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

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.

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)

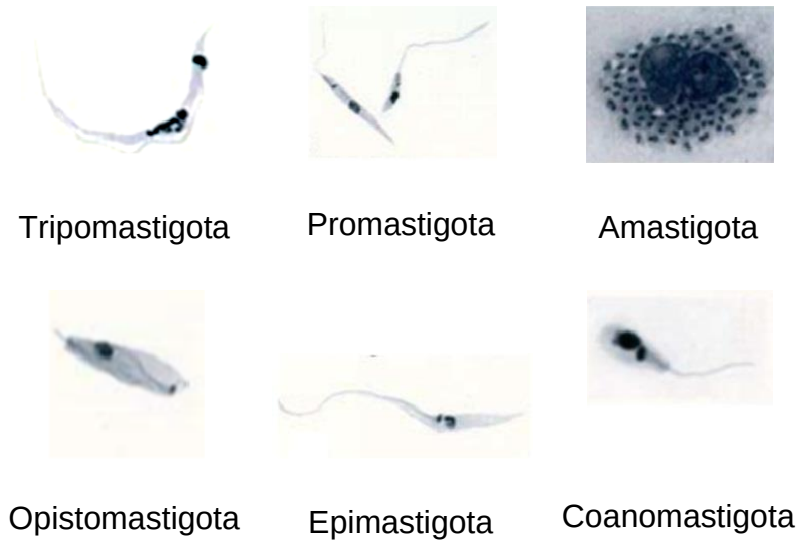

Figura 1 - Formas celulares dos cinetoplastídeos encontradas nos diferentes estágios de desenvolvimento da família Trypanosomatidae (modificada: De Souza, 2002).

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*.

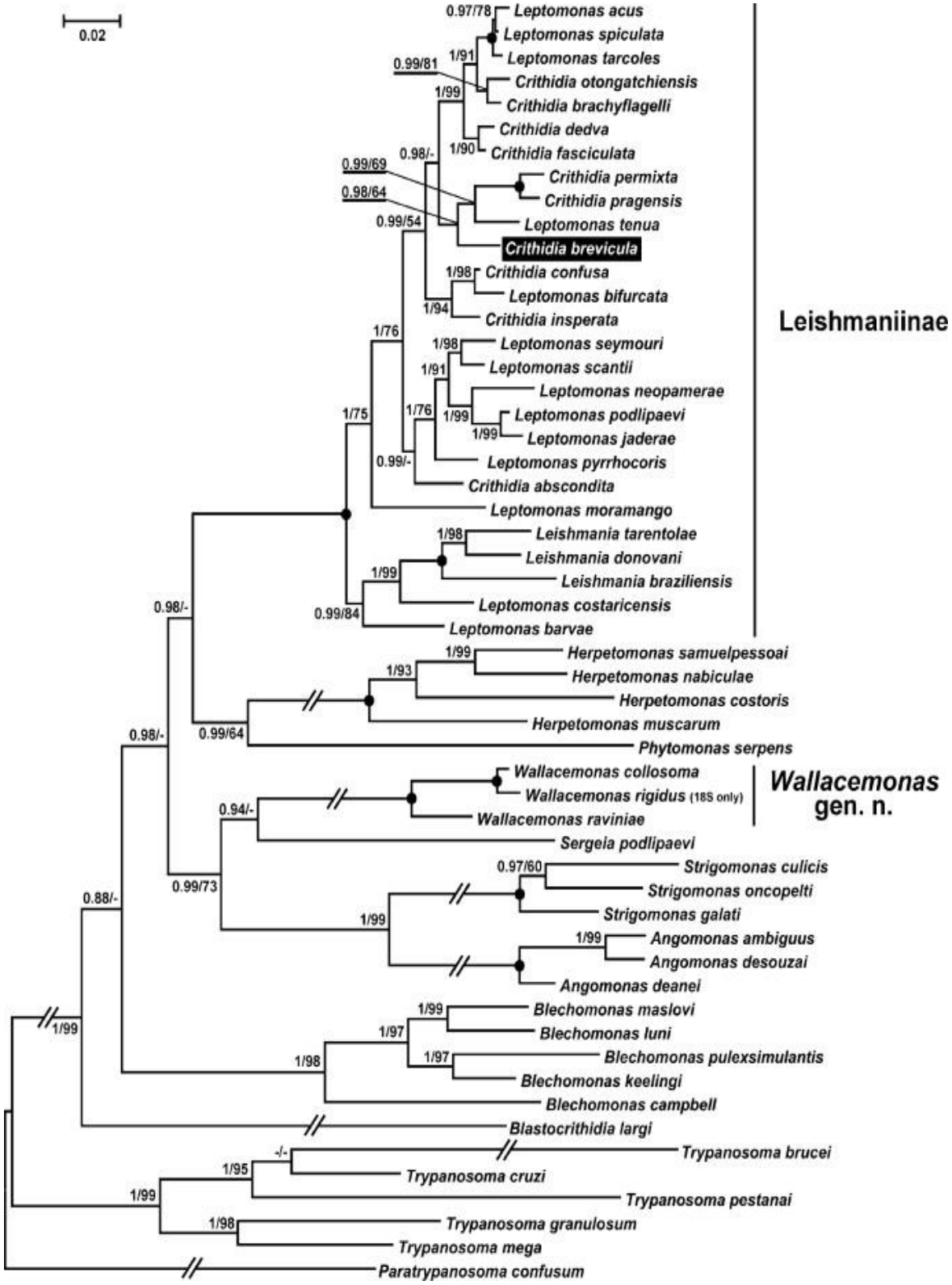

Figura 2 - Filogenia da subfamília Leishmaniinae, baseada nas sequências concatenadas dos genes SSUrRNA e gGAPDH. Pode-se observar os dois subclados, um composto apenas por espécies monoxênicas de insetos e outro por duas espécies de *Leptomonas* e os gêneros heteroxênicos (*Leishmania* e *Endotrypanum*).

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).

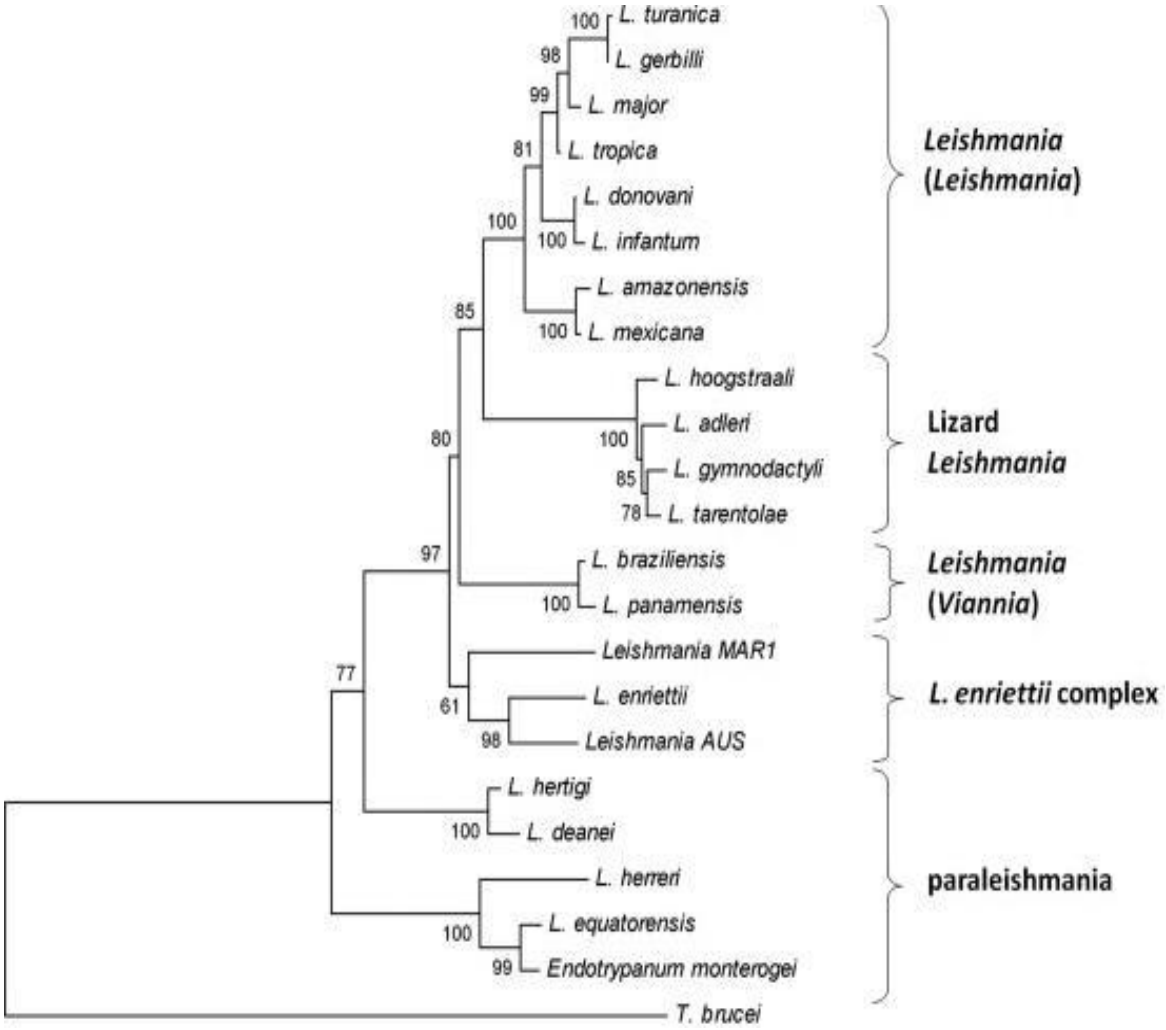

Figura 3 – Relação filogenética entre espécies de *Leishmania, Endotrypanum* e Paraleishmania. Analises baseada nas sequências da subunidade II do gene RNA Polimerase. Pode-se observar reção entre os *Subgeneros L. (Leishmania), L. (Suroleishmnia), L. (Vinnia),* Complexo *L. enriettii*, assim como a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

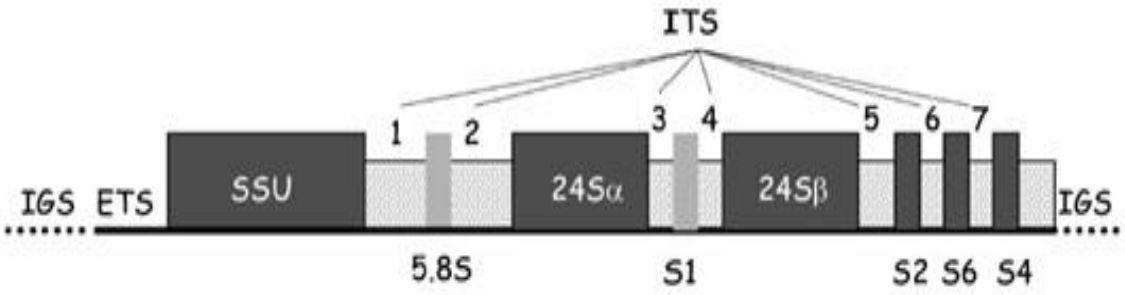

Figura 4 - Representação esquemática do cistron ribossômico de precursores de rRNA em tripanossomatídeos. Demonstra a disposição das três regiões codificadoras de RNA: Subunidade Menor (SSU), 5.8S e a subunidade maior (LSU) composta pelas regiões 24α e 24β. Os sete espaçadores intergênicos (ITS) são 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.

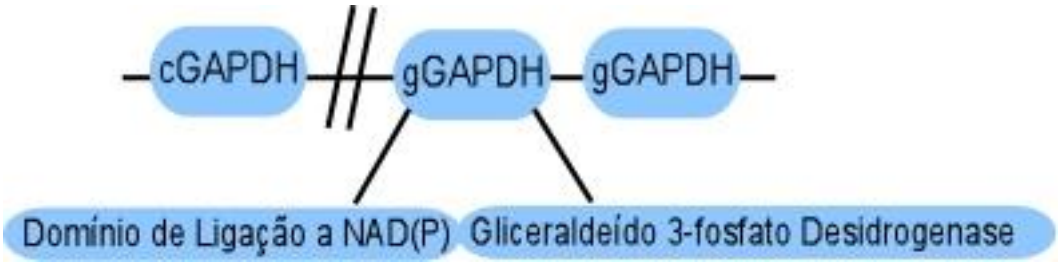

Figura 5 - Representação esquemática dos genes que codificam as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Uma copia única do cGAPDH e os dois genes em tandém gGAPDH. Destaca-se os dominios que compõem a estrutura da proteína.

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).

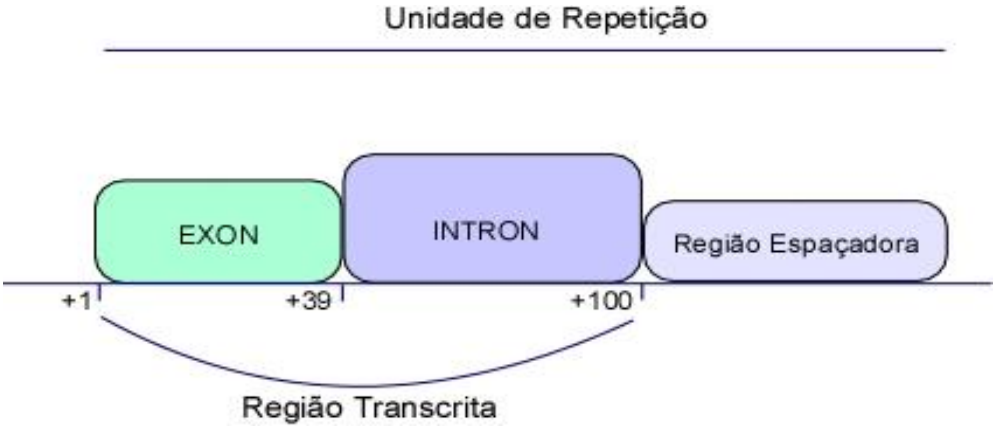

Figura 6 - Representação esquemática do gene *SL*. Destacam-se as três regiões que compõem este gene: Éxon, Íntron e a região espaçadora.

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).

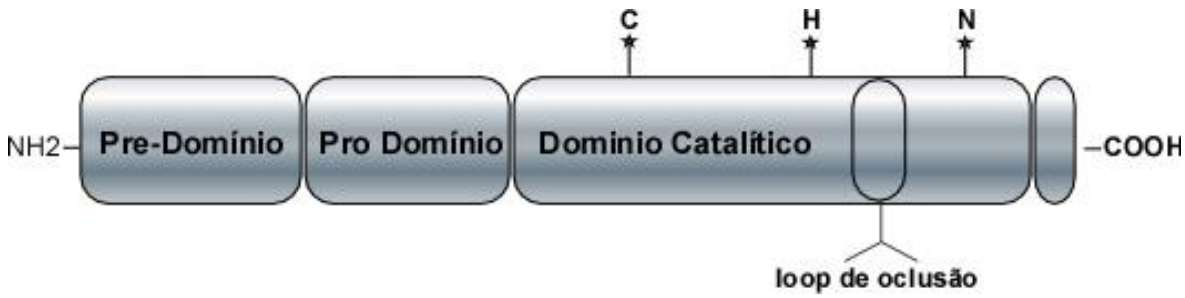

Figura 7 - Representação esquemática dos domínios da enzima Catepsina B-*like.* As estrelas destacam as posições dos resíduos catalíticos: Cisteína (C); Histidina (H) e Asparagina (N).

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).

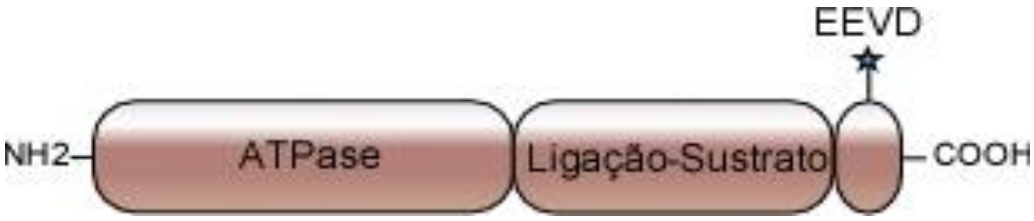

Figura 8 - Representação esquemática da proteína de choque térmico de 70 kDa citoplasmática (HSP70). Destacam-se os principais domínios da Proteína: O domínio N-terminal ATPase de 45 kDa, domínio de ligação ao substrato de 15-18 kDa e o domínio de C-terminal de 10 kDa com o motivo EEVD.

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.