Leptomonas*, Kent referred to the publication of Bütschli about flagellate parasites of the nematode *Tolibrus* (=*Trilobus*) *gracilis,* but was not sure whether it constituted a distinct genus or was a developmental form of other species of flagellate. This fact alone shows the fluidity of the defining criteria of *Leptomonas.*

The creation of the genus *Crithidia* added more confusion to the taxonomy of insect trypanosomatids. The description and drawings of its type species, *Crithidia fasciculata*, do not depict a single organism, but a collection of flagellates recovered from the digestive tract of various females of *Anopheles maculipennis* (Léger, 1902). Léger said that the forms more commonly found in the type material of the new genus resembled "grains d'orge (barleycorn) légèrement aplati et tronqué a l'extremité anterieure" amongst a smaller number of flagellates displaying an undulating membrane. Some authors took the barleycorn grain form as representing the genus, but Lühe (Lühe, 1906) and Patton (Patton, 1909, Patton and Strickland, 1908) considered the flagellates with undulating membranes the hallmark of *Crithidia.* Thereafter, an informal designation of crithidia was extended to any flagellate with an undulating membrane, including those occurring in the life cycle of *Trypanosoma* spp. This designation persisted until insect flagellates presenting undulating membranes were placed into the new genus *Blastocrithidia* by Laird (1959).

Unfortunately, the morphological criteria used for the definition of *Leptomonas, Herpetomonas* and *Crithidia* proved to be of little value and new species were erratic and arbitrarily placed in any of the three genera. Strickland (1911) recommended that *C. luciliae* should be *Herpetomonas luciliae* and that the genus *Herpetomonas* should be revised to include *Leptomonas.* At a certain moment, Léger (1903) declared that the genus *Leptomonas* should disappear. This overall confusion prompted Hindle (1912) to ask "What is the genus *Leptomonas*?" and to conclude that the nomenclature of the trypanosomatids was "in such a state of chaos" that he was forced to review the subject (without much success, however). Half a century later, Wallace (1963, 1966) and Hoare and Wallace (1966) undertook such a revision and redefined the genera of Trypanosomatidae according to morphotypes and life cycles. They created the modern nomenclature of the trypanosomatid morphotypes, which were distributed schematically (too schematically, perhaps) among the various genera. The proposed criteria brought some order to the prevailing taxonomic chaos. For instance, the choanomastigote morphotype served to diagnosis the genus *Crithidia* and opisthomastigotes to diagnosis *Herpetomonas* whereas just plain promastigotes represented *Leptomonas* (Wallace, 1963, 1966).

However, short and wide-bodied choanomastigotes constricted slightly in anterior third to produce a vase-like shape" considered the typical forms of *Crithidia* (Wallace, 1966) are not always present, or are scarce, in the species of *Crithidia*. Moreover, species of other genera also exhibit vase-like flagellates alongside flagellates displaying truncated anterior ends, as shown for *Angomonas* and *Strigomonas* (Teixeira et al., 2011). By their turn, opisthomastigotes are not necessarily

present in molecularly validated species of *Herpetomonas* (Borghesan et al. 2012) while *Leptomonas* remained orphan of diagnostic morphological characteristics.

By the end of the XX$^{th}$ century, molecular techniques begun to reach the taxonomy of the trypanosomatids and a new conflict emerged, the conflict between morphological and molecular taxonomic criteria (Yurchenko et al., 2008). This conflict became more and more apparent as the number of molecularly examined insect trypanosomatids increased. Moreover, the criteria proposed by Hoare and Wallace (1966) contemplated only the four genera of insect trypanosomatids recognized at the time: *Herpetomonas, Crithidia, Blastocrithidia* and *Leptomonas* (Wallace 1966). The ensuing utilization of molecular methods unveiled a hitherto unknown diversity of insect trypanosomatids (Podlipaev 2000, 2001; Maslov et al., 2013) in need of taxonomic guidelines. Initially, *Crithidia* and *Herpetomonas* showed to conceal highly distinct species (Camargo et al., 1992; Fernandes et al., 1997; Teixeira et al., 1999) that afterwards moved out of these genera to constitute the phylogenetically validated genera *Angomonas* and *Strigomonas* (Teixeira et al., 2011). The revision of the genus *Herpetomonas* gave to the genus a consistent phylogenetic delimitation (Borghesan et al, 2013). In addition, two new genera were created for dipterans trypanosomatids: *Sergeia* (Svobodová et al., 2007) and *Kentomonas* (Votpýka et al., 2014).

*Leptomonas* was long time ago showed to be a heterogeneous group of flagellates by biochemical and molecular markers (Sbravate et al., 1989; Camargo et al., 1992). Phylogenetic studies of Merzlyak et al. (2001) confirmed the polyphyly of the genera *Leptomonas*. Thereafter, some species of *Leptomonas* was renamed to create the genera *Blechomonas* (flea parasites) and *Wallaceomonas* on molecular phylogenetic bases (Votýpka et al 2013; Kostygov et al 2014). Thus, in the last 15 years the number of genera more than doubled thanks to molecular methods for taxa recognition. In spite of these advances, phylogenetic analyses still reveal certain untidiness in the taxonomy of the insect trypanosomatids, particularly with respect to *Leptomonas* and *Crithidia*, which were the only insect trypanosomatids included in the Leishmaniinae subfamily. The inspection of phylogenetic trees shows that, despite recent taxonomic rearrangements, a large number of flagellates erratically positioned remain assigned to *Leptomonas* and *Crithidia* what renders these genera clearly polyphyletic (Maslov et al., 2010, 2012; Votpýka et al., 2009, 2012; Yurchenko et al., 2008; Runkel et al., 2014; Wilfert et al., 2011; Týč et al., 2013).

The clarification of the remaining conflicts between phylogenetic and morphological classifications requires a stepwise modern appraisal of the taxonomy of *Leptomonas* and *Crithidia*. Due to complex branching patterns indicated by currently phylogenies, the analysis of species assigned to the two genera should be carried out by successive steps. The success of this “by steps” strategy is exemplified by the recent molecular dissection of *Leptomonas* and *Wallaceina* that resulted respectively in the creation of the genus *Blechomonas* (Votýpka et al., 2013,) and *Wallacemonas* (Kostygov et al., 2014). In spite of these successes, the genus *Crithidia* and *Leptomonas* still remain polyphyletic in all phylogenetic trees displayed in several publications of the last years, as recently pointed out by Kostygov et al. (2014).

Aiming to analyze further the genera *Crithidia* and *Leptomonas*, we chose to barcode a large sample of insect flagellates, using a select core of trypanosomatids, including reference species, as a taxonomic guide. For

this purpose we barcoded 593 flagellates from our collection using V7V8 SSU rRNA sequences. This procedure served to disclose groups of isolates sharing sequences with members of Leishmaniinae, which we further examined through phylogenetic inferences based SSU rRNA, gGAPDH and Cathepsin B (CATB) sequences. From these phylogenetic analyses resulted the delimitation of the genus *Crithidia*, the creation of two new genera formerly placed within the genus *Crithidia* and the recognition of a large monophyletic core of *Leptomonas* spp. The taxonomic reallocation of flagellates formerly assigned to *Crithidia* and the description of new taxa is a consequence of the phylogenetic validation of this genus based on analysis of large sampling, from wide host species and geographical ranges, using new molecular markers. We are well aware that taxonomic proposals are provisionary and need validation by continued analyses throughout time. This study is a contribution in that direction.

## MATERIAL AND METHODS

### Organisms and cultures.

The Trypanosomatid Culture Collection of the University of São Paulo presently harbors 2,500 cultures of flagellates. Routinely, upon inclusion in the collection the predominant morphotype of each new isolate is registered. This procedure serves only as preliminary information waiting for further analyses and cloning of the isolates. The sample examined in this study comprised 493 cultures of trypanosomatids isolated from insects and registered as having a promastigote/choanomastigote morphology. For comparison, the analyses also included gene sequences of flagellates recovered from GenBank (Table1). Cultures were routinely grown at 28º C in LIT or FYTS media (Camargo, 1964, Mundim et al., 1974).

### Morphological analysis by light and Scanning electron microscopy.

Smears of logarithmic phase cultures were fixed in methanol, stained with Giemsa. and photographed with a digital camera. For scanning electron microscopy (SEM), cultures were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde plus 1% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2), adhered to 0.1% (v/v) poly-L-lysine-coated coverslips, post-fixed in 1%(w/v) OsO4 in 0.1 M cacodylate buffer for 30 min, dehydrated in an ascending ethanol series, critical point-dried with CO2 in a Balzers CPD 030, sputtered with gold in a Sputter Coater SCD050 Balzers), and observed using a Fei Company – Quanta 250 Digital Scanning Microscope.

### PCR amplification, sequencing and data analyses of three sequences.

Total DNA was extracted from cultured flagellates using the traditional phenol-chloroform method. PCR amplification of the V7V8 region of the SSUrRNA, whole SSU rRNA and gGAPDH genes were done using oligonucleotides and reaction conditions described previously (Teixeira et al., 2011, Borghesan et al., 2013). The amplification of Cathepsin B-like (CATB) genes was done under the same reaction conditions adopted for the other genes using the following primers: CATBF 5´AAG GCG AAG GGY CAG TGG AC-3´ and CATBR 5´-CCA GCT GTT SGC RAT CTT CC -3´. PCR-amplified sequences were cloned using the TA Cloning Kit (Carlsbad CA, US). From one to five clones were sequenced for each gene of each trypanosomatid isolate. Sequences were deposited in GenBank. Sequences were

aligned using CLUSTALX (Thompson et al., 1997), and manually refined. Three alignments were generated for Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML), and Bayesian inference (BI) analyses: A1, consisting of the SSUrRNA sequences without regions of ambiguous alignment (2.095 characters); A2, containing the gGAPDH sequences (838 characters); and A3, consisting of concatenated SSUrRNA and gGAPDH sequences (3.011 characters obtained using a published alignment (ALIGN001079) that includes a large set of taxa for guidance (Hamilton et al., 2004). All alignments used in this study are available from the authors upon request.

The MP and bootstrap analyses used the PAUP* version 4.0b10 software (Swofford 2002), with 500 random sequence addition replicates followed by branch swapping (RAS-TBR). The ML analyses used RAxML v.2.2.3 (Stamatakis 2006) as described previously (Ferreira et al., 2007). The general time reversible (GTR) model of nucleotide substitution with proportion of invariable sites and gamma distribution was selected for the gene data sets. We used the GTR model in individual analyses of each gene as well as in the combined Bayesian analyses, which was run for 1,000,000 generations with trees sampled every 100 generations using four chains, and 25% of the early sample trees were discarded as "burn-in".

**Table 1.** Trypanosomatids sequences from SSU rRNA and gGAPDH genes, retrieved from GenBank and used in this study

| | GeneBank accession number | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Species** | **SSU rRNA** | **gGAPDH** | **Host** | **Contry** |
| *Angomonas ambiguus* | HM593015.1 | HM593019.1 | *Chrysomya albiceps* | Brazil |
| *Angomonas deanei* | HM593011.1 | EU079132.1 | *Zelus leucogrammus* | Brazil |
| *Angomonas desouzai* | HM593016.1 | HM593020.1 | *Ornidia obesa* | Brazil |
| *Blastocrithidia miridarum* | EU079128.1 | EU084896.1 | *Leptopterna dolabrata* | Russia |
| *Blechomonas danrayi* | KF054136.1 | KF054095.1 | *Chaetopsylla globiceps* | Czech Republic |
| *Blechomonas pulexsimulantis* | KF054129.1 | KF054091.1 | *Pulex irritans* | Czech Republic |
| *Crithidia abscondita* | EU079126.1 | EU076606.1 | *Largus sp.* | Ecuador |
| *Crithidia bombi* | FN546181.1 | GU321192.1 | *Bombus lucorum* | Switzerland |
| *Crithidia brachyffagelli* | JF717839.1 | JF717835.1 | *Prepos cf. accinctus* | Costa Rica |
| *Crithidia brevicula* | AF153045.2 | AF316620.1 | *Nabis brevis* | Russia |
| *Crithidia confusa* | JF717837.1 | JF717832.1 | *Largus maculatus* | Costa Rica |
| *Crithidia dedva* | JN624299.1 | - | *Chaetopsylla globiceps* | Czech Republic |
| *Crithidia expoeki* | GU321195.1 | GU321193.1 | *Bombus lucorum* | Switzerland |
| *Crithidia fasciculata* | Genome | AF047493.1 | *Anopheles quadrimaculatus* | EUA |
| *Crithidia inconstans* | AF153044.2 | EU076608.1 | *Colocoris sexgultatus* | Russia |
| *Crithidia insperata* | EU079125.1 | EU076605.1 | *Leptopetalops sp.* | Ecuador |
| *Crithidia luciliae* | - | AF053740.1 | *Phaenicea serricta* | EUA |
| *Crithidia mellifica* | KM066226.1 | JF423199.1 | *Apis mellifera* | Belgium |
| *Crithidia pachysarca* | JF717836.1 | JF717831.1 | *Largus maculatus* | Costa Rica |
| *Crithidia permixta* | EU079127.1 | EU076607.1 | *Heteroptera, Miridae* | Ecuador |
| *Crithidia pragensis* | KC205988.1 | KF482060.1 | *Cordilura albipes* | Czech Republic |
| *Crthidia otongatchiensis* | KC205989.1 | KF482058.1 | *Eristalis sp.* | Ecuador |
| *Herpetomonas muscarum* | JQ359715 | JQ359749 | *Megaselia scalaris* | EUA |
| *Herpetomonas samuelpessoai* | JQ359716 | JQ359743 | *Zelus sp.* | Brazil |
| *Kentomonas sorsogonicus* | KM242075.1 | KM242072.1 | *Sarcophaga sp.* | Philippines |
| *Leotomona acus* | DQ910923.1 | DQ910926.1 | *subtribo Eccritotarsina* | Ecuador |
| *Leptomonas barvae* | FJ968532.1 | FJ968529.1 | *C. oleosa* | Costa Rica |
| *Leptomonas bifurcata* | DQ910925.1 | DQ910928.1 | *Pachypoda sp.* | Costa Rica |
| *Leptomonas costarricensis* | DQ383648.1 | DQ383650.1 | *Ricolla simillima* | Costa Rica |
| *Leptomonas jadarae* | EU079123.1 | EU076603.1 | *Jadera obscura* | Costa Rica |
| *Leptomonas moramango* | KC205990.1 | KF482059.2 | *Pachycerina vaga* | Madagascar |
| *Leptomonas neopamarae* | DQ910924.1 | DQ910927.1 | *Neopamera sp.* | Costa Rica |
| *Leptomonas podlipaevi* | DQ383649.1 | DQ019000.1 | *Boisea rubrolineata* | EUA |
| *Leptomonas pyrrhocoris* | JN036653.1 | AY029072.1 | *Pyrrhocoris apterus* | Czech Republic |
| *Leptomonas scantii* | JN036654.1 | JN036652.1 | *Scantius aegyptius* | France |
| *Leptomonas seymouri* | AF153040.2 | AF047495.1 | *Dysdercus suturalis* | EUA |
| *Leptomonas spiculata* | JF717838.1 | JF717833.1 | *Proba sallei* | Costa Rica |
| *Leptomonas tarcoles* | EF546786.1 | EF546787.1 | *Prepops sp.* | Costa Rica |
| *Leptomonas tenua* | JF717839.1 | JF717834.1 | *Monopsyllus sciurorum* | Czech Republic |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Lotomaria passum* | KM066239.1 | KM066224.1 | *Apis mellifera* | Belgium |
| *Phytomonas serpens* | AF016323 | EU084894.1 | *Phtia picta* | Brazil |
| *Sergeia podlipaevi* | DQ394362.1 | DQ394365.1 | *Culicoides festivipennis* | Czech Republic |
| *Strigomonas culicis* | U05679.1 | EU079136.1 | *Aedes vexans* | EUA |
| *Strigomonas galati* | HM593010.1 | HM593018.1 | *Lutzomyia almerioi* | Brazil |
| *Strigomonas oncopelti* | AF038025 | EU079134.1 | *Oncopeltus sp.* | EUA |
| *Wallaceina raviniae* | KC205996.1 | KF482057.1 | *Ravinia sp.* | Ecuador |
| *Wallacemona collosoma* | AF153038.1 | EU084899.1 | *Gerris dissortis* | EUA |

## RESULTS AND DISCUSSION

### V7V8 SSU rRNA barcoding

Preliminary comparisons of V7V8 rRNA sequences (barcodes) of insect flagellates displaying pro- and choanomastigotes in culture revealed that 305 isolates out of the 493 examined nested with representatives of the genera *Angomonas, Herpetomonas, Leishmania, Wallaceomonas* and *Phytomonas.* The comparison of the barcodes from 188 remaining isolates and 40 named species of *Crithidia, Leptomonas* and *Leishmania* resulted in the dendrogram represented in the Figure 1 (not all isolates were included). In general, the dendrogram conveys a disordered image of the taxonomy of the insect trypanosomatids evidencing that some isolates disperse erratically through the dendrogram as solitary organisms not associated to any group of flagellates, like *L. moramango* and *L. barvae*. In addition, some *Leptomonas* spp. clusters with some *Crithidia* spp. rendering obvious the polyphyly of both genera. Nevertheless, some flagellates gather orderly around reference trypanosomatid species forming well-defined clades with strong supports. This is the case of the clades headed respectively by *C. fasciculata* (CLADE 1), *C. luciliae thermophila* (CLADE 2), *C. achantocephali* (CLADE 3) and *Leptomonas seymoury*, in addition to the *Leishmania* clade. The CLADE 1 includes 10 new isolates plus *C. luciliae, C. guilhermei* and *C. hutneri* in addition to the three strains of *C. fasciculata* from ATCC. The CLADE 2 includes *C. luciliae thermophila*, *C. confusa* and *C. insperata* plus 67 new isolates. The CLADE 3 includes *C. acanthocephali* and four new isolates. In addition to these clades, flagellates also aggregate in two small groups (shadowed in blue in the Fig. 1). One of these two groups, herein named CLADE 4, harbours *Crithidia brevicula, C. permixta, C. pragensis, C. inconstans* and *C. abscondita.* The other group, CLADE 5, harbours only flagellates parasitic in bees, *Lotaria passim, C. bombi, C. expoeki and C. mellificae.* These clades require further taxonomic revision and some species of *Crithidia* should be placed in new genera. However, in this study we are leaving them out of our comparative analysis.

The *Leptomonas* clade includes *L. pyrrhocoris*, *L. seymouri, L. scantii, L. jaderae, L. podlipaevi, L. neopamerae* and 24 new isolates (not all included). Another clade was formed by *Leptomonas costarricensis* plus 5 isolates, whereas the *Leishmania* clade includes the classical species of *Leishmania* plus *Endotrypanum*.

### Concatenated SSU rRNA and gGAPDH sequence analyses.

Sequences of SSU rRNA and gGAPDH genes are currently of standard use in phylogenetic and taxonomic studies of the Trypansomatidae including insect trypanosomatids (Teixeira et al., 2011; Borghesan et al., 2013, Votýpka et al., 2013; Schwarz et al., 2015;

Yurchenko et al., 2014; Kostygov et al., 2015). In the present study, independent (data not shown) and combined V7V8 SSUrRNA and gGAPDH sequences (Fig. 2) were used for phylogenetic inferences trees. The inferred trees confirmed the overall taxonomic organization of the insect trypanosomatids delineated in the V7V8 SSUrRNA dendrogram. In all phylogenetic trees, CLADES 1, 2 and 3 consistently emerged as distinct taxons of flagellates, alongside *Leishmania* and *Leptomonas,* with high support values. The major clades 1, 2 and 3 are represented respectively by 8, 8 and 4 distinct new isolates from various insect hosts.

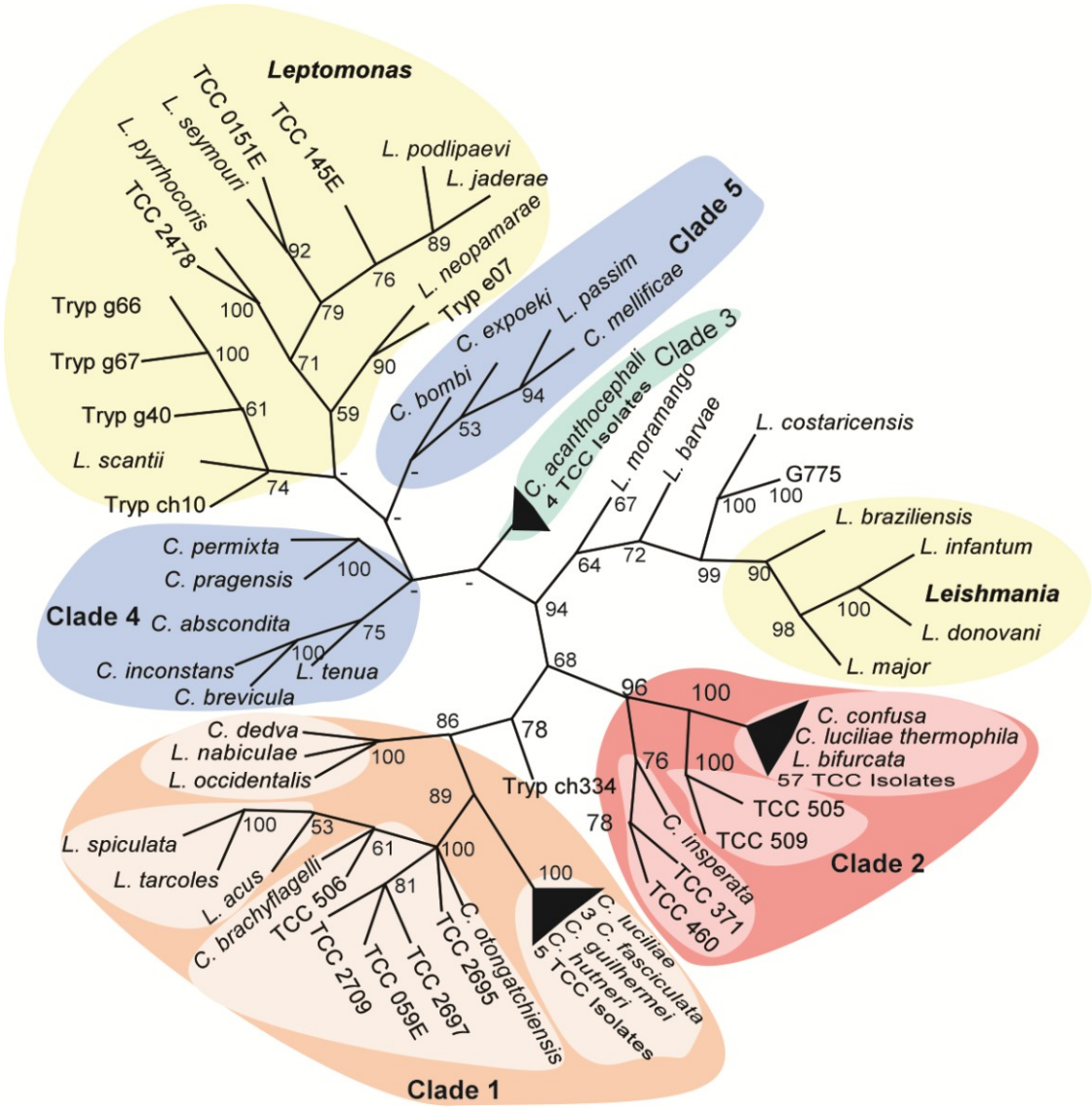



**Figure 1 -** Dendogram based on V7V8 SSUrRNA sequences inferred by maximum parsimony method of trypanosomatids of Leishmaniinae subfamily. Support values below 50% are represented by (-).

The small clades 4 and 5 (shadowed in blue in the Figure 1) are corroborated in the Figure 2. The gGAPDH sequence divergences between the major clades are: 4.6% between CLADES 1 and 2; 5.4% between CLADES 1 and 3; and 6.0% between CLADES 2 and 3. The topology of the phylogenetic tree underscored by the degrees of gGAPDH sequence divergences permit to propose for these clades the taxonomic status of genera,

and the status of species to the clusters of flagellates that compose each clade (see Taxonomic Section). Isolates characterized in this study are on the Table 2.

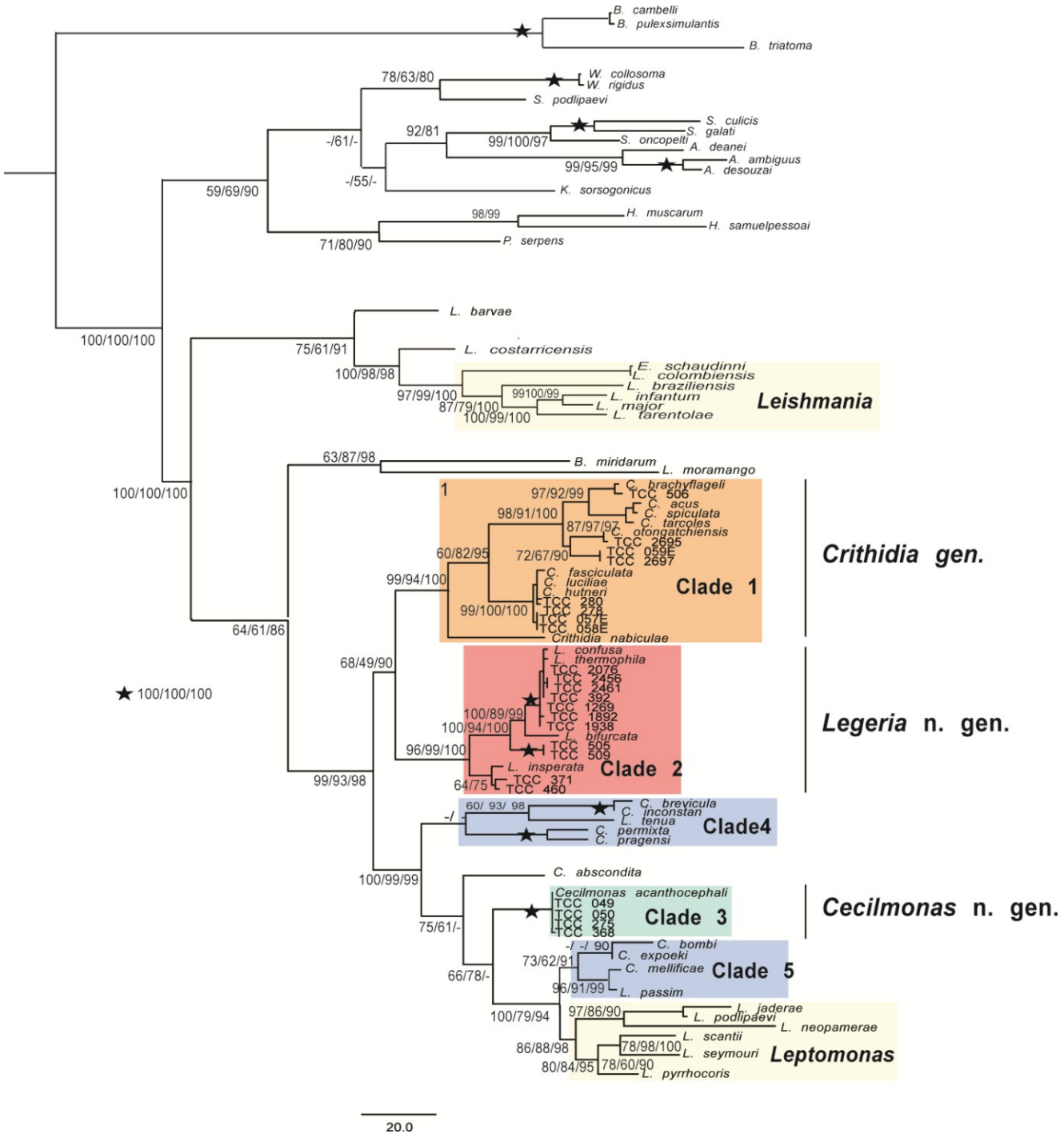



**Figure 2 -** Phylogenetic analyses of concatenated sequences from V7V8 SSUrRNA and gGAPDH genes of isolates and species of the subfamily Leishmaniinae (MP, ML and BI). The Clade 1 represent the *Crithidia* genus; Clade 2 and Clade 3 represent the new genera *Legeria* and *Cecilmona,* respectively. Bootstrap support below 50% is represented by (-).

**Table 2.** Trypanosomatid isolates characterized in this study, host and geographical origin

| | | | Host species | | Geographical | origin |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **TCC[a]** | **Species** | **Order** | **Family** | **Species** | **State** | **Country** |
| 050E | *Crithidia thermophila* | Hemiptera | Reduviidae | *Zelus leucogrammus* | Goiania | Brazil |
| 33 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | São Paulo | Brazil |
| 47 | *Legeria sp.* | Hemiptera | ND | ND | Paraná | Brazil |
| 71 | *Legeria sp.* | Solanales | Solanaceae | *Solanum lycopersicum* | Paraná | Brazil |
| 241 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | Paraná | Brazil |
| 268 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Zelus leucogrammus* | ND | Brazil |
| 342 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Acanthischium sp* | Rondonia | Brazil |
| 387 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Largidae | *Largus sp* | Rondonia | Brazil |
| 389 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinolla* | Rondonia | Brazil |
| 392 | *Legeria sp.* | hemiptera | Largidae | *Largus sp1* | Rondonia | Brazil |
| 459 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Coreidae | *Phthias picta* | ND | ND |
| 471 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Largidae | *Largus sp1* | Rondonia | Brazil |
| 497 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinolla* | Rondonia | Brazil |
| 503 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinolla* | Rondonia | Brazil |
| 1265 | *Legeria sp.* | Diptera | Muscidae | *Brontaea sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1268 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | *Chrysomya putoria* | Sofala | Mozambique |
| 1269 | *Legeria sp.* | Hemitpera | Alydidae | *Riptortus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1664 | *Legeria sp.* | Hemiptero | Pyrrhocoridae | *Odontopus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1889 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1890 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Alydidae | *Riptortus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1892 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Alydidae | *Riptortus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1893 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 1938 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | Sofala | Mozambique |
| 2017 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | ND | Guinea Bissau |
| 2042 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Rhynocoris albopilosus* | ND | Guinea Bissau |
| 2073 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2074 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2075 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2076 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2077 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2078 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2079 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2082 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2084 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2085 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2086 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Mato Grosso do Sul | Brazil |
| 2357 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | Sofala | Mozambique |
| 2358 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | ND | Sofala | Mozambique |
| 2358 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | ND | Sofala | Mozambique |
| 2371 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | ND | Zulia | Venezuela |
| 2371 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | ND | Zulia | Venezuela |
| 2372 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Coreidae | ND | Zulia | Venezuela |
| 2372 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Coreidae | ND | Zulia | Venezuela |
| 2375 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp* | Sofala | Mozambique |
| 2405 | *Legeria sp.* | Diptera | Moscas | ND | Mérida | Venezuela |
| 2405 | *Legeria sp.* | Diptera | Mosca | ND | Mérida | Venezuela |
| 2456 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Tolima | Colombia |
| 2461 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Coreidae | *Hypselonotus sp.* | Tolima | Colombia |
| 2494 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Tocantins | Brazil |
| 2614 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Tocantins | Brazil |
| 2621 | *Legeria sp.* | Diptera | Caliphoridae | ND | Tocantins | Brazil |
| 2647 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Zelus sp.* | Zulia | Venezuela |
| 2649 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | predador | Zulia | Venezuela |
| 2710 | *Legeria sp.* | Diptera | Mosca | ND | Tocantins | Brazil |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2719 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | Panamá | Panama |
| 2720 | *Legeria sp.* | Diptera | Mosca | ND | Tocantins | Brazil |
| 2870 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | ND | Apure | Venezuela |
| 2870 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | ND | Apure | Venezuela |
| 371 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Pyarrthochoridae | *Dysdercus sp.* | Rondonia | Brazil |
| 460 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Largidae | *Largus sp.* | Rondonia | Brazil |
| 505 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | Rondonia | Brazil |
| 509 | *Legeria sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | Rondonia | Brazil |
| 040E | *C. fasciculata* | Diptera | Culicidae | *Anopheles quadrimaculatus* | ND | EUA |
| 041E | *C. fasciculata* | Diptera | Culicidae | *Culex pipens* | Minnesota | EUA |
| 042E | *C. fasciculata* | Diptera | Culicidae | *Culex sp.* | ND | EUA |
| 046E | *C. hutneri* | Hemiptera | Reduviidae | *Cosmoclopius sp.* | Goiania | Brazil |
| 038E | *C. f. luciliae* | Diptera | Calliphoridae | *Phaenicea serricta* | Minnesota | USA |
| 075E | *C. guilhermei* | Diptera | Calliphoridae | *Phaenicea cuprina* | Rio de Janeiro | Brazil |
| 059E | *Crithidia sp.* | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | Rio de Janeiro | Brazil |
| 058E | *Crithidia sp.* | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | Rio de Janeiro | Brazil |
| 057E | *Crithidia sp.* | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | Rio de Janeiro | Brazil |
| 240 | *Crithidia sp.* | Planta | ND | *Mourus sp.* | Paraná | Brazil |
| 278 | *Crithidia sp.* | Hemiptera | Pyrrhocoridae | *Dysdercus sp.* | Paraná | Brazil |
| 280 | *Crithidia sp.* | Hemiptera | Pentatomidae | *Nezara viriduia* | Paraná | Brazil |
| 059E | *Crithidia sp.* | Diptera | Culicidae | *Anopheles scapulatus* | Rio de Janeiro | Brazil |
| 2695 | *Crithidia sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | Panamá | Panama |
| 2697 | *Crithidia sp.* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla sp.* | Panamá | Panama |
| 2709 | *Crithidia sp.* | Diptera | mosca | ND | Tocantins | Brazil |
| 92E | *L. nabiculae* | Hemiptera | Nabidae | *Nabicula flavomarginata* | Kaliningrad | Russia |
| 89E | *L. occidentalis* | Hemiptera | Nabidae | *Nabicula flavomarginata* | Kaliningrad | Russia |
| 037E | *C. acanthocephali* | Hemiptera | Coreidae | *Acanthocephala femorata* | Georgia | EUA |
| 49 | *C. acanthocephali* | Hemiptera | Coreidae | *Veneza zonata* | Paraná | Brazil |
| 50 | *C. acanthocephali* | Hemiptera | Phyrrochoridae | *Dysdercus sp.* | Paraná | Brazil |
| 275 | *C. acanthocephali* | Hemiptera | Phyrrochoridae | *Dysdercus sp.* | Paraná | Brazil |
| 368 | *C. acanthocephali* | Hemiptera | Reduviidae | *Ricolla quadrispinosa* | Rondonia | Brazil |

[a] Codes of cultures of trypanosomes cryopreserved in the Trypanosomatid Culture Collection (TCC) of the Departament of Parasitology, University of São Paulo, SP, Brazil;

ND - non determined

**V7V8 SSU rRNA, gGAPDH and Cathepsin B genes combined phylogenetic analysis**

We added sequences of CATB genes to the present analysis because this single-copy gene of quite variable sequence has been used in the taxonomy of *Leishmania* spp. (Laurent et al., 2009; Chaouch 2013; Tsokana et al., 2014) and, then, might be also useful for the taxonomy of others taxons within Leishmaniinae. Inferred phylogenetic trees using CATB sequences showed topology congruent with results obtained using gGAPDH, V7V8 SSUrRNA + gGAPDH (Fig. 2) and V7V8 SSUrRNA + gGAPDH + CATB (Fig. 3). The analysis based on three loci confirmed the overall taxonomic organization of the insect trypanosomatids delineated in previous analyses and, in addition, resulted in better supported branching patterns. Besides the *Leishmania* and *Leptomonas* clades, the major CLADES 1, 2 and 3 consistently emerged as distinct clusters, with high bootstrap support. The clades 4 and 5 were also confirmed as separate taxons (Figure 3).

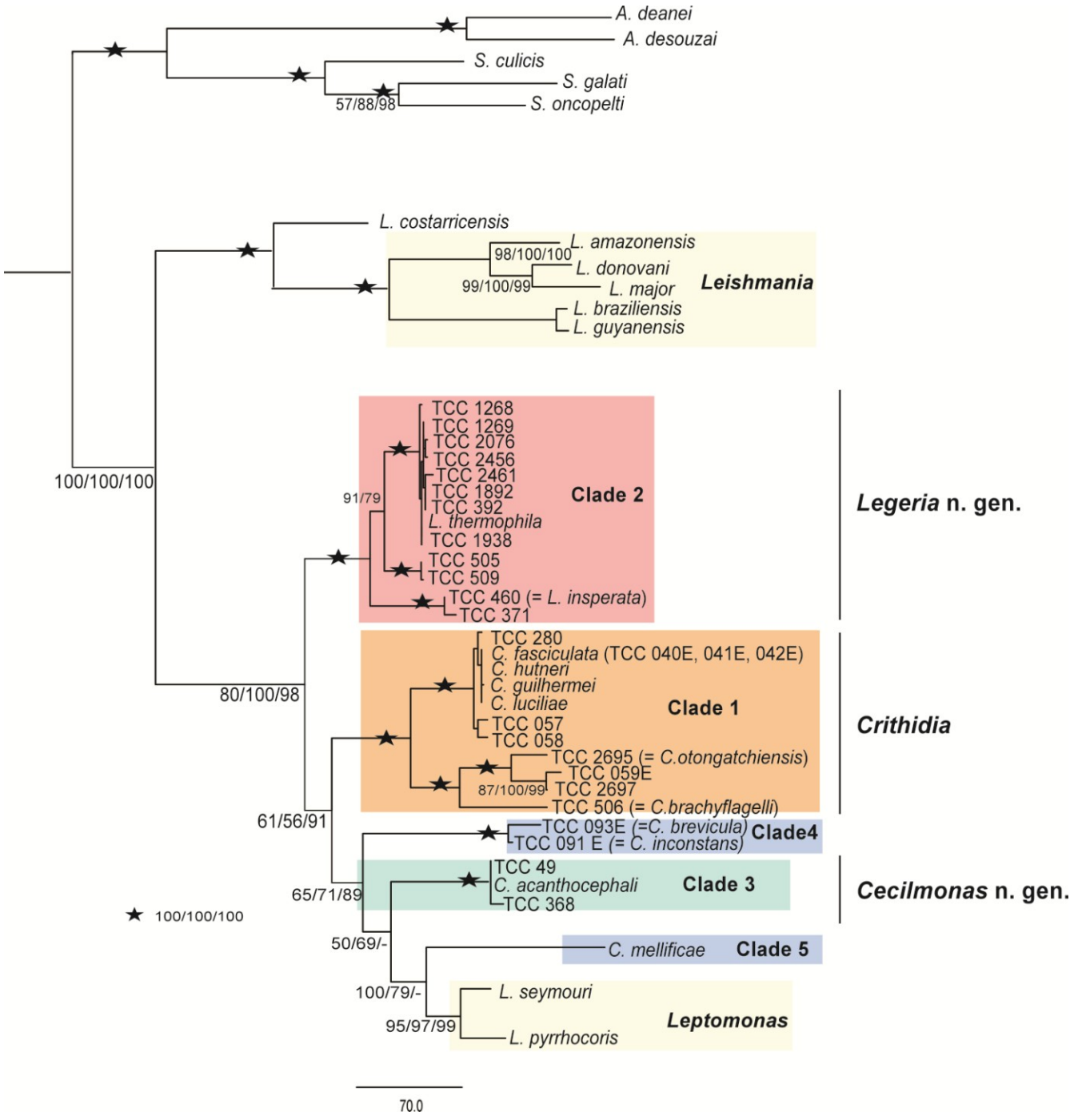



**Figure 3 -** Phylogenetic analyses of concatenated sequences from V7V8 SSUrDNA, gGAPDH and Cathepsin B genes of isolates and species of the subfamily Leishmaniinae (MP, ML and AB). The Clade 1 represent the *Crithidia* genus; Clade 2 and Clade 3 represent the new genera *Legeria* and *Cecilmona,* respectively. Bootstrap support below to 50% is represented by (-).

**Detailed analysis of the clades supported by phylogenetic analyses**

Cathepsin sequences of insect trypanosomatids are rare in the literature what limits the size of the sampling included in the tree (Figure. 3). However, the number of available SSU rRNA and gGAPDH sequences of trypanosomatids, several determined in the present study, is sufficiently large to permit a detailed analysis of each major clades well supported within the Leishmaniinae (Figure 4).

**CLADE 1 - The genus *Crithidia***. The inferred phylogenetic tree (Fig. 4A), comprising 17 flagellates, shows that a major subgroup or Cluster A (>98 bootstrap support) is composed by three strains of *Crithidia fasciculata* diverging less than 0.1%. This cluster also includes a cohort of named trypanosomatids (*C. hutneri, C. guilhermei* and *C. luciliae*) plus 11 unnamed isolates, which gGAPDH divergences from *C. fasciculata* are null or smaller than 0.1%. The CLADE 1 also harbours five smaller clusters (B-F) of flagellates: The cluster B comprehends *C. brachyflagelli* and the isolate TCC 506; A and B diverge 2.7% from each other. The cluster C comprises *C. otongatchiensis* and an identical isolate (TCC 2695) diverging ~3.0% from the cluster A. The cluster D comprehends the almost identical isolates TCC 059 and TCC 2697 that diverges ~2.5% from the other clusters. These isolates correspond to a new species to be opportunely described. The cluster E harbours three former species of *Leptomonas: L. tarcoles, L. acus* and *L.spiculata,* diverging about 2.5-3.0% from the other clusters. These *Leptomonas* species will be renamed as new combinations of *Crithidia* (see Taxonomy). Finally, the cluster F was constituted by *C. dedva* and two identical flagellates TCC 089E and TCC 092E, which diverged 4.6% from the cluster A. The present inclusion of the clade F in the genus *Crithidia* does not prevent its eventual splitting into additional genera as the sample of Leishmaniinae gets larger. The branching pattern of CLADE 1 is in accordance with those of phylogenetic trees inferred by Yurchenko et al. (2014), Votýpka et al. (2013), and Kostygov et al. (2014).

Divergences of gGAPDH sequences within the CLADE 1 are quite small: < 0.1% in cluster A, ~0.2% in B and C, 0.5% in cluster D, 0 % in cluster E and 0.2 - 0.7% in the most heterogeneous cluster F. The divergences between the clusters permit to consider them as separate species. In the Taxonomy section, CLADE 1 will be equated with the genus *Crithidia,* harbouring its type species *C. fasciculata.*

**CLADE 2 - The Genus *Legeria***. The inferred phylogenetic tree based on V7V8 SSUrRNA + gGAPDH sequences of flagellates of the CLADE 2 strongly supported a monophyletic assemblage comprising *C. l. thermophile* (Fig. 4B). The divergences of gGAPDH sequences between the four clusters within the CLADE 2 ranged from 2.2% to 2.8%. Cluster A is constituted by *C. insperata* and the isolates TCC 371 and TCC 460 showing divergences smaller than 0.5%. Cluster B is represented exclusively by *Leptomonas bifurcata*, now *Legeria bifurcata*. Cluster C includes the identical isolates TCC 505 and TCC 509, which correspond to a new species to be opportunely described. The large cluster D is constituted by *C. l. thermophila* and *C. confusa* plus 57 new isolates, with gGAPDH sequence divergences smaller than 0.1%. The overall genetic diversity (4.6% of gGAPDH divergence) between CLADES 1 and 2 are large enough to consider the two clades as distinct genera within the subfamily Leishmaniinae. Accordingly,

we are proposing to designate the CLADE 2 as *Legeria* n. gen. (see Taxonomic Section).

**CLADE 3 - The genus *Cecilmonas*.** The inferred phylogenetic relationships based on SSUrRNA/gGAPDH sequences among the flagellates of CLADE 3 (Fig. 4C) revealed that this clade, composed by former *Crithidia acanthocephali* and four new isolates, are separated by gGAPDH sequence divergences of 5.5% from the CLADE 1 and 6.0% from the CLADE 2. The gGAPDH sequence divergences between the five flagellates of CLADE 3 are small: 1.0% between TCC 368 and the four almost identical isolates. Together, the five isolates form a new genus to be designated *Cecilmonas* n. gen. in the Taxonomic section. Although the isolates come from distinct hemipteran hosts from quite apart geographical regions, from the USA to Southern Brazil, they correspond to a single species, *Cecilmonas acanthocephali* with the isolate TCC 368 remaining as a different genotype within this species.

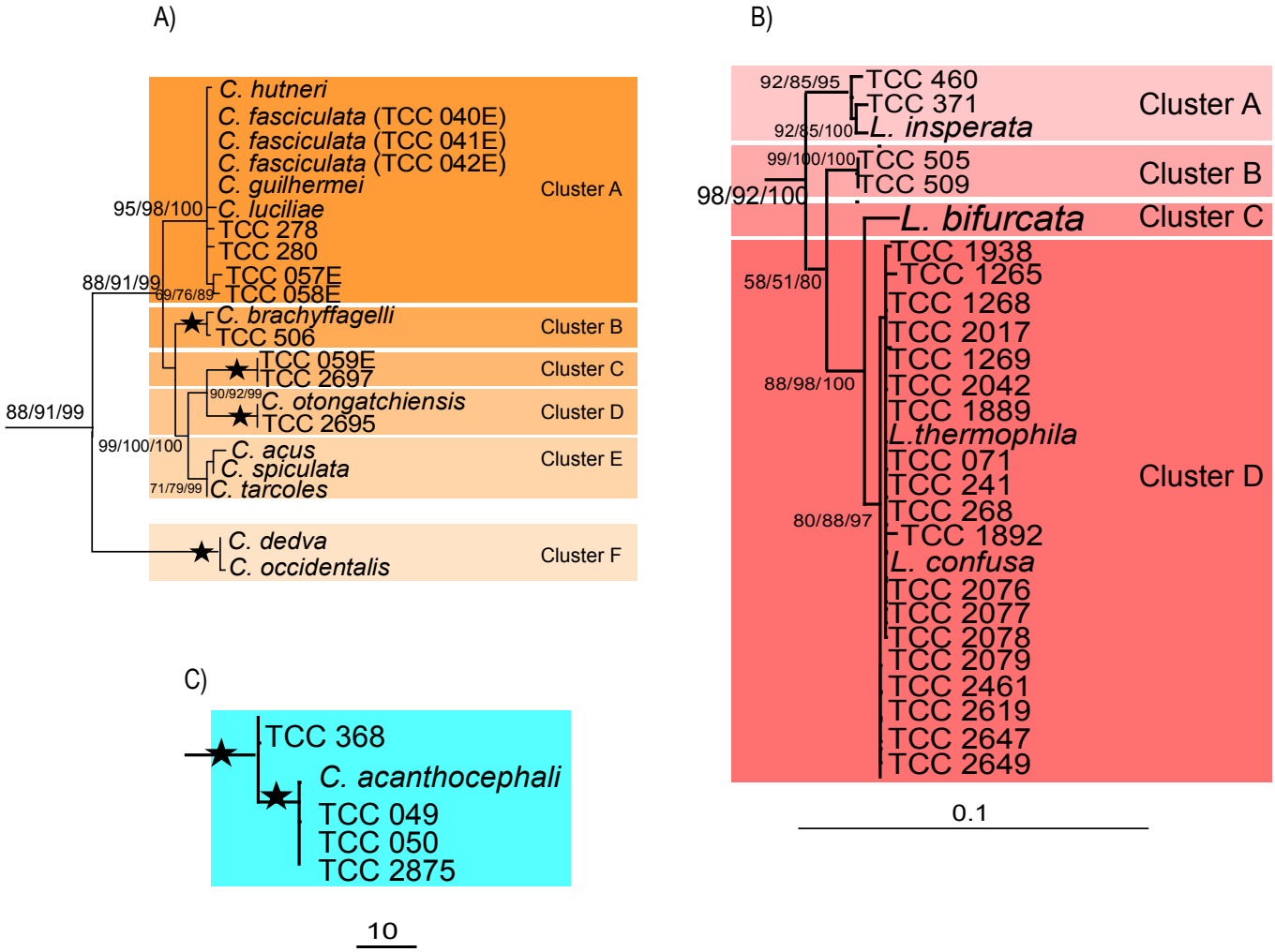



**Figure 4** - Intra Clade analysis on basis of concatenate sequences of V7V8 SSUrRNA and gGAPDH genes. A) *Crithidia* separate in six cluster (A-F). B) *Legeria* genus separate in 4 clusters (A-D). C) *Cecilmonas* genus.

**CLADE Leptomonas**. The clade *Leptomonas* comprises *L. scantii, L. seymouri, L. neopamerae, L. podlipaevi, L. pyrrhocoris* and 24 new isolates (not including). The group, although rather heterogeneous, is clearly monophyletic, forming a strongly supported clade. The divergences between the named species are large, from 4.0% to 6.0%, except between *L. podlipaevi* and *L. jaderae* that diverged 2.0%. Thus, the clustering of species of *Leptomonas* (Figure. 1-3) result to be undoubtedly monophyletic when purged of misnamed *Leptomonas* species, such as *L. costarricensis*, that actually nest in other Leishmaniinae clades. Our findings for this clade agreed with phylogenetic studies from Yurchenko et al. (2014), Votýpka et al (2013) and Kostygov et al. (2014). However, the possibility cannot be ignored that the analysis of a larger sample of new isolates may subdivide this clade into at least two genera since gGAPDH sequence divergences among clusters within this clade are very large, comparable with the divergences separating the Clades 1, 2 and 3 that are being designed as separated genera.

**CLADE Leishmania:** This clade is not the central object of this study, but is analysed in order to compose the general picture of the insect trypanosomatids taxonomy as part of the subfamily Leishmaniinae. In all analyses, various *Leishmania* spp. were included in a strongly supported major monophyletic assemblage also containing, as showed by previous studies, the species of *Endotrypanum.* The taxonomic revision of *Endotrypanum* is matter of discussion for another forum.

**Morphologycal features of the flagellates assigned to *Crithidia*, and *Legeria*.**

Flagellates of the three genera here described resemble each other in their general appearance and their morphological features are not useful as exclusive diagnostic parameter neither of genera or species. Flagellates resembling pro- and choanomastigotes with truncated anterior ends occur in the cultures of the three species presented in Figure 5. However, besides individuals variation, the size of the flagellates varies with the age of the cultures and media composition. Even the shape of the flagellates varies under different conditions, their neck constriction appearing more accentuated in old cultures.

However, detailed comparative analyses of several isolates of each genus revealed some peculiarities. The flagellates of the genera *Crithidia*, here represented by *C. fasciculata,* seem to be longer, pointed and wider than those of *Legeria*, which are slender and showed forms of more variable size. The flagellates of *Cecilmonas* show more rounded forms of intermediary sizes (Figure 5). We have no information about how these flagellates look like in their original insect hosts, but morphological descriptions may be even more complicated because of the frequent occurrence of mixed infections. In spite of the limitations of morphology for taxa diagnosis, morphological descriptions should accompany molecular data in the proposal of a new species since a type material is a basic requirement for species designation. DNA is not yet considered as type material.

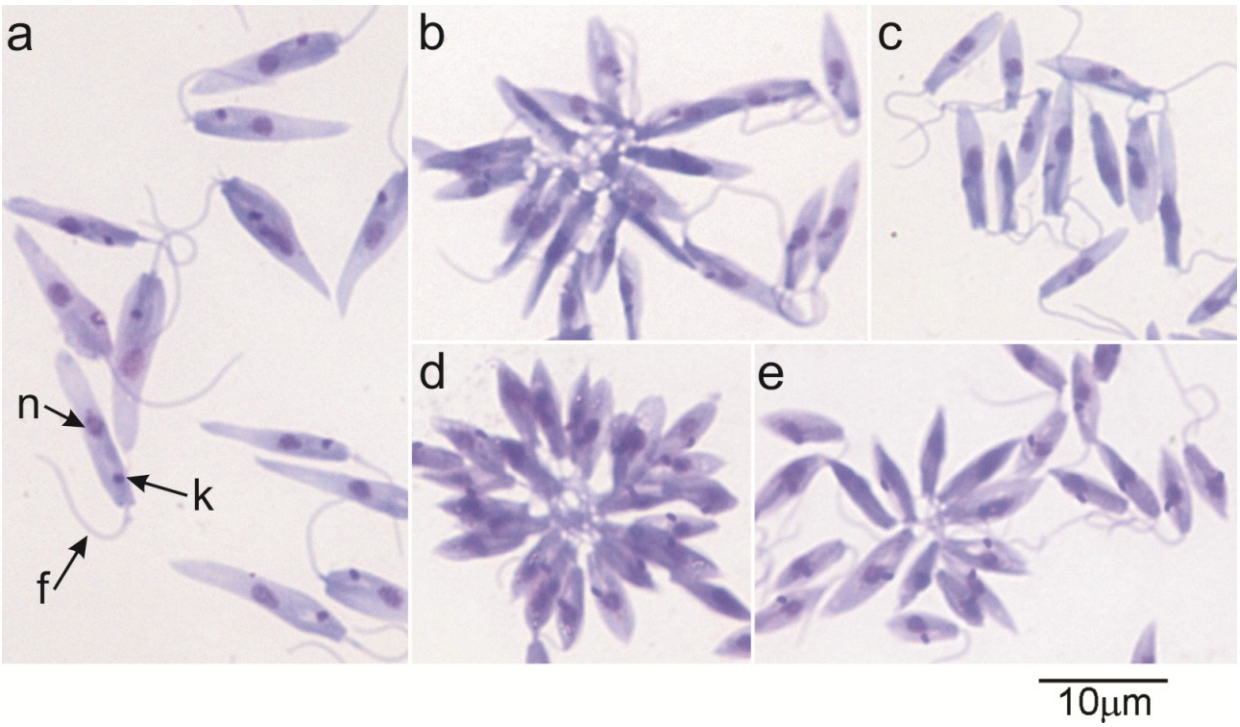



**Figure 5 -** Light microscopy of Monoxenic Trypanosomatid of Leishmaniinae subfamily stained with Giemsa: (a) *Critidia*; (b, c) *Legeria*; and (d, e) *Cecilmonas*. Arrows indicate: n: nucleus; k: kinetoplast; f: flagellum. Bars = 10µm.

**Taxonomic section: new genus and taxonomic amendments**

Phylum Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981; Class Kinetoplastea Konigberg, 1963; Order Trypanosomatida (Kent 1880) Hollande, 1952; Family Trypanosomatidae Doflein, 1901; Subfamily Leishmaniinae

The subfamily Leishmaniinae comprises the heteroxenous genera *Leishmania* and *Endotrypanum*, and the monoxenous genera *Crithidia* and *Leptomonas.* The taxonomic reappraisal of the genus *Crithidia* and the description of two new genera is the object of this study.

**1. Genus *Crithidia*** Léger 1902

**Redefinition and Diagnosis**: The genus *Crithidia* is redefined as a monophyletic group of flagellates according to analyses based on gGADPH, CATB and SSU rRNA genes from a representative set of insect trypanosomatids. The original description of Léger (1902) included among the morphotypes of *Crithidia*, flagellates with undulating membranes and flagellates resembling "barleycorn grains". These morphotypes are not present in the current definition of *Crithidia.* Wallace (1966) re-described the genus as formed by relatively small flagellates, usually shorter and wider than in other genera, and often constricted slightly in anterior third to produce a vase-like shape. This description defines more accurately the genus *Strigomonas* than the genus *Crithidia*, which is constituted by pro- and choanomastigotes varying in shape and size. Therefore, morphological characteristics are not diagnostic for *Crithidia*. Type species: *Crithidia fasciculata* Léger 1902 as herein redefined.

**1.1. Currently recognized species of *Crithidia***

In the literature, there are numerous species of *Crithidia*, however, most species are not cultivated and/or have not been molecularly analyzed. Although they preserve their historical validity, they cannot be included in the present study that involves only cultured species object of molecular phylogenetic analyses.

***Crithidia fasciculate*** (Léger 1902).

**Type material:** hapantotype, culture ATCC 11745, of which culture TCC 040E deposited at Trypanosomatid Culture Collection of the University of São Paulo (TCC-USP) is a duplicate. **Paratypes**: cultures of isolates TCC 041E (ATCC 12857), TCC 042E (ATCC 12858). The isolates TCC 057E and TCC58E from *Anopheles scapularis* are considered genotypes of *C. fasciculata*, but because of small sequence divergences are not designated paratypes. **Locality**: Ashokan, New York, USA. **Habitat:** the mosquito intestine. **Type host**: *Anopheles quadrimaculatus*, Diptera. Additional hosts in Table 2. **Morphology:** This species displays simultaneously classical promastigotes and choanomastigotes truncated at the anterior extremity (Figure 6). Giemsa-stained glass smears are deposited at TCC-USP. Measurements of cultured flagellates: body length, 12.5 – 19.5µm (15.5 ± 2.1); body width, 2.3 – 3.6 µm (3.0 ± 0.4 µm); free flagellum 6.2 – 14.7 µm (12.4 ± 2.3 µm). **Diagnosis**: Based on sequences deposited in Genbank. **Comments**: The original culture of *Crithidia fasciculata* Léger (1902) is lost. The type material and paratypes herein described correspond to flagellates recovered from different mosquitoes by different authors. ATCC 11745 (TCC 040E) originally from Noguchi (1929) deposited by Seymour Hutner; ATCC 12857 (TCC 041E) originally from Wallace (1942) deposited by Helen N. Gutman; and ATCC 12858 (TCC 042E) originally from Nöller (1917) and deposited by Helen N. Gutman. These cultures were deposited in ATCC in the 1950-60s and diverge from each other in less than 0.5% in gGAPDH sequences and are identical by comparing SSU rRNA and CATB gene sequences.

***Crithidia brachyflagelli*** (Maslov and Lukeš in Jirkú et al., 2012). This flagellate was isolated from the Miridae hemipteran *Prepos* sp. from Costa Rica. The isolate TCC 506, from a Brazilian predator Reduvidae share SSU rRNA and gGAPDH sequences identical to those of *C. brachyflagelli*. Therefore we consider TCC 506 a paratype of *C. brachyflagelli*. The position of TCC 506 in phylogenetic trees is quite distinct from any other *Crithidia* sp. corroborating *C. brachyflagelli* as a separate species of *Crithidia*. TCC 506 diverges about 2.7 % from *C. fasciculata* in gGAPDH sequences.

***Crithidia otongatchiensis*** (Votýpka and Lukeš in Yurchenko et al., 2014). This species from Ecuador was isolated from the dipteran Syrphidae *Eristalis* sp. It share SSU rRNA and gGAPDH sequences identical to those of isolate TCC 2695 from a *Ricolla* sp. predator hemipteran from Panamá City, Panamá. Therefore, we consider TCC 2695 a paratype of *C. otongatchiensis.* The position of TCC 2695 in phylogenetics trees based on all sequences examined confirms *C. otongogatchiensis* as a separate species of *Crithidia,* with ~3.0% of gGAPDH sequence divergences from *C. fasciculata*.

***Crithidia tarcoles*** (Yurchenko et al. 2008) n.comb. This flagellate, formerly described as *Leptomonas tarcoles* was isolated from the Miridae hemipteran *Prepos* sp. from Costa Rica. It is phylogenetically very close to *Leptomonas acus* and *L. spiculata. L. acus* was isolated

from a hemipteran Miridae from Ecuador and *L. espiculata* was isolated from the hemipteran Miridae, *Proba sallei* from Costa Rica (Yurchenko et al 2008, Jirkŭ et al. 2012). As already pointed out (Jirku et al 2012) their gGAPDH and SSU rRNA divergences are rather small. Actually, the gGAPDH divergences are less than 0.7% between *C. tarcoles* and *L. acus* and 0.2% between *C. tarcoles* and *L. spiculata*. They were considered as distinct species on the basis of Spliced Leader (SL) divergences. However, the quite variable SL and ITS rDNA sequences seem to be very helpful to distinguish genotypes or varieties within species rather than species themselves. For these reasons we are considering *L. acus* and *L. spiculata* genotypes of *C. tarcoles*, which was described first. *C. tarcoles* diverges 3.1% from *C. fasciculata* in gGAPDH sequences.

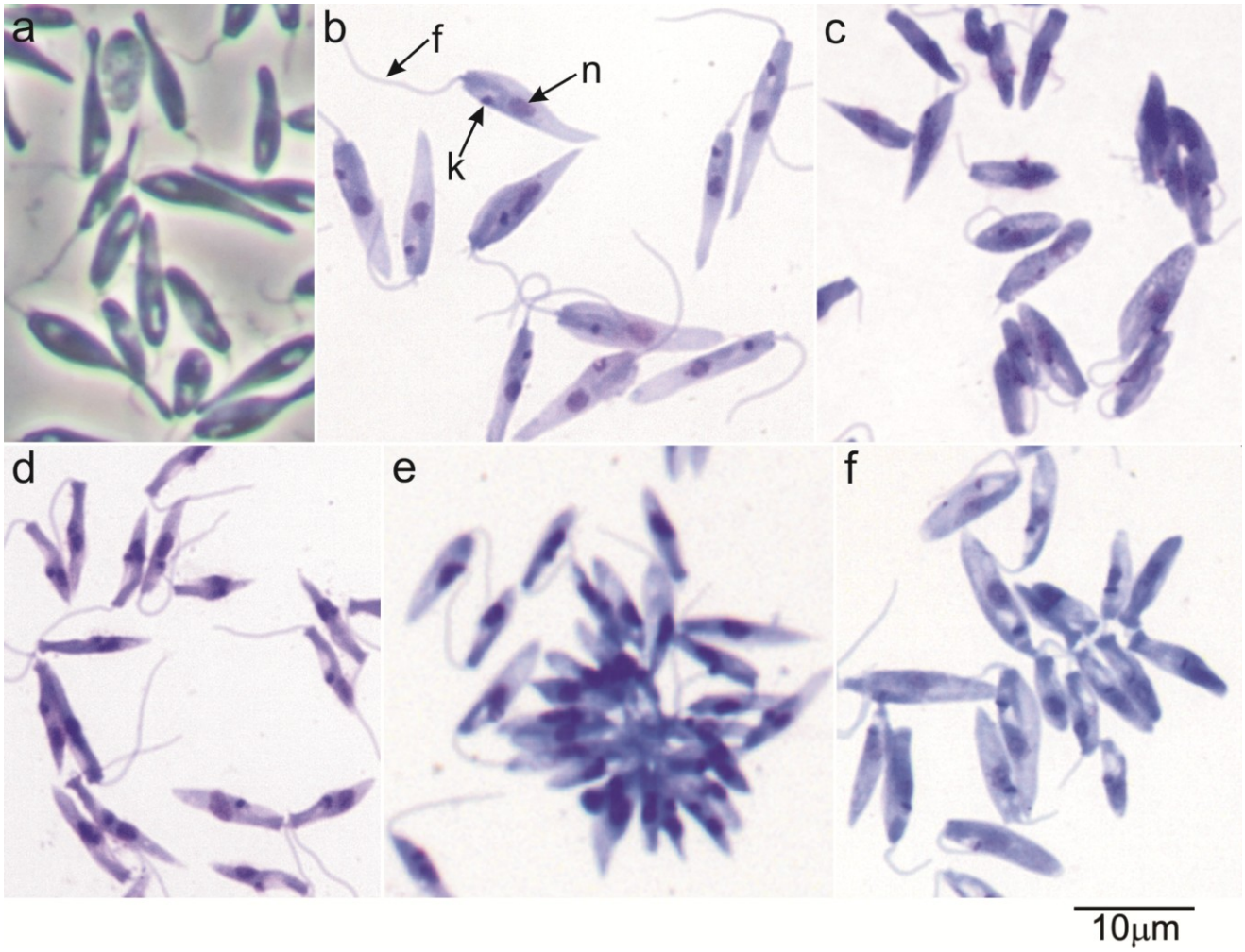



**Figure 6 –** *Crithidia* genus morphology: *Crithidia fasciculata* by phase microscopy (a); and light microscopy stained with Giemsa (b); TCC2695 (c); TCC506 (d); TCC 059E (e); TCC 058E (f). Arrows indicate: n: nucleus; k: kinetoplast; f: flagellum. Bars =10µm.

***Crithidia dedva*** Kostigov et al. 2011. This species was isolated from a mixed culture of *Leptomonas nabiculae* Podlipaev 1987 (Kostigov. et al. 2011). Two of the isolates from TCC-USP have identical sequences with *C. dedva,* TCC 089E and 092E, which were provided by S. Podlipaev in 1987. They were originally named *L. nabiculae* and *L. occidentalis* and were isolated from the Nabidae fly *Nabicula flavomarginata*. In this study, the two cultures yield single V7V8 SSUrRNA and gGAPDH sequences, both identical to *C. dedva*. The positions of TCC 089E and 092E in phylogenetic analysis are quite distinct from all other species of *Crithidia*, what underlines the condition of *C. dedva* as a separate species diverging > 4.0% from *C. fasciculata* in gGAPDH sequences.

**Candidates to new species of *Crithidia*:** Within the genus *Crithidia* we can recognize one pair of flagellates as new species: the pair TCC059E and TCC 2697, from *Anopheles scapularis*, Rio de Janeiro presenting ~3.5% gGAPDH divergences from *C. fasciculate.*

**2. Genus *Legeria*** Teixeira and Camargo n. gen.

Comprises flagellates that in phylogenetic trees cluster with the flagellate formerly classified in the genus *Crithidia* and denominated *Crithidia luciliae thermophila*. **Type material, type species:** *Legeria thermophila* Teixeira and Camargo n.comb., hapantotype represented by culture TCC 050E deposited in ATCC as 30817. **Genus Diagnosis** is based on gene sequences positioning the flagellates in a highly supported monophyletic cluster headed by *Legeria thermophila*.

**2.1. Currently valid, molecularly characterized species of *Legeria***

***Legeria thermophila*** (Roitman et al., 1972) Teixeira and Camargo n. comb.

This species corresponds to former *Crithidia luciliae thermophila* isolated from the digestive tube of *Zelus leucogrammus.* **Type material**: hapantotype represented by culture TCC 050E. **Paratypes***:* cultures TCC 1265, 1268, 2017, 2075 and 2621 whose hosts and locality of collection are in Table 2. Cultures and Giemsa-stained glass smears are deposited at TCC-USP. Additional isolates of *L. thermophila* not designated as paratypes are in Table 2.**Type Host***:* Hemiptera, Reduvidae, *Zelus leucogrammus.* Additional hosts in Table 2. **Habitat***:* Intestine. **Locality***:* Goiania, Goiás, Brazil, S16°36' W 49°16'. **Morphology**: Choanomastigote-like slender and small forms with anterior constricted bodies and truncated anterior extremities (Figure 7) described in *Strigomonas* spp. by Teixeira et al (2010). Measurements of TCC 050E are: body length 7.7 – 12.1 µm (9.7 ± 1.4 µm); body width 1.1-2.5 µm (1.9 ± 0.4 µm); free flagellum 7.4 – 15.5 µm (11.3 ± 2.2 µm). **Diagnosis**: Gene sequences deposited at Genbank. **Etymology***:* The name is a new combination for the flagellate originally described as *Crithidia luciliae thermophila*. **Synonymy:** *Crithiidia luciliae thermophila* Roitman et al. (2001) is an objective synonym of *Legeria thermophila.* Also synonymous of *Legeria thermophila* is *Crithidia confusa* Maslov and Lukes, 2012. **Comments:** Roitman et al. (1977) considered *C. l. thermophila* a subspecies of *Crithidia luciliae.* However, there were no morphological, biological or taxonomical reasons to name it a subspecies of *C. luciliae*. In this context it was named thermophila because, differently from *C. luciliae,* it could growth at 37 C and utilized a specific set of sugars. These

characteristics were also present in other trypanosomatids. Moreover, phylogenetic analyses place *Legeria thermophila* quite apart from *C. luciliae*, which nests in the *Crithidia fasciculata* group. **Etymology**: The name *Legeria* is given in honor of Claude Léger, the French scientist who created the genus *Crithidia* in 1902.

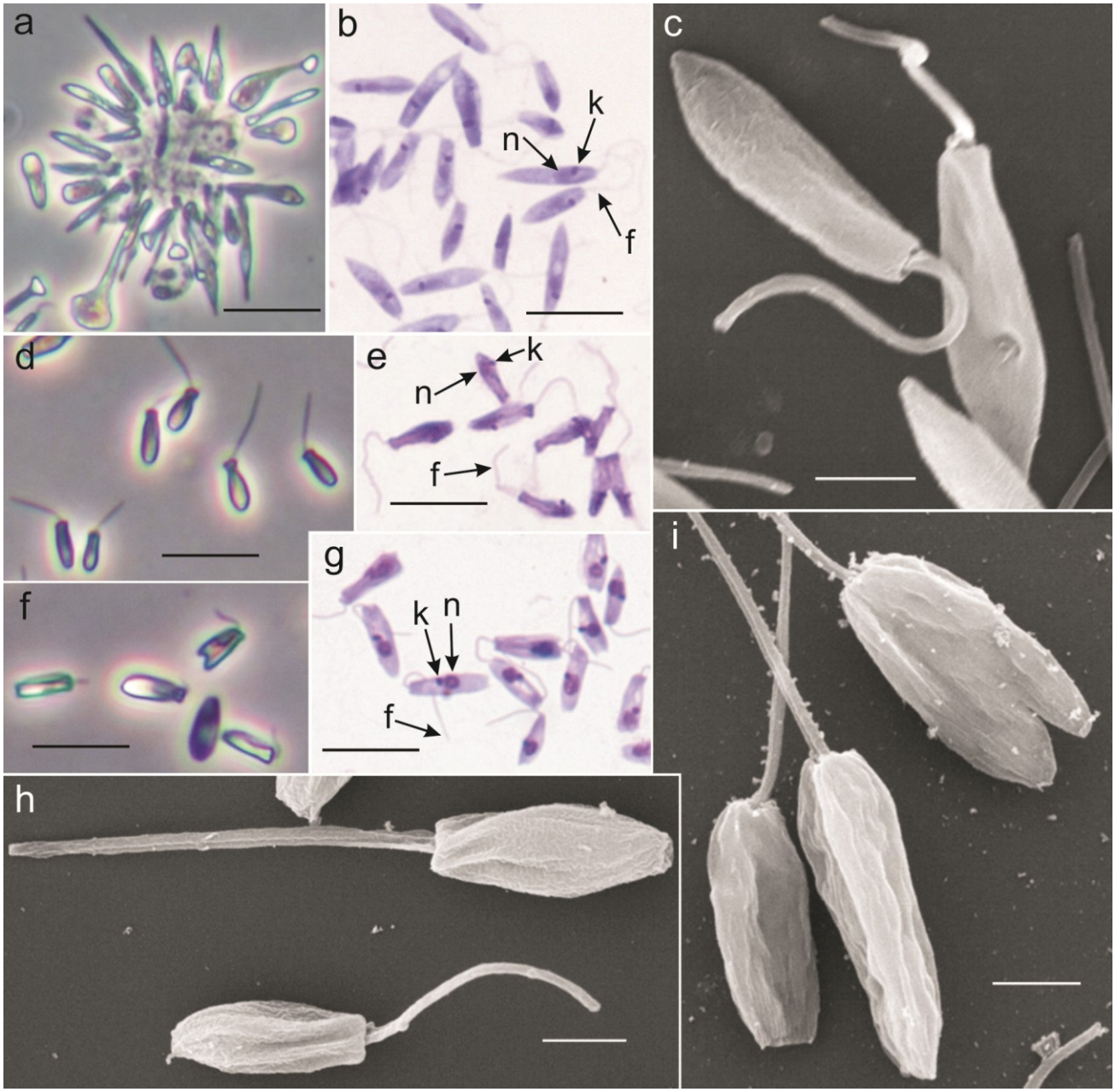



**Figure 7 –** *Legeria* genus morphology. Phase microscopy (a; d; f), light microscopy stained with giemsa (b, g, e) and Scanning electron microscopy: (c, h, i) of *Legeria thermophila* (a, b, c); TCC371 (d, e, h); TCC509 (f, g, i). Arrows indicate: n: nucleus; k: kinetoplast; f: flagellum. Bars: light microscopy=10µm, scanning electron microscopy=0.2µm.

***Legeria bifurcata*** (Yurchenko et al., 2008) n.comb. his species was originally described as *Leptomonas bifurcata* from the hemipteran Miridae *Pachipoda* sp. from Costa Rica. It stands in the Legeria clade although isolated from the main group and separated from *L. thermophila* by ~1.9% of gGAPDH divergences.

***Legeria insperata*** (Maslov and Lukes in Yurchenko et al., 2009). This species was originally described as *Crithidia insperata* from the hemipteran Coreidae *Leptopetalops* sp. from Ecuador. It nicely fits into the *Legeria* clade of Figure 1- 3, together with the new isolates 460 and 371 from Hemipterans collected in Rondonia, Brazil. The group formed by these three flagellates is clearly distinct from *L. thermophila* with 2.6% gGAPDH divergences.

**Candidates to new species of *Legeria*:** Within the genus *Legeria* we recognize the pair of new isolates TCC 505 and TCC 509 as a new species to be described, showing 2.9% divergences with *L. thermophila*.

**3. Genus *Cecilmonas*** Teixeira and Camargo n. gen.

Comprises flagellates that in phylogenetic trees cluster with the flagellate formerly classified in the genus *Crithidia* and denominated *Crithidia acanthocephali*. **Type material, type species:** *Crithidia acanthocephali* (Hanson and McGhee 1961) Teixeira and Camargo n.comb., hapantotype represented by culture TCC 037E deposited in ATCC as 30251. **Genus Diagnosis** is based on gene sequences positioning the flagellates in a highly supported monophyletic cluster headed by *Crithidia acanthocephali*.

**Currently valid, molecularly characterized species of *Cecilmonas***

**3.1.** *Cecilmonas acanthocephali* (Hanson and McGhee 1961) Teixeira and Camargo n. comb.

This species corresponds to former *Crithidia acanthocephali* isolated from the digestive tube of the hemipteran *Acantochephala femorata.* **Type material**: hapantotype represented by culture TCC 037E, ATCC 30251. **Paratypes***:* cultures TCC 049, 050, 2675 whose hosts and locality of collection are in Table 2. Cultures and Giemsa-stained glass smears are deposited at TCC-USP. **Type Host***:* Hemiptera, Pentatomidae, *Acanthocephala femorata.* Additional hosts in Table 2. **Habitat***:* Intestine. **Locality***:* Athens Georgia, USA. **Morphology**: Polymorphic flagellates including plain promastigotes and choanomastigotes with anterior constricted bodies and truncated anterior extremities (Figure. 8). Some forms resemble the campanulate choanomastigotes (Figure 8) described in *Strigomonas* spp. by Teixeira et al (2010). Measurements are: body length 7.7 – 12.9 µm (9.9 ± 1.2 µm); body width 1.8 – 3.1 µm (2.5 – 0.3 µm); free flagellum 5.0 – 14.3 µm (11.1 ± 2.1 µm). Of all the Leishmaniinae genera, the flagellates of this species are the ones that more resemble the flagellates of the original description of Leger for *Crithidia fasciculata*. **Diagnosis**: Gene sequences deposited at Genbank. **Etymology***:* The name is a new combination for the flagellate originally described as *Crithidia acanthocephali*. **Etymology**: The name *Cecilmonas* is given to honor Cecil Hoare, the renowned researcher of trypanosomes, who together with F.G. Wallace, proposed the current definition of the Trypanosomatidae genera.

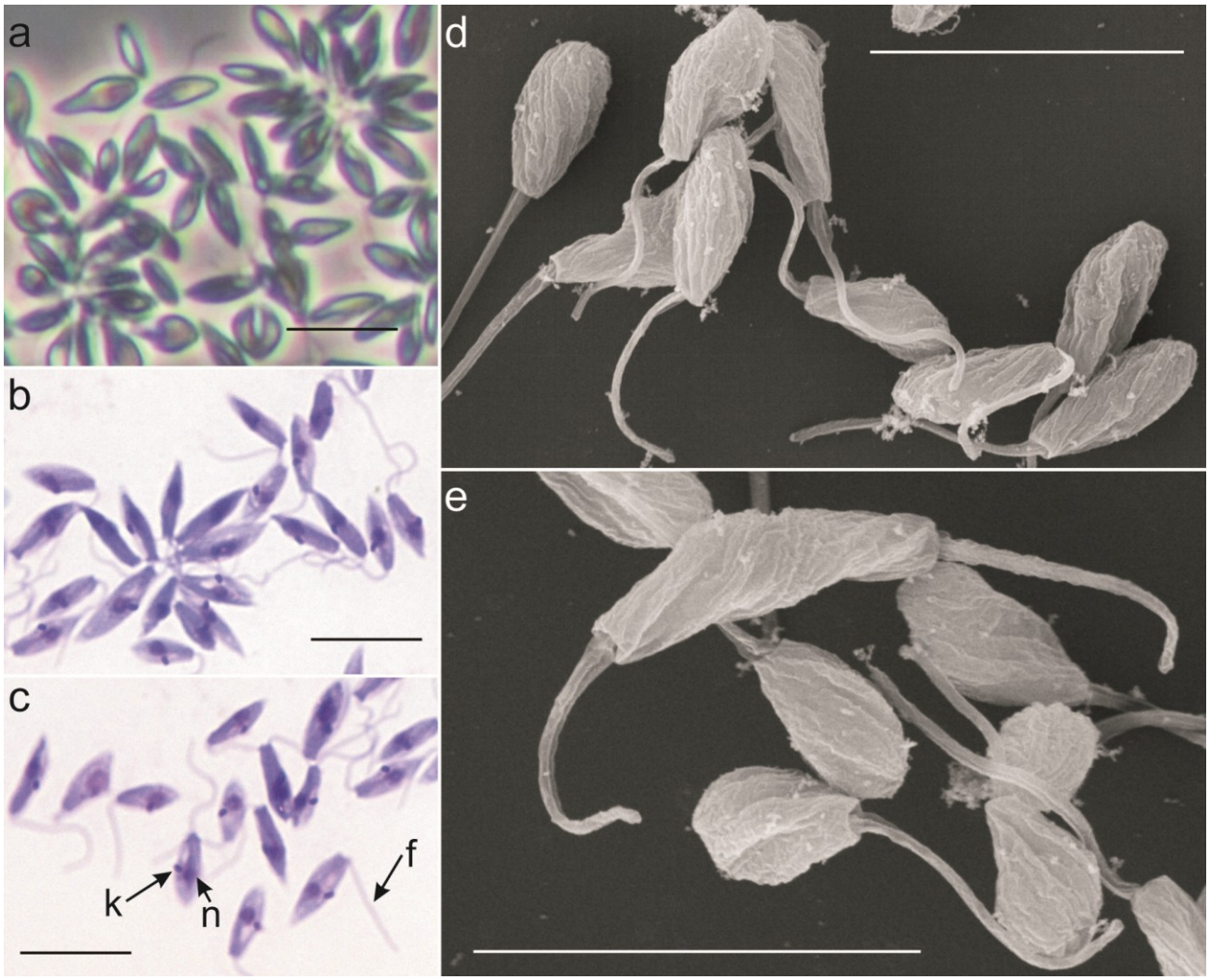



**Figure 8 –** *Cecilmonas acanthocephali* morphology. Phase microscopy (a); light microscopy stained with Giemsa (b, c) and (scanning electron microscopy (d, e). Bars =10µm.

## CONCLUSIONS

In this study, we performed a comprehensive study of molecular diversity and phylogenetic relationships of trypanosomatids classified as *Crithidia* or *Leptomonas*. Results demonstrated that the polyphyletic genus *Crithidia* can be divided in three genera, which we named as *Crithidia, Legeria* and *Cecilmonas*. Topologies of phylogenetic trees inferred using three DNA sequences and degrees of sequences divergences were assessed to delineate the boundaries of both genera and species. The validated genera was constituted by species already known and new species yet to be described.

Part of the problems of the taxonomy of the insect trypanosomatids resulted from the criteria used since the beginning of the XX$^{th}$ century for their classification: morphology and host origin. Add to that, the small sample size that guaranteed that each new host provided a new species. With respect to hosts, Wallace et al. (1983) said,

"many trypanosomatids have nouns that are derived from their hosts" due to "a once widely held believe that… each insect had its own parasite". This believes is no longer sustained. Accumulated molecular data has repeatedly shown that, as a rule, there is no restrict species-specific relationship between the insect host and its parasite trypanosomatid (Teixeira et al., 2011, Borghesan et al., 2013, Votýpka et al., 2012, 2014, Maslov et al., 2012, 2013, Tȳc et al., 2013). However, above species level associations seem to be more consistent with invertebrate hosts. For instance, *Angomonas* and *Herpetomonas* exhibit a fondness for dipterans and *Blechomonas* for fleas (Borghesan et al., 2013; Tȳc et al., 2013; Votýpika et al., 2013, 2014). *Leishmania* are restricted to hematophagous sand flies while *Leptomonas* and *Phytomonas* definitely prefer hemipterans. Predators are not considered because it is difficult to tell which of their flagellates are their own. By their turn, C*rithidia* seems to be a multi-host genus. *C. fasciculata* seems to prefer dipterans, but other *Crithidia* spp. parasitizes either hemipterans or dipterans. In the genus *Legeria*, 36% of the isolates were parasites of Dipterans, mainly blowflies, 33% came from phytophagous hemipterans and 30% from predators, and one isolate came from tomatoes, possibly contaminated by parasites from the feces of an insect. This makes *Legeria* also a multi-host genus, at least *L. thermophila*.

The other tenet of the early taxonomy of the Trypanosomatids was morphology. However, morphological traits proved to be an insufficient taxonomic criterion mainly because of the difficulties inherent to the distinction between the classical morphotypes and between species displaying the same morphotype. Wallace (1962) the proponent of the morphotype-based genera definition of Trypanosomatids, said years after his proposal, "The taxonomy of the group is difficult because many species resemble each other so closely that they cannot be distinguished…" (Wallace et al., 1983). This, however, is not equivalent to saying that morphology is of no value for the trypanosomatid taxonomy. Actually, it can be an important accessory tool whether used with cognizance of its limitations. In summary, the shortcomings of the host origin and morphological criteria led to the inordinate taxonomic placement of many named species of insect trypanosomatids.

Except for a few cases, uncertainties about the taxonomic identity of insect trypanosomatids prevent the analysis of their geographical distribution in the early literature. Molecular data, however, would permit an objective appreciation of the worldwide distribution of *Leptomonas* and *Crithidia* were it not for the small size of the present sample. For instance, there are but a few descriptions of molecularly characterized species in the Palearctic and Nearctic, in contrast with the data from the old literature where they constituted the majority. Presently, reports predominate about the Neotropics, followed by the Afrotropics, but this certainly results from the choice of researchers not of trypanosomatids. Nevertheless, a few observations are possible. *L. thermophila* seems to be a very common parasite of hemipterans and dipterans wherever surveys were made in Africa and South American countries, including the different Brazilian biomes. *L. thermophila* is certainly a candidate to cosmopolitanism as the surveys continue. In contrast, *Crithidia fasciculata* has been reported only in mosquitos from North America and Brazil, although its putative old version was isolated from European mosquitos. Similalry, *Cecilmonas* was os far restricted to South America. The paucity of data are generally

restricted to species and do not permit generalizations about genera distribution. However, determined species of *Leptomonas* and *Herpetomonas* have been reported in Europe, South and Central America, Africa and China. It is believed that molecular methods applied to worldwide surveys will bring more complete and precise information on the biogeography of insect trypanosomatids.

This is the most comprehensive study regarding the number of organisms characterized and the number of loci analyses developed to propose a consistent taxonomic revision of the genus *Crithidia.* In addition, phylogenetic analyses strongly supported a monophyletic assemblage exclusive of species of *Leptomonas* and additional clades supporting the creation of additional genera within the subfamily Leishmaniinae of the Trypanosomatidae family. On the other hand, in our phylogenetic analisys based on SSUrRNA and Ggadh, *Crithidia* genus was positioned as sister clado of *Legeria* genus. However, in the analysis including CATB gene, the *Crithidia* genus its branched as basal clade that containing *Legeria* and *Cecilmonas.* Therefore other analyzes including other genes and more species should be made with the aim of resolving the phylogenetic topology these two genera. However, it is necessary to emphasize that the size of the sample of insect trypanosomatids is yet too small in face of the enormous diversity of hosts and geographical areas that were still not investigated. Therefore, only a continued analysis of an enriched sample can gradually organize the taxonomy of the insect trypanosomatids and draw a clear image of their diversity, phylogenetic relationships and evolutionary history.

**References**

Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MMG, Camargo EP (2013). Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. Protist 164: 129-152.

Burnett, WJ (1851). The organic relations of some of the Infusoria, including investigations concerning the structure and nature of the genus *Bodo* (Ehr.). Proc. Soc. Nat. Hist. Boston, pp 124–125

Camargo EP (1964). Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi.* I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 6: 93-100.

Cavalier-Smith T (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? Biosystems 14: 461-481.

Chaouch M, Fathallah-Mili A, Driss M, Lahmadi R, Ayari C, Guizani I, Ben Said M, Benabderrazak S (2013). Identification of Tunisian *Leishmania* spp. by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis. Acta Trop 125: 357-365.

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

Fernandes O, Teixeira MM, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degrave WM, Campbell DA (1997) Mini-exon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. J Eukaryot Microbiol 44: 535-539.

Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, Teixeira MMG (2007). Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. Parasitology 134: 1623-1638.

Folgueira C, Requena JM (2007). A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev 31: 359-377.

Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC (2004). Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. Int J Parasitol 34: 1393-1404.

Hanson WL, McGhee RB (1961). The Biology and Morphology of *Crithidia acanthocephali* n. sp., *Leptomonas Zeptoglossi* n. sp., and *Blastocrithidia euschisti* n. sp. J Protozol 8:200-204.

Hindle E (1912). What is the genus *Leptomonas?.* Parasitology 5: 128-134.

Hoare CA, Wallace FG (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature 212**:**1385-1386.

Hollar L, Lukes J, Maslov DA. (1998). Monophyly of Endosymbiont Containing Trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. J. Euk. Microbiol., 45, 293-297.

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

Kostygov A, Malysheva MN, Frolov AO (2011). Investigation of causes of the conflict between taxonomy and molecular phylogeny of trypanosomatids by the example of *Leptomonas nabiculae* Podlipaev, 1987. Parazitologiia 45: 409-424.

Kent WS (1880). A manual of the infusoria, including a description of all known flagellate, ciliate, and tentaculiferous protozoa. In David Bogue (ed) British and foreign and an account of the organization and affinities of the sponges. London, pp 1880-1881.

Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V (2014). Molecular revision of the genus *Wallaceina*. Protist 165: 594-604.

Laird M. (1959). *Blastocrithidia* n.g. (Mastigophora:Protomonadina) for *Crithidia* (in part), with a subarctic record for *B.gerridis* (Patton). *Canadian Journal of Zoology,***37,** 749-752.

Laurent T, Van Der Auwera G, Hide M, Mertens P, Quispe-Tintaya W, Deborggraeve S, De Doncker S, Leclipteux T, Banuls AL, Buscher P, Dujardin JC (2009). Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. Diagn Microbiol Infect Dis 63: 173-181.

Leger L (1902). *Sur un flagellé parasite de l'Anopheles maculipennis*. C R Seances Soc Fil. pp 354-6.

Léger L (1903). Sur quelque cercomonadines nouvelles ou peu connues parasites de l'intestin des insects. Archiv Protistenk 2: 180-189

Leidy J (1856). A synopsis of entozoa and some of their ectocongeners. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 8: 42-58

Lühe, M (1906) Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. Mense's Handbuch der Tropenkrankheiten,3**,** 69-268

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

Maslov DA, Yurchenko VY, Jirku M, Lukes J (2010). Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. J Eukaryot Microbiol 57: 177-188.

Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, Maslov DA (2001). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. J Eukaryot Microbiol 48: 161-169.

Mundim MH, Roitman I, Hermans MA, Kitajima EW (1974). Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. J Protozool 21: 518-521.

Patton WS (1909). The life cycle of a species of *Crithidia* parasitic in the intestinal tract of *Gerris fossarum* Fabr. Archives fur Protistenkunden 12: 131-145.

Patton WS, Strickland C (1908). A critical review of the relation of blood-sucking invertebrates to the life cycles of the trypanosomes of vertebrates, with anote on the occurrence of a species of *Crithidia, Crithidia ctenopthalmi*, in the alimentary tract of *Ctenopthamus agyrtes*, Heller. Parasitology 1**:** 322-346.

Podlipaev S (2001). The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. Int J Parasitol 31: 648-652.

Podlipaev SA (2000). Insect trypanosomatids: the need to know more. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 517-522.

Podlipaev SA, Sturm NR, Fiala I, Fernandes O, Westenberger SJ, Dollet M, Campbell DA, Lukes J (2004). Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. J Eukaryot Microbiol 51: 283-290.

Roitman (1977). Growth of *Crithidia* at high temperature: *Crithidia hutneri* sp. n. and *Crithidia luciliae thermophila* s. sp. n. J. Protozool. 24: 553-556.

Runckel C, Derisi J, Flenniken ML (2014). A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae.* PLoS One 9: 1-10.

Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, De Graaf DC, Evans JD (2015). Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. J Eukaryot Microbiol.

Stamatakis A (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 21: 2688-2690.

Stein F (1878). Der Organismus der Infusionsthiere. In Leipzig Engelmann (ed) *Flagellaten* . pp. 1-154.

Strickland C (1911). Description of a *Herpetomonas* parasitic in the alimentary tract of the common green-blow fly, *Lucilia* sp. Parasitology 4: 22-136.

Svobodova M, Zidkova L, Cepicka I, Obornik M, Lukes J, Votypka J (2007). *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). Int J Syst Evol Microbiol 57: 423-432.

Swofford DL (1998). PAUP*: Phylogenetic Analysis using parsimony: and other methods version 4.0.Sunderland, MA: Sinauer Associates 197 p.

Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, De Souza W, Camargo EP (2011). Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. Protist 162: 503-524.

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

Tsokana CN, Athanasiou LV, Valiakos G, Spyrou V, Manolakou K, Billinis C (2014). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. In Dr. David Claborn (Ed.) Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. pp 161-176

Tyc J, Votypka J, Klepetkova H, Sulakova H, Jirku M, Lukes J (2013). Growing diversity of trypanosomatid parasites of flies (Diptera: Brachycera): frequent cosmopolitism and moderate host specificity. Mol Phylogenet Evol 69: 255-264.

Votypka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesarova M, Grybchuk D, Lukes J, Yurchenko V (2014). Kentomonas gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. Protist 165: 825-838.

Votypka J, Sukova E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duzi I, Lukes J, Yurchenko V (2013). Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. Protist 164: 763-781.

Wallace FG (1963). Criteria for the differentiation of genera among the trypanosomatid parasites of insects. Progress in Protozoology - First International Congress in Protozoology**,** 70-74.

Wallace FG (1966). The trypanosomatids of insects and arachnids. Exp Parasitol 18: 124-193.

Wilfert L, Longdon B, Ferreira AG, Bayer F, Jiggins FM (2011) Trypanosomatids are common and diverse parasites of Drosophila. Parasitology 138: 858-865.

Yurchenko V, Votypka J, Tesarova M, Klepetkova H, Kraeva N, Jirku M, Lukes J (2014). Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*. Folia Parasitol (Praha) 61: 97-112.

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

Zidková L, Čepička I, Votýpka J, Svobodová M. (2010). *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of the miting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopongidae, Diptera). *Intl J Syst Evol Microbiol* **60,** 2236-2246.