

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE E
IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE ISOLADOS DE LEPIDOPTERA
PERTENCENTES A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE**

Amanda Rodrigues Caetano

Orientadora: Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

Co-orientadora: Dra. Elisa Cupolillo

RIO DE JANEIRO

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Amanda Rodrigues Caetano

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE E
IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE ISOLADOS DE LEPIDOPTERA
PERTENCENTES A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

Co-orientadora: Dra. Elisa Cupolillo

RIO DE JANEIRO

2019

Caetano, Amanda .

Análise Filogenética da Subfamília Leishmaniinae e Identificação Taxonômica de isolados de Lepidoptera pertencentes a Família Trypanosomatidae / Amanda Caetano. - Rio de Janeiro, 2019.
102 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

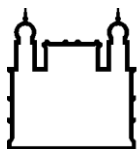
Orientadora: Claudia Masini d'Avila.

Co-orientadora: Elisa Cupolillo.

Bibliografia: f. 60-73

1. Tripanossomatídeos . 2. Subfamília leishmaniinae. 3. Isolados de Lepidoptera. 4. Identificação Taxonômica Molecular. 5. Análise Filogenética .
I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE E
IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE ISOLADOS DE LEPIDOPTERA
PERTENCENTES A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE**

Amanda Rodrigues Caetano

ORIENTADORA: Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

CO-ORIENTADORA: Dra. Elisa Cupolillo

EXAMINADORES:

Prof. ^a Dra. Katia da Silva Calabrese – Presidente

Prof. Dr. Mario Steindel

Prof. Dr. Márcio Pavan

Prof. ^a Dra. Silvia Amaral - Suplente

Prof. Dr. Adeilton Brandão - Suplente

RIO DE JANEIRO

2019

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar gostaria de fazer três agradecimentos. Primeiramente, a Dra. Claudia Masini d'Avila Levy por abrir as portas do seu laboratório e aceitar ser minha orientadora ainda durante a minha Iniciação Científica. Gostaria de agradecer também a minha co-orientadora Dra. Elisa Cupolillo por ter me aceitado como aluna. Agradeço essa oportunidade, a sua disponibilidade, paciência, atenção e orientação. Você foi essencial nesse momento, meu mais sincero obrigada! E por último, a Dra. Karina Alessandra Morelli, colaboradora do nosso laboratório e professora da UERJ. A Karina me ensinou tudo que sei na bancada e assim permitiu que eu desse os primeiros passos em biologia molecular. A Karina me deu total apoio durante essa fase de iniciação na pesquisa e se tornou uma grande amiga.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose pela ajuda, principalmente a técnica Camila que disponibilizou os DNAs de *Leishmania* e me ajudou nos experimentos e a toda equipe do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia onde eu passei os últimos 4 anos. Agradeço a vocês pela amizade e convivência.

Aos amigos Rhagner, Carol e Andreia, por deixarem o ambiente de trabalho mais divertido e por nunca me deixarem esmorecer. Obrigada por todos esses anos de amizade (Andreia e Carol Boucinha desde o laboratório Lesm), companheirismo e ajudas intermináveis!

A técnica Sheila por sempre me escutar e pelo seu carisma único e admirável. Agradeço também por todo ensinamento com cultivo e pelos inúmeros protozoários que você me forneceu ao longo da minha jornada rs

Ao Vitor, que sempre exerceu mais do que seu trabalho de técnico, exerceu também o papel de amigo sempre pronto a me escutar e ajudar.

A Helena que concedeu mais do que sua paciência comigo; compartilhou toda sua experiência, me ajudando tecnicamente e cientificamente. Obrigada por tudo!

A Karina Rebello por todo o apoio emocional e científico e também pelas inúmeras conversas que compartilhamos juntas ao longo dessa jornada.

Agradeço também a colaboradora Aline Garcia que mesmo não estando diariamente no laboratório se tornou uma amiga e mantivemos as conversas mais descontraídas por WhatsApp.

A todos os alunos que passaram por esse laboratório enquanto estive lá e deixaram um pouquinho de si comigo (principalmente Bia, Keyla e Carol Lopes) e aos novos alunos que fazem parte deste laboratório.

Não posso deixar de agradecer imensamente aos “Lesmas” (Lesm), onde realizei grande parte dos meus experimentos ainda na Iniciação Científica e ganhei grandes amigos! Carla, Marina, Jessica, Paloma, Joana e Márcio obrigada por cada momento ao lado de vocês.

...é por acaso que pessoas entram em nossas vidas, mas não é por acaso que permanecem!

Aos meus amigos da vida não científica, principalmente por entenderem quando eu não podia estar presente e por deixarem tudo mais leve.

Aos meus pais e meu irmão, porque sem eles eu jamais estaria onde estou. A minha mãe Helena e ao meu pai Marcos que apesar de não fazerem ideia do que eu faço sempre compreenderam a minha escolha. Ao meu irmão Anderson, que apesar de ser mais novo será sempre meu espelho, meu ajudante tecnológico e conselheiro profissional oficial.

Ao meu namorado e companheiro de vida há 7 anos, Marco Antônio. Aquele que eu sempre soube que era incrível mas se tornou ainda mais incrível nos momentos que eu mais precisei. Me apoiou e esteve do meu lado mesmo quando não sabia o que dizer. Aquele que segue me incentivando e me enxerga como nem eu me enxergo.

Obrigada por tudo, Amo vocês!

A equipe da Plataforma de Sequenciamento de DNA que faz parte da Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ. A plataforma foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço também aos integrantes da banca examinadora por terem aceitado o convite.

As agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, ao CNPQ, a FAPERJ e FIOCRUZ pelo apoio financeiro e estrutural.

A todos da Secretaria Acadêmica e a Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela oportunidade de realizar este trabalho, pela infraestrutura e principalmente por todo conhecimento adquirido durante o curso de mestrado.

ÍNDICE
RESUMO
ABSTRACT
ÍNDICE DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS

I. INTRODUÇÃO	1
1. Biodiversidade	1
2. Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos.....	3
3. Genes utilizados nas análises Taxonômicas e Filogenéticas.....	4
3.1 Gene GAPDH.....	5
3.2. Gene ribossômico.....	5
4. Família Trypanosomatidae.....	6
5. Evolução na Família Trypanosomatidae.....	9
6. Taxonomia da subfamília Leishmaniinae.....	10
7. <i>Leishmania</i> e Leishmaniose.....	19
8. Coleções Biológicas.....	21
II. OBJETIVOS	22
1) Objetivo geral	
2) Objetivo específico	
III. METODOLOGIA	23
1) Amostragem: Tripanossomatídeos estudados.....	23
2) Preparo das amostras e visualização em microscopia óptica.....	23
3) Extração e quantificação de DNA.....	24
4) Reação em Cadeia Polimerase (PCR).....	24
5) Visualização e Purificação do Produto de PCR.....	25
6) Sequenciamento do DNA amplificado.....	25
7) Análise das sequências.....	25
IV. RESULTADOS	27
1. Filogenia da Subfamília Leishmaniinae.....	27
1.1. Gênero <i>Leishmania</i>	32
1.2. Gênero <i>Paraleishmania</i>	36
1.3. Gênero <i>Endotrypanum</i> (<i>nomen dubium</i>).....	36

2. Identificação taxonômica de tripanossomatídeos isolados da ordem Lepidoptera.....	37
2.1. Gênero <i>Crithidia</i>	47
2.2. Identificação de tripanossomatídeos com potencial a novos gêneros.....	49
2.3. Gênero <i>Strigomonas</i>	50

V. DISCUSSÃO	52
---------------------	-----------

VI. CONCLUSÃO	59
----------------------	-----------

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
--	-----------

VIII. ANEXOS	74
---------------------	-----------

Anexo I. Tabela do número de acesso das sequências retiradas do banco de dados <i>Genbank</i> para os genes gGAPDH e V7V8 SSUrRNA.....	74
---	----

Anexo II. Identificação dos isolados de Lepidoptera com base nas sequências disponíveis no banco de dados <i>Genbank</i> para os marcadores gGAPDH e V7V8 SSUrRNA.....	77
---	----

Anexo III- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos analisados neste trabalho. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros (em CD).....	79
--	----

Anexo IV- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Crithidia</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	80
---	----

Anexo V- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Leptomonas</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	81
---	----

Anexo VI- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Strigomonas</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	82
Anexo VII- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Herpetomonas</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	82
Anexo VIII- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os isolados de Lepidoptera. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	83
Anexo IX- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Leishmania</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	84
Anexo X- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Paraleishmania</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	86
Anexo XI- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero <i>Endotrypanum</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	86
Anexo XII- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos dos gêneros <i>Novymonas</i> , <i>Borovskya</i> e <i>Zelonia</i> . Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática das diferentes formas celulares encontradas em diferentes estágios da família Trypanosomatidae.....	9
Figura 2- Árvore filogenética da última classificação revisada da Subfamília Leishmaniinae.....	18
Figura 3- Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para o gene gGAPDH.....	29
Figura 4- Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para a região V7/V8 SSUrRNA.....	30
Figura 5- Análise de Máxima Verossimilhança (ML) das sequências concatenadas de gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.....	31
Figura 6- Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para o gene gGAPDH.....	42
Figura 7- Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para o gene V7/V8 SSUrRNA.....	44
Figura 8- Análise de Máxima Verossimilhança (ML) das sequências concatenadas de gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.....	46
Figura 9- Imagem do isolado COLPROT 735.....	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1- Tabela da classificação atual dos gêneros e espécies pertencentes a subfamília Leishmaniinae.....	11
Quadro 1- Condições de amplificação dos alvos.....	24
Quadro 2- Lista das espécies de <i>Leishmania</i> , <i>Paraleishmania</i> e <i>Endotrypanum</i> amplificadas e sequenciadas para cada gene.....	27
Quadro 3- Espécies do subgênero <i>Leishmania</i> analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8.....	32
Quadro 4- Representantes do subgênero <i>Sauroleishmania</i> analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.....	34
Quadro 5- Espécies do Subgênero <i>Viannia</i> analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.....	34
Quadro 6- Subgênero <i>Mundinia</i> analisado pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.....	35
Quadro 7- Lista das amostras identificadas para cada alvo molecular.....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COLPROT- Coleção de Protozoários da Fundação Oswaldo Cruz

CLIOC – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

IOC- Instituto Oswaldo Cruz

ML- Máxima Verossimilhança

BLAST- Ferramenta básica de localização de alinhamento local

PBS- Tampão Fosfato Salina

pb- Pares de base

PCR- Reação em cadeia da polymerase

EDTA- “Ethylenediamine tetraacetic acid” Ácido etilenodiaminotetracético

DNA- “desoxiribonucleic acid” Ácido Desoxirribonucleico

GAPDH- Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase

cGAPDH- Citosólico Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase

gGAPDH- Glicossomal Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase

RNA- “Ribonucleic acid” Ácido ribonucleico

rRNA- Ácido ribonucleico ribossomal

SSU- “Small subunit” Subunidade menor

LSU- “Large subunit” Subunidade maior

ITS- “Internal transcribed spacer” Espaçador Interno Transcrito

OTU- “Operational Taxonomic Unit” Unidade Taxonômica Operacional



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

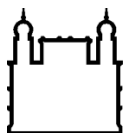
ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SUBFAMÍLIA LEISHMANIINAE E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE ISOLADOS DE LEPIDOPTERA PERTENCENTES A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Amanda Rodrigues Caetano

A Classe Kinetoplastea abrange a ordem Trypanosomatida que apresenta uma única família: Trypanosomatidae. Os representantes dessa família possuem como apomorfia o cinetoplasto, DNA mitocondrial único e altamente compactado, e um único flagelo. A classificação taxonômica desses tripanossomatídeos fundamentada unicamente em caracteres morfológicos e nos seus ciclos de vida não reflete a diversidade genética e as relações evolutivas do grupo. Atualmente, as abordagens moleculares são rotineiramente empregadas para estudos filogenéticos e taxonômicos. Neste trabalho, realizamos uma revisão das relações filogenéticas entre os gêneros da subfamília Leishmaniinae para espécies selecionadas do gênero *Leishmania*, *Paraleishmania* e *Endotrypanum* (*nomen dubium*), além de analisar novos isolados oriundos de projetos de prospecção de biodiversidade da Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT) visando avaliar a ocorrência de tripanossomatídeos na ordem Lepidoptera. Para isto, foram sequenciados e analisados dois genes gGAPDH e 18S que possuem uma base de dados ampla disponível no *Genbank* e são difundidos como ferramenta taxonômica de tripanossomatídeos, embora sejam pouco explorados para resolver questões taxonômicas do gênero *Leishmania*. As análises corroboram com a proposição de criação de duas infrafamílias na subfamília Leishmaniinae. Na infrafamília Leishmaniatae, a análise concatenada das sequências dos genes demonstrou que esses genes não possuem boa resolução para identificar espécies do gênero *Leishmania*, mas permite a classificação em complexos e subgêneros. Também foi definida a sinonímia de uma cepa de *Leishmania forattinii* em *Herpetomonas samuelpessoai*. As análises também mostram que os gêneros *Paraleishmania*, *Endotrypanum* (*nomen dubium*) e *Leishmania* são filogeneticamente próximos entre si. Na infrafamília Crithidiatae, as análises mostram proximidades filogenéticas entre espécies de *Crithidia* e *Leptomonas*. Além disso, foi realizada a identificação taxonômica de 33 isolados de tripanossomatídeos obtidos de insetos da ordem Lepidoptera, sendo possível constatar três espécies já descritas na literatura: *C. mellificae*, *C. thermophila* e *C. insperata*; isolados representantes de seis OTUs possíveis candidatas a: i) novas espécies do gênero *Crithidia* (*Crithidia* sp1; *Crithidia* sp2; *Crithidia* sp3; *Crithidia* sp4); ii) uma nova espécie do gênero *Strigomonas* (*Strigomonas* sp.) e iii) um possível novo gênero (Trypanosomatidae sp.). Os resultados aqui apresentados indicam a necessidade da integração dos dados obtidos por análises moleculares com critérios bioquímicos, morfológicos e de interação parasito-hospedeiro para compreender melhor a filogenia e evolução da subfamília Leishmaniinae, assim como o aprofundamento da biodiversidade do grupo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE LEISHMANIINAE SUBFAMILY AND TAXONOMIC IDENTIFICATION OF TRYPANOSOMATIDS ISOLATED FROM LEPIDOPTERA

ABSTRACT

MASTER DEGREE

Amanda Rodrigues Caetano

The Kinetoplastea class comprises the order Trypanosomatida, which has a single family: Trypanosomatidae. The representatives of this family have a single flagellum and the apomorphy is the kinetoplast, a compacted DNA from the single mitochondrion. The taxonomic classification of these trypanosomatids based solely on morphological characters and their life cycles do not reflect the genetic diversity and evolutionary relationships of the group. Nowadays, molecular approaches are routinely employed for taxonomic and phylogenetic studies of trypanosomatids. Here, we reviewed the phylogenetic relationships among genus of subfamily Leishmaniinae, focusing on selected species of the genera *Leishmania*, *Paraleishmania* and *Endotrypanum (nomen dubium)*, we also analyzed new isolates from biodiversity prospecting projects at FioCruz Protozoa Collection (COLPROT) to evaluate the occurrence of trypanosomatids in the Lepidoptera. To this end, two genes were sequenced and analyzed, gGAPDH and 18S, which have a large database (*Genbank*) and are widely used as a trypanosomal taxonomic tool, although they are little explored for *Leishmania* genus. Our results corroborate the proposition for creating two infamilies in the Leishmaniinae subfamily. In the Leishmaniatae infrafamily, concatenated analysis of the gene sequences has shown that these genes do not have a good resolution to identify species of the genus *Leishmania*, but it allows the classification into complexes and subgenus. Our results also indicate the synonymization of a *Leishmania forattinii* strain to *Herpetomonas samuelpeçoi*. The phylogenetic analysis also shows that the genus *Paraleishmania*, *Endotrypanum (nomen dubium)* and *Leishmania* are phylogenetically related to each other. In Crithidiatae infrafamily, the analyzes showed the phylogenetic proximity between *Crithidia* and *Leptomonas* species. In addition, we performed the taxonomic identification of 33 isolates of the Lepidoptera order. Among the 33 isolates, we identified three species that were already described in the literature: *C. mellificae*, *C. thermophila* and *C. insperata*; isolates representatives of six possible OTUs, which are candidates for: i) new species of the genus *Crithidia* (*Crithidia* sp1; *Crithidia* sp2; *Crithidia* sp3; *Crithidia* sp4); ii) a new species of the genus *Strigomonas* (*Strigomonas* sp.) and iii) a candidate for a total new genus (Trypanosomatidae sp.). The results presented herein indicate the necessity to integrate the data obtained by molecular analysis with the biochemical, morphological and parasite-host interaction criteria to better understand the phylogeny and evolution of the Leishmaniinae subfamily, as well as to deepen the biodiversity knowledge of this group.

1. Biodiversidade:

Mudanças climáticas têm aumentado a distribuição geográfica de vetores transmissores de zoonoses. As temperaturas mais altas e invernos mais curtos favorecem o estabelecimento de doenças tropicais como dengue, malária e febre amarela em regiões onde não existiam. O aumento da população mundial, o desmatamento e a destruição do habitat de animais selvagens favorecem a aproximação entre animais e humanos assim como a transmissão de zoonoses e o desenvolvimento de novas doenças.

O termo *One World – One Health* (Um Mundo – Uma saúde) foi lançado para englobar a saúde humana, animal e do meio ambiente. Nessa ocasião foram listadas recomendações para uma abordagem mais holística para a prevenção de doenças endêmicas e zoonóticas que respeite a integridade dos ecossistemas para o benefício do homem, dos animais e da biodiversidade (Gibbs, 2014). Cientistas moleculares tem comprovado através de análises comparativas de sequências genômicas, a semelhança a nível genético entre homens e animais assim como dos patógenos que os afetam. A ciência molecular reforça que mutações de um determinado gene em uma espécie causa uma doença similar em outra espécie (Cardiff *et al.*, 2008).

Em praticamente todos os grupos de seres vivos, o Brasil detém números impressionantes de espécies sendo o país mais megadiverso do planeta (Myers *et al.*, 2000). O bioma mata atlântica é o terceiro maior bioma brasileiro compreendendo ecossistemas particulares, tais como manguezais e florestas que abrangem quase toda a costa brasileira. O bioma é conhecido como o mais rico em plantas endêmicas estimando-se um número de 7524 espécies. No entanto, menos de 10% da floresta nativa é preservada e conseqüentemente é uma região muito impactada pela ação antrópica (Pacchioni *et al.* 2014). Já a Amazônia brasileira representa metade da floresta tropical do mundo e abriga um terço das espécies da Terra. O bioma possui cerca de 40.000 espécies de plantas superiores e uma abundância ainda maior de invertebrados. Entretanto, possui uma das maiores taxas de desmatamento devido a atividades antropogênicas (Watson *et al.*, 2018).

Os estudos de prospecção da biodiversidade estimam os números de organismos macroscópicos. No entanto, se extraírmos o conteúdo de um único inseto e analisarmos em um microscópio encontraremos centenas ou milhares de espécies microbianas (Pace, 1997). Considerando a diversidade de espécies de insetos conhecidas e a por ser descrita, pode-se estimar que a diversidade de micro-organismos conhecida representa ainda uma ínfima fração do total, com um imenso potencial a ser explorado. Por este motivo, a coleta de dados

ambientais que ajude a compreender o perfil da comunidade bacteriana, de vírus e protozoários usando novas tecnologias como o sequenciamento de DNA vem sendo muito utilizado nas análises filogenéticas. O gene 16S rRNA tornou-se o marcador mais amplamente utilizado nas análises bacterianas pois apresenta regiões conservadas e altamente variáveis para permitir a identificação de características filogenéticas destes micro-organismos (Pesante *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016).

O aprofundamento do conhecimento sobre a filogenia e evolução das espécies passa necessariamente pela catalogação da biodiversidade. Apesar dos grandes avanços no conhecimento da biodiversidade nos últimos anos, a diversidade microbiana ainda é pouco conhecida e explorada (Pawlowski *et al.*, 2012). Para exemplificar o tamanho desse desconhecimento, basta avaliarmos que os insetos são os organismos que contam com a maior diversidade de espécies catalogadas e que cada inseto possui de centenas a milhares de espécies diferentes de micro-organismos. Os isolados da família Trypanosomatidae podem ser encontrados em diversos insetos hospedeiros, como predadores, fitófagos e hematófagos. As espécies já descritas, são em sua maioria, isoladas de insetos das ordens Diptera e Hemiptera (Santos, 2004; Borghesan, 2013; Maslov *et al.*, 2013).

Para micro-organismos eucarióticos, devido a sua ampla diversidade filogenética, estudos de larga escala de *metabarcoding* não são aplicáveis e é necessário focar em grupos taxonômicos específicos, o que gera dados menos representativos da diversidade global (Pawlowski *et al.*, 2012). Portanto, para avançarmos no conhecimento das relações evolutivas e preservação da diversidade de micro-organismos eucarióticos, torna-se necessário reunir (i) dedicação em um determinado táxon, (ii) tentativa de isolamento dos micro-organismos e (iii) depósito dos isolados em coleções biológicas institucionais que sejam regidas por normas internacionais.

Existem poucos estudos sobre tripanossomatídeos isolados de Lepidoptera e nada se sabe sobre a diversidade, distribuição, frequência e o papel desses protozoários na dinâmica das populações desse grupo de inseto. São apenas três relatos de tripanossomatídeos isolados de Lepidoptera, sendo todos em mariposas: (I) um relato impreciso de 1905 que descreve infecção de *Bombyx mori* (Bombycidae) por *Herpetomonas bombycis* (Levaditi, 1905); (II) um breve relato de *Herpetomonas* sp. na mariposa *Mythimna separata* (Noctuidae) (Malone *et al.* 1985); e (III) um outro isolado em *Operophtera brumata* (Geometridae) classificado no gênero *Rhyncoidomonas* (Page *et al.*, 1986). Nestes casos, a classificação foi baseada apenas em caracteres morfológicos. Além disso, só existe uma única lâmina tipo de um isolado que

está depositada no Museu de História Natural de Londres impossibilitando análises filogenéticas que auxiliem na caracterização e identificação desses organismos (Voltýpka *et al.*, 2015; d'Avila-Levy *et al.*, 2016). A escassez de informações sobre tripanosomatídeos observados em Lepidoptera nos motivou a analisar novos isolados oriundos de projetos de prospecção de biodiversidade da Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT), que visavam avaliar a ocorrência de tripanossomatídeos na ordem Lepidoptera e cujos isolados foram classificados dentro da família Trypanosomatidae.

2. Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos:

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular vem permitindo o avanço do conhecimento desses micro-organismos. Um grande número de novos gêneros e espécies vem sendo descritos com o avanço da taxonomia e filogenia molecular. Diante do grande número de espécies conhecidas de insetos, plantas e vertebrados que são os prováveis hospedeiros dos tripanossomatídeos, ainda há uma grande diversidade desses parasitos a ser descoberta. Por este motivo, a distribuição real dos tripanossomatídeos em seus hospedeiros é um ponto fundamental que também deve ser explorado e compreendido (Podlipaev, 2001; Westenberger *et al.*, 2004; Pawlowski *et al.* 2012; d'Avila-Levy *et al.*, 2015).

A inclusão da abordagem molecular como um critério adicional para estudos taxonômicos e filogenéticos dos tripanossomatídeos mostrou que a classificação fundamentada unicamente em caracteres morfológicos e ciclos de vida não refletia a diversidade genética e as relações evolutivas do grupo (Maslov *et al.*, 2001). Na sistemática dos tripanossomatídeos, bem como nos estudos de biodiversidade, uma questão que assolou a abordagem taxonômica baseada em hospedeiros e morfologia foi a escassez de caracteres para descrição dos táxons (espécies e gêneros) e a falta de critérios objetivos compreender as relações filogenéticas entre os táxons.

Uma taxonomia integrativa é o almejado para maior acurácia na descrição e re-descrição de espécies (Voltýpka *et al.* 2015). Análises morfológicas, comportamento em cultivo, características bioquímicas e desenvolvimento no hospedeiro devem ser considerados e analisados juntamente com as divergências genéticas. Portanto, a compreensão de que a taxonomia clássica tem um valor limitado para revelar subdivisões dentro da família Trypanosomatidae culminou com o uso rotineiro de abordagens filogenéticas moleculares, que empregam amplamente os genes da subunidade menor do RNA ribossomal (18S) e o gene glicosomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) (Maslov *et al.*, 2013).

O conceito biológico de espécie está fundado nas noções de intercruzamento e isolamento reprodutivo. Se os indivíduos de uma população são capazes de intercruzar com indivíduos de outra população, produzindo descendentes férteis, então as duas populações fazem parte da mesma espécie. O isolamento reprodutivo é outra face dessa mesma moeda: populações reprodutivamente isoladas pertencem a espécies diferentes. Para Velasco (2008; 2013), a filogenia é a história das *cisões* populacionais, e ela nem sempre coincide com a história do isolamento reprodutivo entre as populações. Velasco (2013) argumenta que a filogenia nada é senão a história das populações e que as árvores genéticas também discordam das árvores populacionais.

A analogia entre cladogramas com diferentes propósitos podem ser feitos a respeito da mesma região geográfica. Também há diferentes cladogramas que podem ser feitos com os mesmos grupos de organismos. Cada um desses diferentes cladogramas é a ilustração de um aspecto da complexa história evolutiva dos seres vivos. Para acessarmos o grau de homologia, é possível atribuir um valor de propabilidade dadas as árvores analisadas e outros parâmetros de interesse. Desta forma, o que se faz é acessar a probabilidade do evento ter acontecido de uma determinada maneira levando-se em conta todas as outras possíveis maneiras analisadas (Pamilo; Nei, 1988).

3. Genes utilizados nas análises taxonômicas e filogenéticas:

Um aumento considerável no conhecimento sobre a biodiversidade adveio do barateamento das técnicas de sequenciamento e das novas metodologias de análise genômica em larga escala (Rodrigues *et al.* 2006, 2008; Teixeira *et al.* 2011; Votýka *et al.*, 2015; d'Avila-Levy *et al.* 2015). O sequenciamento do DNA de diversos alvos do genoma nuclear e mitocondrial dos tripanossomatídeos vem contribuindo para aprimorar o conhecimento sobre a taxonomia e filogenia deste grupo de protozoários. Os alvos mais utilizados para análise taxonômica e filogenética dos tripanossomatídeos monoxênicos são: o 18S, gGAPDH, *spliced leader* (SL) e o gene do espaçador interno transcrito (ITS) (Maslov *et al.* 1996; Croan *et al.* 1997; Lukeš *et al.* 1997; Hollar *et al.* 1998; Yurchenko *et al.* 2000; Merzlyak *et al.* 2001; Hamilton *et al.* 2004; Teixeira *et al.* 2011; Borghesan *et al.* 2013). Os marcadores utilizados na análise de tripanossomatídeos heteroxênicos variam em função do gênero estudado e incluem: glicose 6-fosfato isomerase (GPI) (Westenberger *et al.*, 2005), espaçadores internos transcritos do gene rDNA (ITS 1 e ITS 2) (Dávila & Momen, 2000), gene da subunidade catalítica da DNA polimerase (POLA) (Croan *et al.*, 1997), gene

codificante do RNA polimerase II (RPOIILS) (Croan & Ellis, 1996; Croan *et al.*, 1997), o gene citocromo oxidase II (COII) (Machado, 2001), o gene da glicoproteína de 63 kDa (GP63) (Mauricio *et al.*, 2007), gene da cisteína protease B (CPB) (Hide *et al.*, 2007), o gene citocromo B (cytB) (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Asato *et al.*, 2008) e proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) (Garcia *et al.*, 2004).

Os genes 18S e gGAPDH vêm sendo utilizados como barcoding de tripanossomatídeos e têm permitido a identificação de uma grande diversidade de espécies, particularmente dos monoxênicos (d'Avila-Levy *et al.*, 2015). O gene SSUrRNA é empregado em estudos de identificação, filogenia e avaliação inter e intra-específica de diversas espécies de tripanossomatídeos (Van Eys *et al.*, 1992; Schonian *et al.*, 2003; Yurchenko *et al.*, 2006; Marcili *et al.*, 2014). Entretanto, os estudos relatam que esta região só permite a identificação ao nível de gênero para o grupo de *Leishmania* (Van Eys *et al.*, 1992; Lachaud *et al.*, 2002; Schönian *et al.*, 2003; Disch *et al.*, 2005). O gene gGAPDH é pouco empregado na identificação taxonômica e nas relações filogenéticas de *Leishmania*, mas possibilita a identificação taxonômica das espécies de diversos outros gêneros de tripanossomatídeos além de apresentar uma boa resolução filogenética (Hamilton *et al.*, 2004, 2007; Stevens *et al.*, 2008).

3.1 Gene GAPDH

Nestes protozoários, o gene GAPDH, apresenta duas cópias idênticas dispostas em *tandem*. Uma dessas cópias é o gene que codifica a enzima glicossômica (gGAPDH) e outro que codifica a enzima citosólica (cGAPDH). O gGAPDH foi herdado de um ancestral comum de cinetoplastídeos (Hannaert *et al.*, 1998; Sogin *et al.*, 1998) e é amplamente utilizado em estudos filogenéticos por codificar proteínas, apresentar um nível maior de polimorfismo quando comparado a outras sequências, além de ser altamente conservado entre as espécies de tripanossomatídeos. Essas características possibilitam um alinhamento múltiplo confiável e uma melhor resolução no estudo da taxonomia e inferência filogenética de organismos distantes (Hamilton *et al.*, 2004, 2005, 2007; Stevens *et al.*, 2008; Votýka *et al.*, 2015).

3.2 Gene Ribossômico

O gene ribossômico é composto por várias unidades de transcrição. Uma unidade de transcrição (pré-RNA) é processada dando origem a três moléculas maduras de RNA: 18S, 24S e 5.8S. A subunidade maior - 24S (LSU, pela sigla em inglês) que possui duas versões (24S α e 24S β) e a subunidade menor - 18S (SSU, pela sigla em inglês) que é formada por 8

regiões universalmente conservadas (U1-U8) e 9 regiões variáveis (V1-V9). Além disso, existem as moléculas com diferentes pesos moleculares no cistron ribossômico (5.8S, S1, S2, S4 e S6) (Sogin *et al.* 1986; Hernández *et al.*, 1990). As sequências das regiões V7/V8 SSUrRNA vêm sendo amplamente utilizadas como ferramenta de código de barras de DNA (*Barcoding*) na análise da diversidade de tripanossomatídeos (Maia da Silva *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2008; Viola *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2011; Borghesan *et al.*, 2013; Votýka *et al.*, 2015). A presença de regiões variáveis flanqueadas por regiões conservadas auxilia no alinhamento das sequências. Entretanto, as sequências da região V7/V8 do RNA ribossomal apresentam baixas divergências intra-específicas devido à alta pressão seletiva. Análises filogenéticas baseadas em sequências concatenadas de gGAPDH e SSUrRNA geram topologias muito robustas e são utilizadas para o posicionamento de novas espécies, bem como, na reconstrução da história evolutiva dos tripanossomatídeos (Lima *et al.*, 2012, 2013; Fermino *et al.*, 2013; Marcelli *et al.*, 2014). Além disso, os genes V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH possuem uma vasta quantidade de sequências em bancos de dados públicos para os tripanossomatídeos monoxênicos, o que possibilita a identificação e classificação de novos isolados (Hamilton *et al.*, 2004, 2007; Stevens, 2008; Votýka *et al.*, 2015).

4. Família Trypanosomatidae:

A Classe Kinetoplastea, cuja apomorfia é o cinetoplasto, está classificada dentro do filo Euglenozoa (Eukaryota: Excavata). A ordem Trypanosomatida apresenta uma única família: Trypanosomatidae (Lom 1976; Vickerman 1976; Moreira *et al.*, 2004) e os representantes dessa família possuem um único flagelo.

A Família Trypanosomatidae é subdividida em dois grupos, em função dos hospedeiros que participam de seu ciclo de vida: os monoxênicos e os heteroxênicos. Os tripanossomatídeos monoxênicos possuem um único hospedeiro ao longo do ciclo de vida, usualmente um inseto e não são patogênicos para o ser humano, mas compartilham similaridades bioquímicas e genéticas com os tripanossomatídeos patogênicos (d'Avila-Levy *et al.*, 2004). A patogenicidade dos tripanossomatídeos monoxênicos para os insetos ainda é questionável, enquanto algumas espécies claramente impactam na fisiologia do hospedeiro, outros estabelecem uma relação de neutralismo/comensalismo (Simpson *et al.*, 2006). Já se sabe que o paradigma “um hospedeiro - um parasita” (Wallace, 1966) não reflete o comportamento biológico desses micro-organismos. Entretanto, a interação com o hospedeiro é crítica, uma vez que o parasito desenvolve interações moleculares ao hospedeiro para

estabelecer uma infecção estável e se propagar para outros insetos, enquanto outros tripanossomatídeos são encontrados sistematicamente em diversos hospedeiros (Votypka *et al.*, 2013). Os gêneros *Crithidia* e *Lotmaria* constituem um interessante exemplo desta vasta possibilidade de interações. Enquanto *Crithidia mellificae* e *Lotmaria passim* são correlacionadas com o índice de mortalidade de colônias de abelhas causando um impacto negativo no papel polonizador, outras espécies do gênero *Crithidia* são reportadas nos mais diversos hospedeiros, sem nenhum impacto conhecido (Ravoet *et al.*, 2015; Vavilova *et al.*, 2017).

Os membros da Família Trypanosomatidae podem apresentar distintas morfologias durante seu ciclo de vida e em cultivo no laboratório. Alterações morfológicas dentro do mesmo gênero podem ser induzidas por condições ambientais, cultivo *in vitro* e adição de drogas (Podlipaev, 2001; Lopes *et al.*, 1989; Momen, 2001; Yurchenko *et al.*, 2006). Apesar de existirem trabalhos correlacionando a morfogênese com o processo de patogenicidade ou capacidade de interação com células-alvo, as possíveis vantagens adaptativas decorrentes da variabilidade dentro de uma mesma espécie ainda são pouco conhecidas (De Jesus *et al.*, 1993, Wheeler e Ghull, 2013). Os autores, Hoare e Wallace (1966) se basearam na forma celular, na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e no ponto de emergência do flagelo para definir as diferentes formas de desenvolvimento destes protozoários. Deste modo, sete morfotipos principais (**Figura 1**) foram definidos. Os morfotipos alongados e fusiformes foram denominados promastigotas, opistomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, enquanto formas esféricas e arredondadas foram chamadas de amastigotas, coanomastigotas e esferomastigotas (Hoare 1964; Hoare e Wallace, 1966).

Em comparação com outros protozoários, chama a atenção a vasta literatura e os extensos estudos sobre a Família Trypanosomatidae. Isto ocorre por um conjunto de razões, sendo primordial, o fato de albergarem tripanossomatídeos heteroxênicos. Estes tripanossomatídeos alternam o ciclo de vida entre um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado e são representados pelos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* (este com status taxonômico questionável), o mais novo gênero *Paraleishmania*, cujos hospedeiros finais são em sua maioria mamíferos e o gênero *Phytomonas* cujo hospedeiro final é uma planta (Hoare, 1964; Ross, 1903; Mesnil & Brimont, 1908). Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são amplamente estudados por conter espécies responsáveis por importantes enfermidades em humanos e outros mamíferos. A Leishmaniose, doença de Chagas e doença do sono são graves doenças humanas causadas por *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e *Trypanosoma brucei sensu lato*, respectivamente (Baker, 1995).

Além disso, os protozoários da Família Trypanosomatidae não patogênicos a seres humanos podem ser usados como modelos de estudo para compreensão da bioquímica, biologia celular, molecular e ultraestrutural, cada qual apresentando características ímpares em processos biológicos, atraindo a curiosidade e atenção da comunidade científica. Outra questão que destaca a relevância deste grupo de microrganismos é a sua utilização como plataforma para a produção de proteínas eucarióticas, como por exemplo, a eritropoietina e a insulina produzida por *Leishmania tarentolae* (Dortay, 2010) e no desenvolvimento de vacinas (Pinge-Filho et al., 2005; da Silva et al., 2013).

Os gêneros formalmente descritos como tripanossomatídeos monoxênicos são: *Crithidia*, *Leptomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Sergeia*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Blechomonas*, *Paratrypanosoma*, *Wallacemonas*, *Kentomonas*, *Lotmaria*, *Lafontella*, *Jaeninimonas*, *Novymonas*, *Borovskya* e *Zelonia* (Kent, 1808; Léger, 1902; Wallace, 1966; Vickerman, 1976; Wallace, 1979; Wallace et al., 1983; Sousa & Corte-Real, 1991; Merzlyak et al., 2001; Svobodová et al., 2007; Borghesan et al., 2013; Flegontov et al., 2013; Votýpka et al., 2013, 2014; Kostygov et al., 2014; Schwarz et al., 2015; Yurchenko et al., 2016; Barrat et al., 2017; Espinosa et al., 2016; Kostygov & Yurchenko, 2017).

Esta família é constituída por parasitos que apresentam fenômenos moleculares característicos, tais como: variação antigênica, trans-splicing e edição de RNA mitocondrial. Sua morfologia é definida por uma organização nuclear incomum com corpo basal localizado próximo ao cinetoplasto (estrutura formada por uma rede fibrilar e compacta de DNA mitocondrial, composta por moléculas circulares e com variações de tamanho), mitocôndria única e ramificada por todo o corpo celular do protozoário, além de organelas típicas. Os glicossomos, por exemplo, são organelas relacionadas aos peroxissomos e se caracterizam por reunir algumas enzimas da via glicolítica. A presença de uma rede de microtúbulos subpeliculares, localizada logo abaixo da membrana plasmática e conectada à sua face interna, colabora para a forma característica apresentada por esses parasitos (Simpson, 1972; Vickerman, 1994; Lukes et al., 2002; McGhee e Cosgrove, 1980; De Souza, 2008; Bernard e Rossignol, 2008).

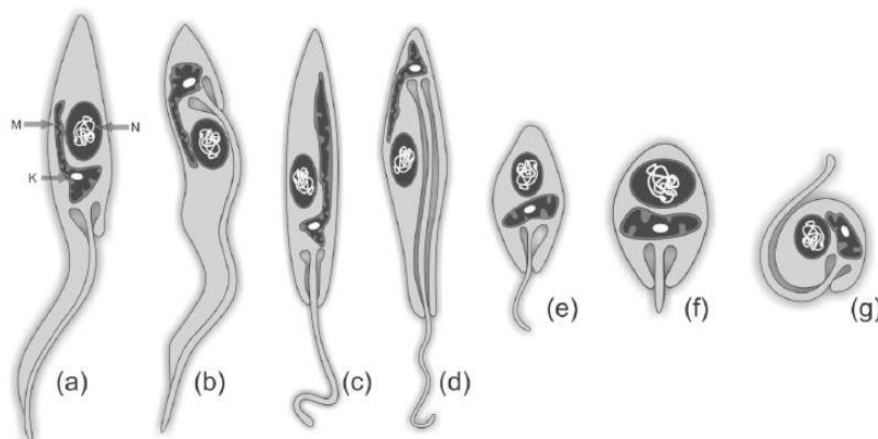


Figura 1. Representação esquemática das diferentes formas celulares encontradas em diferentes estágios da família Trypanosomatidae. (a) epimastigota, (b) tripomastigota, (c) promastigota, (d) opistomastigota, (e) coanomastiga, (f) amastigota, (g) esferomastigota, (K) cinetoplasto, (M) mitocôndria, (N) núcleo. Imagem reproduzida de d'Avila-Levy *et al.*, 2015.

5. Evolução na Família Trypanosomatidae:

As hipóteses fundamentadas em reconstruções filogenéticas tentam explicar as relações ancestrais-descendentes da Família Trypanosomatidae. Mesmo depois de mais de duas décadas de análises moleculares, algumas relações filogenéticas entre os grandes clados dos tripanossomatídeos permanecem sem solução (Votýpka *et al.*, 2015). Atualmente, os estudos moleculares que englobam milhares de sequências nucleotídicas de diferentes espécies são rotineiramente usados para inferir as relações evolutivas entre esses protistas. Nas últimas décadas, uma abordagem integrativa entre os parâmetros taxonômicos clássicos e aqueles fundamentados na análise genômica têm se revelado eficiente para a reconstrução da história evolutiva dos diferentes organismos, mas especialmente dos micro-organismos. Diferentes histórias evolutivas são propostas dependendo do gene, táxons e métodos filogenéticos utilizados (Deschamps *et al.*, 2011).

Nos tripanossomatídeos, há indícios de que o ciclo de vida heteroxênico tenha surgido de forma independente ao longo da evolução desses parasitos. Análises filogenéticas sugerem que um bodonídeo ancestral, biflagelado comensal de vida livre, pode ter sido ingerido por um inseto e se adaptado ao habitat intestinal originando o ciclo de vida monoxênico (Hamilton *et al.*, 2004). Outros estudos sugerem que os insetos passaram a inocular os parasitos em vertebrados por aquisição da hematofagia e estes se adaptaram ao novo hospedeiro. Os mesmos passaram a circular entre insetos hematófagos e vertebrados terrestres originando o ciclo de vida heteroxênico, ou seja, através de uma transmissão acidental durante a alimentação de insetos hematófagos (Simpson *et al.*, 2006; Stevens, 2008). Existem algumas

vantagens evolutivas para tal adaptação e exploração em novos hospedeiros. Os novos nichos ecológicos podem atender melhor às necessidades dos parasitos e facilitar sua distribuição, mas os mecanismos moleculares de tais adaptações são desconhecidos (Lukes *et al.*, 2014).

Uma nova espécie, *Paratrypanosoma confusum*, isolada do intestino de fêmeas de mosquito (*Culex pipens*) (Flegontov *et al.*, 2013) se posiciona filogeneticamente entre os parasitos de vida livre (bodonídeos) e os parasitos obrigatórios (tripanossomatídeos), apoiando a hipótese de que o primeiro flagelado ancestral se hospedou em insetos ou em outros hospedeiros invertebrados e só posteriormente parasitaram vertebrados (Léger, 1902). A análise comparativa dos genomas de *Bodo saltans* (Jackson *et al.*, 2008) e *Paratrypanosoma confusum* pode lançar luz sobre esta mudança dramática. A abordagem filogenética molecular também demonstra um clado onde estão inseridos os gêneros *Leishmania* e *Endotrypanum* (*nomen dubium*) (tripanossomatídeos heteroxênicos) e os tripanossomatídeos monoxênicos (Flegontov *et al.*, 2013; Votýpka *et al.*, 2014; Yurchenko *et al.*, 2014). Desta forma, as relações filogenéticas e a evolução desta família ainda são ponto de debate. Conjugado a este fato está a descoberta de um flebotomíneo fossilizado em âmbar datando de 220 milhões de anos, no interior do qual foi encontrada uma quantidade substancial de flagelados parecidos morfológicamente com *Leishmania*, além de células sanguíneas vermelhas nucleadas (Poinar e Poinar, 2004). Sendo assim, a justificativa mais plausível para a evolução do parasitismo dixênico, típico de tripanossomatídeos heteroxênicos, postularia que um ancestral de *Leishmania*, parasito de insetos que se alimentavam de sangue, teria sido injetado acidentalmente em um vertebrado durante um repasto sanguíneo e se adaptado ao novo ambiente apresentado (Flegontov *et al.*, 2013).

6. Taxonomia da subfamília Leishmaniinae

A subfamília Leishmaniinae foi originalmente estabelecida em 2012 incluindo os gêneros *Leptomonas*, *Crithidia* e *Leishmania* (Jirků *et al.*, 2012). A subfamília foi revisada e atualmente inclui os gêneros *Leptomonas* (Kent, 1808), *Crithidia* (Léger, 1902), *Zelonia* (Espinosa *et al.*, 2016), *Novymonas* (Kostygov *et al.*, 2016), *Lotmaria* (Schwarz *et al.*, 2015), *Borovskya* (Kostygov & Yurchenko, 2017) *Leishmania* (Ross, 1903), *Paraleishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000) e *Endotrypanum* (*nomen dubium*) (Mesnil & Brimont, 1908) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Tabela da classificação atual dos gêneros e espécies pertencentes a subfamília Leishmaniinae.

Gênero	Revisada por	Espécies	Hospedeiros
<i>Crithidia</i> (Léger, 1902)	—	<i>Crithidia abscondita</i> <i>Crithidia acantocephali</i> <i>Crithidia bombi</i> <i>Crithidia brachyflageli</i> <i>Crithidia brevicula</i> <i>Crithidia expoeki</i> <i>Crithidia fasciculata</i> <i>Crithidia flexonema</i> <i>Crithidia hamosa</i> <i>Crithidia insperata</i> <i>Crithidia mellificae</i> <i>Crithidia otongatchiensis</i> <i>Crithidia permixta</i> <i>Crithidia thermophila</i> <i>Crithidia pragensis</i>	Diptera Hemiptera Hymenoptera
<i>Leptomonas</i> (Kent, 1808)	—	<i>Leptomonas tenua</i> <i>Leptomonas barvae</i> <i>Leptomonas spiculata</i> <i>Leptomonas pyrrhocoris</i> <i>Leptomonas podlipaev</i> <i>Leptomonas jaderae</i> <i>Leptomonas tarcoles</i> <i>Leptomonas seymori</i> <i>Leptomonas acus</i> <i>Leptomonas bifurcata</i> <i>Leptomona smoramango</i>	Hemiptera Heteroptera Coleoptera Odonata
<i>Zelonia</i> (Espinosa <i>et al.</i> , 2016; Barrat <i>et al.</i> , 2017)	—	<i>Zelonia australiensis</i> <i>Zelonia costaricensis</i>	Diptera Hemiptera
<i>Lotmaria</i> (Schwarz <i>et al.</i> , 2015)	—	<i>Lotmaria passim</i>	Hymenoptera
<i>Novymonas</i> (Kostygov <i>et al.</i> , 2016)	—	<i>Novymonas esmeraldas</i>	Hemiptera

Borovskya
(Kostygov & Yurchenko, 2017)

Borovskya barvae

Hemiptera: Miridae

Leishmania
(Ross, 1903)

Subgênero *Mundinia*
(Espinosa *et al*, 2016)

Subgênero

Leishmania:

L. donovani
L. venezuelensis
L. archibaldi
L. forattinii
L. infantum
L. amazonensis
L. tropica
L. mexicana
L. aethiopica
L. pifanoi
L. aristidesi
L. major
L. arabica
L. turanica
L. gerbilli

Hospedeiro invertebrado:

Diptera:
Psychodidae

Subgênero *Viannia:*

L. braziliensis
L. shawi
L. peruviana
L. lainsoni
L. naiffi
L. lindenbergi
L. panamensis
L. utingensis
L. guyanensis

Hospedeiro vertebrado:

Carnivora: Canidae
Carnivora: Felidae
Rodentia
Chiroptera
Pilosa:
Bradipodidae
Perissodactyla:
Equino
Primata: *Homo sapiens*

Subgênero

Sauroleishmia:

L. agamae
L. gyminodactly
L. adleri
L. gulikae
L. tarentolae
L. zuvkermani
L. zmeevi
L. platycephala
L. hemidactyli
L. senegalensis
L. adleri
L. gulikae

Subgênero *Mundinia*

L. martiniquensis
L. enriettii

<i>Paraleishmania</i> (Cupolillo <i>et al.</i> , 2000)	Kostygov & Yurchenko, 2017	<i>P. deanei</i> <i>P. hertigi</i>	Hospedeiro vertebrado: <i>Coendou prehensilis</i>
<i>Endotrypanum (nomem dubium)</i> (Mesnil & Brimont, 1908)	Kostygov & Yurchenko, 2017	<i>E. equatorensis</i> <i>E. colombiensis</i> <i>E. schaudinni</i> <i>E. monterogeii</i>	Hospedeiro invertebrado: Diptera: Psychodidae Hospedeiro vertebrado: Pilosa: Bradypodidae

O gênero *Crithidia* caracteriza-se por apresentar formas coanomastigotas no seu ciclo de vida (Hoare & Wallace, 1966). No entanto, a dificuldade de identificação das formas típicas, reforça a necessidade dos critérios moleculares na classificação dos tripanossomatídeos (Camargo 1992). Os isolados do gênero podem ser encontrados em Diptera, Hemiptera e Hymenoptera (tanto predadores quanto fitófagos e hematófagos) (Maslov *et al.*, 2013). As análises taxonômicas demonstraram que diversas espécies descritas como *Crithidia* não se encaixavam nesse gênero (Brandão *et al.*, 2000). Mais tarde, Teixeira e colaboradores (2011) publicaram uma revisão completa das espécies que apresentam endossimbionte e validaram os novos gêneros *Angomonas* e *Strigomonas* por meio de uma metodologia análoga ao DNA *barcoding* (do inglês “Código de Barras de DNA”), utilizando a região V7V8 da subunidade menor do rRNA e por meio das análises filogenéticas com os alvos moleculares gGAPDH e ITS (Teixeira *et al.*, 2011). Além das reclassificações em outros gêneros, duas espécies do extinto gênero *Wallaceina* (*Wallaceina brevicula* e *Wallaceina inconstans*) foram sinonimizadas e realocadas no gênero *Crithidia* como *Crithidia brevicula* (Yurchenko *et al.*, 2014; Kostgov *et al.*, 2014). Outro grupo das espécies pertencentes ao gênero que vem sendo bastante estudado são os parasitos de abelha: *C. mellificae*, *C. bombi* e *C. expoeki* (Schmid-Hempel, 2010; Runckel *et al.*, 2014).

As análises microscópicas demonstraram diferentes formas móveis entre duas estirpes de *C. mellificae*. Os genes gGAPDH, 18S e citocromo b foram analisados no trabalho

de Schwarz (2015) e indicaram divergências que variam de 5-13% entre estas duas espécimes. Estas análises foram definitivas para descrever o novo gênero *Lotmaria* que abrange a espécie *Lotmaria passim*. A espécie é dominante na Bélgica, Japão e Suíça e até o momento só foi isolada de *Apis mellifera* e de um exemplar de *Apis cerana*. As análises demonstram que os protozoários encontrados em *Apis mellifera* na China e nos EUA são linhagens de *L. passim*, o que indica que a espécie é cosmopolita (Schwarz *et al.*, 2015; Ravoet *et al.*, 2015). Além disso *L. passim* demonstra um trecho variável na sequência que codifica para a proteína gp63 em comparação a sequência analisada para *C. mellificae* (Schwarz *et al.*, 2015). Os homólogos desta proteína são pouco estudados em tripanossomatídeos monoxênicos mas parecem desempenhar papéis essenciais na nutrição e na interação com as células epiteliais dos insetos (Santos *et al.*, 2006).

O gênero *Novymonas* foi descrito recentemente por Kostygov e colaboradores (2016) e conta com apenas uma espécie descrita: *Novymonas esmeraldas*. O flagelado foi isolado do intestino de um Hemiptera (*Niesthrea vincentii*) coletado no Equador e apresenta endossimbiontes bacterianos. O gênero *Novymonas* foi considerado um novo gênero por representar um tripanossomatídeo com características totalmente distintas das espécies descritas que albergam endossimbiontes. A nova espécie de bactéria, *Candidatus Pandoraea novymonadis*, também foi descrita por sequenciamento do genoma completo e também é díspar dos simbiontes previamente descritos na subfamília Strigomonandinae (Kostygov *et al.*, 2016).

Em uma análise filogenética realizada com o alvo gGAPDH, uma nova espécie isolada de Hemiptera (Miridae: *Collaria oleosa*) se posicionou no clado “SE” que inclui uma variedade de parasitos monoxênicos juntamente com o clado de espécies de *Leishmania*. A espécie foi descrita como *Leptomonas barvae* (Yurchenko *et al.* 2006). Mais tarde, Maslov *et al.*, (2010) discutem a descrição da nova espécie com base nas análises filogenéticas, nas suas características morfológicas e ciclo de vida. A espécie foi então relatada mais próxima do gênero *Leishmania* e filogeneticamente distante das espécies de *Leptomonas* com base nos alvos SL e SSUrRNA (Maslov *et al.* 2010). Recentemente, Kostygov & Yurchenko (2017) inseriram um novo gênero (*Borovskya*) para acomodar *Leptomonas barvae* dentro da subfamília Leishmaniinae.

Mais um gênero novo, *Zelonia*, foi descrito e inserido na subfamília leishmaniinae. O gênero inclui as espécies *Zelonia costaricensis* (Espinosa *et al.*, 2016) e *Zelonia australiensis* (Barrat *et al.*, 2017). A espécie *Z. costaricensis* foi primeiramente identificada como *Leptomonas costaricensis*. O isolado de Hemiptera da Costa Rica se posicionou como o clado

mais próximo do gênero *Leishmania* dentre os outros gêneros pertencentes a subfamília Leishmaniinae (Yurchenko *et al.*, 2006). Posteriormente, o gênero *Zelonia* foi criado para acomodar este isolado que se mostrava distante de *L. pyrhorcoris* e *L. seymori* com base no gene 18S (Espinosa *et al.*, 2016). A outra espécie do gênero *Zelonia* (*Zelonia australiensis*) foi isolada de Diptera (gênero *Simulium*) nos trópicos da Austrália. As análises morfológicas, ultraestruturais e análises de sequências concatenadas com base nos alvos gGAPDH, 18S rDNA, HSP 70, ITS1, RPOIILS confirmaram a proximidade deste isolado com a espécie *Zelonia costaricensis*, formando um táxon irmão (Barrat *et al.*, 2017).

O gênero *Leptomonas* apresenta os morfotipos promastigota e amastigota e tem como espécie-tipo *Leptomonas seymouri* (Wallace, 1977). As espécies do gênero são frequentemente isoladas de Hemiptera de diversas famílias e origens geográficas. Tendo em vista que o critério tradicional para a classificação do gênero esteve baseado exclusivamente na forma promastigota, pouco se sabe sobre a diversidade genética e as relações entre as espécies classificadas neste gênero. Os estudos filogenéticos confirmam que as espécies do gênero *Leptomonas*, assim como, as espécies do gênero *Crithidia* se posicionam em clados polifiléticos que contêm espécies de ambos os gêneros ou linhagens individuais. Um exemplo disso é a espécie *Leptomonas moramango* que não agrupa com nenhuma outra do gênero *Leptomonas* (Yurchenko *et al.*, 2006, 2008., Maslov *et al.*, 2010; Kostygov *et al.* 2014). Algumas espécies de *Leptomonas* foram reclassificadas em *Herpetomonas* (*L. samueli*, *L. lactosovorans*, *L. wallacei* e *L. costoris*) (Borghesan *et al.*, 2013; Martins, 2016). No entanto, outras espécies formam grupos dentro da subfamília Leishmaniinae, mas se mostram mais relacionadas com *Crithidia* (Yurchenko *et al.*, 2008; Jirku *et al.*, 2012).

Já a classificação de *Leishmania* foi inicialmente baseada em critérios clínicos, biológicos, geográficos e epidemiológicos. No entanto, a relação parasito-hospedeiro foi um dos principais critérios para a classificação (Bray 1974; Lumsden 1974; Pratt and David 1981; Shaw *et al.*, 1997). Um conceito ainda bastante utilizado e que por isso merece destaque é o de classificação das espécies de *Leishmania* em complexos. Com base em critérios extrínsecos, tais como comportamento do parasito em cultura e em experimentos *in vivo*. Por exemplo, Shaw e Lainson (1972) reuniram as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo em três complexos: complexo *Leishmania braziliensis*, complexo *Leishmania mexicana* e complexo *Leishmania donovani*.

Mais tarde, três seções de *Leishmania* foram descritas de acordo com a variação no local de colonização, ou seja, no interior do tubo digestivo do inseto vetor: hipopilária (parasitos encontrados apenas em lagartos do Velho Mundo e desenvolvimento do parasito

restrito ao intestino posterior do vetor), peripilária (parte do desenvolvimento dos parasitos no intestino posterior, no intestino médio e intestino anterior) e suprapilária (os parasitos ficam restritos ao intestino médio e intestino anterior) (Lainson *et al.*, 1979). Esse comportamento no inseto vetor foi a base para classificação de *Leishmania* em três subgêneros *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Sauroleishmania)* (Lainson *et al.*, 1987).

O subgênero *Viannia* é restrito ao Neotropico. Este grupo inclui apenas espécies que são encontradas nas Américas e por isso correspondem às espécies do Novo Mundo. De maneira geral, as espécies classificadas no subgênero *Viannia* apresentam taxa de proliferação baixa em meio de cultura e lento em hamsters experimentalmente infectados. Além disso, as espécies desse subgênero desenvolvem-se no intestino posterior do flebotomíneo. Já as espécies do subgênero *Leishmania*, que inclui espécies que circulam nos diferentes continentes, geralmente crescem facilmente em cultura e provocam grandes lesões nodulares em hamsters, com metástase para as extremidades. Estas espécies se desenvolvem no intestino médio e anterior de flebotomíneos. Estes dois subgêneros albergam as espécies de *Leishmania* isoladas de mamíferos e o subgênero *L. (Sauroleishmania)* inclui apenas espécies parasitas de répteis sendo considerado por alguns autores como outro gênero (Lainson *et al.*, 1987) mas estudos bioquímicos e moleculares corroboram sua classificação como originalmente proposto (Saf'janova, 1982).

Posteriormente, estas classificações se basearam nas análises de isoenzimas propostas por Moreno *et al.* (1986), Thomas-Soccol *et al.* (1993) e Cupolillo *et al.* (1994) para o Novo Mundo e por Lanotte *et al.* (1981) e Le Blanq *et al.* (1986) para o Velho Mundo. Com o avanço destes estudos, as espécies de *Leishmania* foram organizadas em seções: *Euleishmania* e *Paraleishmania*. A seção *Euleishmania* compreendeu 3 subgêneros: *Leishmania* (espécie tipo: *L. donovani*), *Viannia* (espécie tipo: *L. braziliensis*), *Sauroleishmania* (espécie tipo: *L. tarentolae*) (Cupolillo *et al.*, 2000). A seção *Paraleishmania* passou a englobar as espécies que não eram classificadas em nenhum dos complexos: *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis* (revisado por Akhoundi *et al.*, 2016) e os alvos moleculares da proteína de choque térmico 70 (HSP 70) e o citocromo b (CYT b) passaram a corroborar os resultados das isoenzimas.

A espécie *L. enriettii* não foi classificada em nenhum subgênero de *Leishmania* e foi denominada de enigmática (Lainson, 1997; Muniz & Medina, 1948); mais recentemente duas outras espécies (*L. martiniquensis* e *L. siamensis*) foram relacionadas a *L. enriettii*, formando um novo complexo (Paranaíba *et al.*, 2017). Posteriormente, as análises filogenéticas baseadas em sequências dos genes gGAPDH e HSP70 reposicionaram as espécies *L. martiniquensis* e

L. enriettii em um novo subgênero denominado *L. (Mundinia)* (Espinosa *et al.*, 2016) juntamente com um outro tripanossomatídeo isolado de um canguru (*Osphranter rufus*) nos trópicos da Austrália identificado como *Leishmania macropodum* (Barrat *et al.*, 2017).

Os isolados pertencentes à seção *Paraleishmania* foram considerados “*Leishmania-like*” pelas análises obtidas do gene SSUrRNA. Estes organismos demonstraram uma proximidade com as espécies classificadas como gênero *Endotrypanum (nomen dubium)* (em média 98.7%) e foram então reposicionadas neste gênero. Os autores ainda descrevem o novo gênero *Porcisia* para acomodar os isolados de porco-espinho descritos originalmente como *L. deanei* e *L. hertigi* (Espinosa *et al.*, 2016). Mais tarde, Kostygov & Yurchenko (2017) demonstraram que o gênero *Porcisia* deveria ser denominado de *Paraleishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000) e aceitaram a nova classificação de *L. equatorensis*, *L. colombiensis*, *L. herreri* como *E. equatorensis*, *E. colombiensis* e *E. herreri*, respectivamente, embora considerem frágeis as evidências para esta re-classificação (Kostygov & Yurchenko, 2017).

Mas não só a filogenia do gênero *Leishmania* tem sido constantemente discutida. O status taxonômico das espécies do gênero também levantam muita discussão. Algumas espécies de *Leishmania* foram sinonimizadas ao longo do tempo como *L. siamensis* e *L. martiniquensis* (Pothirat *et al.*, 2014), *L. infantum* e *L. chagasi* (Lukes *et al.*, 2007) *L. pifanoi* e *L. mexicana* e *L. garnhami* e *L. amazonensis* (Monen e Grimaldi *et al.*, 1984). Além disso, se discute a validade das espécies *L. archibaldi* (Lukes *et al.*, 2007) e *L. peruviana* (Bañuls *et al.*, 2000).

A classificação do gênero *Endotrypanum (nomen dubium)* também vem sendo questionada em diversos estudos que demonstram a proximidade filogenética de *Endotrypanum* com *Leishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000; Maslov *et al.*, 2010). O gênero compreende os isolados de hospedeiros pertencentes a ordem Pilosa (bicho-preguiça). Os mesmos são transmitidos por flebotomínios e se mostra restrito a América Central e América do Sul (Noyes *et al.*, 1997). Os critérios adotados para classificação do gênero foram baseados no seu hospedeiro de origem e na sua morfologia (Shaw, 1964). O gênero foi caracterizado pela presença de epimastigostas no sangue de preguiças naturalmente infectadas, além de relatos de tripomastigotas no interior de eritrócitos. No entanto, epimastigotas e tripomastigotas são formas raras observadas no sangue de preguiça e as formas promastigotas observadas em cultura e nos insetos vetores (flebotomínios) são indistinguíveis de *Leishmania*. O hospedeiro de origem também não garante a classificação de *Endotrypanum*, pois mamíferos do gênero *Choloepus* também são reservatórios de *Leishmania* (Shaw 1964, Franco & Grimaldi, 1999) e de *Trypanosoma* (Miles *et al.*, 1983). A validade do gênero

continua em discussão e por isso foi recentemente referido como um *nomen dubium*, até que seu status taxonômico seja esclarecido (Kostygov & Yurchenko, 2017).

Apesar de muitas modificações nos status taxonômicos e na filogenia dos gêneros da subfamília Leishmaniinae, a original definição da subfamília foi mantida pois o clado apresenta alto suporte estatístico nas árvores filogenéticas (Maslov *et al.* 2010, Jirků *et al.* 2012, Kostygov *et al.* 2014, Schwarz *et al.* 2015). Posteriormente, Kostygov & Yurchenko (2017) criaram dois táxons subordinados a infrafamília. A infrafamília Leishmaniatae que une os gêneros *Leishmania*, *Paraleishmania*, *Endotrypanum* (*nomen dubium*), *Novymonas*, *Zelonia* e *Borovskya* e outra infrafamília denominada de Crithidiatae que abrange os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas* e *Lotmaria*.

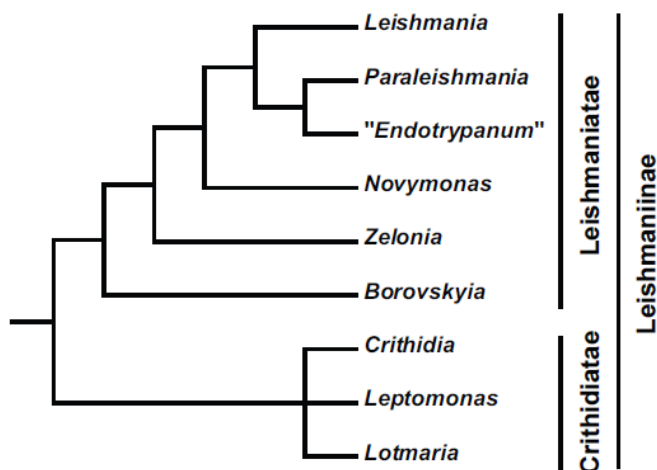


Figura 2. Árvore filogenética da última classificação revisada da Subfamília Leishmaniinae. O status taxonômico incerto do gênero *Endotrypanum* é simbolizado pelas aspas (Kostygov & Yurchenko, 2017).

As análises filogenéticas demonstram que *Novymonas* e *Zelonia* são os tripanossomatídeos basais a todos os outros gêneros pertencentes à subfamília Leishmaniinae e provavelmente os ancestrais mais próximos de um parasito que passou de um ciclo de vida monoxênico para um ciclo de vida heteroxênico (Barrat *et al.*, 2017; Kaufer *et al.*, 2019). O trabalho de Kaufer *et al.*, (2019) demonstra o crescimento celular de *Z. australiensis* em altas concentrações de hemoglobina e em ágar chocolate (meio de cultura variante ao ágar sangue. Nesse meio as hemácias são lisadas e liberam componentes que deixam a coloração marrom). O que é compatível com um desenvolvimento e/ou adaptação de um hemoprotozoário e sugere que o protozoário tenha dado o primeiro passo na transição a um ciclo de vida heteroxênico.

Dentre os táxons que compreendem a subfamília Leishmaniinae, apenas as espécies que formam o gênero *Leishmania* foram consideradas táxons naturais (Jirků *et al.*, 2012). O motivo desta afirmação se justifica pelo fato de que os gêneros *Crithidia* e *Leptomonas* se posicionam em clados polifiléticos, e a classificação do gênero *Endotrypanum* (*nomen dubium*) tem sido questionada em diversos trabalhos que demonstram a proximidade filogenética do gênero com espécies de *Leishmania* (Cupolillo *et al.*, 2000; Maslov *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2015). Os outros gêneros da subfamília como *Zelonia*, *Novymonas*, *Lotmaria*, *Borovskya* e *Paraleishmania* foram descritos recentemente e o status evolutivo e filogenético destes gêneros também se encontra em discussão dentro da subfamília (Schwarz *et al.*, 2015; Espinosa *et al.*, 2016; Kostygov *et al.*, 2016; Barrat *et al.*, 2017; Kostygov & Yurchenko, 2017). Até o momento, não foram encontrados traços unificadores de morfologia ou ecologia entre os membros deste grupo. Sendo assim, as substituições de nucleotídeos filogeneticamente relevantes são as únicas apomorfias conhecidas.

7. *Leishmania* e leishmaniose:

O gênero *Leishmania* é notável por causar a Leishmaniose, um grave problema de saúde pública principalmente nos países tropicais onde é também considerada uma zoonose. As leishmanioses se apresentam com manifestações clínicas diversas e são causadas por aproximadamente 20 espécies de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. O protozoário é transmitido por hospedeiros invertebrados pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Young & Duncan, 1994). As formas evolutivas são promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e amastigota, observada nos hospedeiros vertebrados. Apenas as espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* vêm sendo relatadas como patogênicas ao homem, causando as leishmanioses. Durante o complexo ciclo de vida das espécies de *Leishmania*, a forma promastigota se adapta no espaço extracelular da cavidade intestinal do inseto. A forma promastigota procíclica está localizada no intestino do hospedeiro invertebrado e a forma promastigota metacíclica é a forma infectiva para os hospedeiros vertebrados. Já as formas amastigotas se adaptam em um habitat intracelular em células fagocíticas mononucleares. Esses protozoários podem ser transmitidos aos vertebrados silvestres, domésticos (zoonose) e ao ser humano (Ashford, 2000).

Os promastigotas metacíclicos (infectante para os mamíferos) são móveis e bastante ativos com morfologia longa, delgada e flagelo longo. Eles migram pelo tecido subcutâneo e

infectam células do sistema fagocítico, principalmente macrófagos e neutrófilos. Na célula hospedeira forma-se, então, o vacúolo parasitóforo onde as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam intensamente até romper a membrana da célula hospedeira e infectar outra célula ou ficar livre na corrente sanguínea podendo ser ingeridas pelos insetos hematófagos (Stuart *et al.*, 2008). O inseto pica os hospedeiros vertebrados e ingerem os macrófagos contendo as formas amastigotas intracelulares. No trato digestório do inseto vetor, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas, que devido a importantes diferenças ambientais, como temperatura e pH, se diferenciam no intestino médio do flebotomíneo em promastigotas procíclicas (Pimenta *et al.*, 1997, Sacks, 2001). Os promastigotas procíclicos se multiplicam intensamente e dentro de 4-5 dias após a infecção, ocorre a metaciclogênese (Sacks, 1989; Saraiva *et al.*, 2005). Posteriormente, se diferenciam em promastigotas metacíclicas que migram para o esôfago e faringe se alojando na probóscide do vetor. Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita o sangue recém-ingrido, liberando promastigotas metacíclicas (Kamhawi, 2006).

Estes protozoários estão distribuídos de forma ampla nas regiões tropicais e subtropicais do globo. As leishmanioses são endêmicas em 98 países com uma estimativa de 350 milhões de pessoas em risco e 1,7 milhões de pessoas infectadas todos os anos, mas apenas uma pequena fração desenvolve a doença. O aumento do número de casos de leishmaniose observados nos últimos 25 anos em todo o mundo é devido a vários fatores. A globalização e mudança climática são dois fatores que contribuem bastante para a disseminação da leishmaniose em áreas não endêmicas (Steverding, 2017).

A forma mais grave da doença é a leishmaniose visceral que pode levar a óbito quando não tratada. A infecção é causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, e acomete preferencialmente baço, fígado, medula óssea e linfonodos. A leishmaniose cutânea é caracterizada por ulcerações na pele que podem evoluir para necrose e são causadas por espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*. As lesões se originam no local da picada e podem se espalhar pelo corpo após semanas, meses ou anos depois da inoculação (Marzochi, 1992; Berman, 1996; Gontijo & De Carvalho, 2003; Who, 2010; Reveiz *et al.*, 2013). Nas Américas, essa forma da doença pode ser causada principalmente por *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) peruviana* (Convit & Kerdel-Vegas, 1965; Costa *et al.*, 1992; Who, 2010; de Saldanha *et al.*, 2012). O tratamento das leishmanioses apresenta sérios efeitos colaterais e algumas drogas são de administração por via parenteral e o tratamento em alguns casos é ineficaz em virtude do surgimento de cepas resistentes (Machado-Silva *et al.*, 2015).

8. Coleções biológicas

As coleções biológicas abrigam conjuntos de organismos (atuais, fósseis ou parte deles) ou material genético com o objetivo de preservar, armazenar e fornecer informações a respeito de cada isolado depositado. Atualmente, as coleções biológicas são uma das principais formas de inventariar e manter a biodiversidade sendo uma importante ferramenta para a obtenção de informações e distribuição de conteúdo principalmente para fins da pesquisa científica. Portanto, uma coleção biológica deve promover um fácil acesso aos dados, ter uma infraestrutura adequada, garantir a preservação além de solucionar problemas e promover a qualidade da identificação do acervo (d'Avila-Levy *et al.* 2016; Pereira, 2019; <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=colecões>).

A Coleção de Protozoários da Fiocruz (Fiocruz-COLPROT) foi iniciada em 1991 com a preservação de membros da família Trypanosomatidae e recebia o nome de Coleção de Tripanossomatídeos (CT-IOC). Em 2009, a coleção sofreu uma reestruturação institucional do acervo, passando a preservar protozoários de outras famílias, como por exemplo, Trichomonadidae, Euglenaceae, Blastocystidae. Apenas em 2010, foi reconhecida institucionalmente sob o nome de Coleção de Protozoários da Fiocruz (www.colprot.fiocruz.br). Atualmente, seu acervo conta com mais de 500 isolados de protozoários sendo a maioria representante da classe Kinetoplastea e família Trypanosomatidae. A coleção é dividida em 20 gêneros e 87 espécies das diversas famílias. Já a Coleção de *Leishmania* (CLIOC) foi criada em 1980 com apoio do Instituto Oswaldo Cruz e Organização Mundial da Saúde. A coleção já recebeu mais de 3000 amostras para depósito e/ou caracterização. Hoje possui um acervo com um pouco mais de 1.000 cepas curadas e disponíveis para a comunidade científica, representando 30 espécies, classificadas nos diferentes subgêneros e correspondendo aos principais grupos taxonômicos de *Leishmania* do Mundo. Estas cepas são provenientes de diversas localidades e diferentes hospedeiros, sendo a maior parte da América do Sul. A coleção é membro associado do *World Federation for Culture Collections* (WFCC). A CLIOC ainda atua como "Centro de Recursos Biológicos" (definido pela *Organization for Economic Cooperation and Development*, OECD) e também se dedica à preservação, armazenamento, distribuição, caracterização taxonômica, identificação de *Leishmania* e informação associada. Além de desenvolver projetos de pesquisa específicos, a CLIOC atende a demanda de instituições públicas de pesquisa e ensino ou setores da indústria (www.clioc.fiocruz.br).

II. Objetivos

1) Objetivo Geral

Analisar a filogenia da subfamília Leishmaniinae e realizar a identificação taxonômica de tripanossomatídeos isolados de Lepidoptera utilizando as sequências parciais do gene glicossomal gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) e da região V7/V8 da subunidade menor do RNA ribossomal (V7/V8 SSUrRNA)

2) Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a filogenia da subfamília Leishmaniinae com base nas sequências geradas para os gêneros *Leishmania*, *Paraleishmania* e *Endotrypanum* em conjunto com as sequências depositadas em banco de dados público;
- ✓ Ampliar o painel de sequências disponíveis para espécies de *Leishmania* no gene gGAPDH e na região V7/V8 SSUrRNA depositadas em banco de dados público;
- ✓ Realizar a identificação taxonômica dos novos isolados oriundos do Bioma Amazônia através das sequências geradas e de sequências disponíveis em banco de dados público;

III. Metodologia

1) Amostragem: Tripanossomatídeos estudados

Ao todo, foram utilizados 51 representantes da família Trypanosomatidae. Os 33 isolados de Lepidoptera apresentados neste estudo podem aparecer com o código e numeração de coleta (LEIP) e outros com o código e numeração de depósito da Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT). Os insetos da ordem Lepidoptera foram coletados em duas expedições (2016 e 2017) para Amazônia (Parque Nacional do Jaú - Amazonas). Os outros 18 representantes dos gêneros *Leishmania*, *Endotrypanum* (*nomen dubium*) e *Paraleishmania* se encontram depositados na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC).

O parque Nacional do Jaú está localizado na Floresta Amazônica, no estado do Amazonas entre os municípios de Novo Airão e Barcelos. O Parque é uma das principais reservas naturais do Brasil e o segundo maior parque do mundo em floresta tropical úmida contínua e intacta. Destaca-se por ser o único parque do Brasil que protege praticamente a totalidade da bacia hidrográfica de um rio de águas pretas, o rio Jaú. Os seus limites são demarcados pela bacia hidrográfica do rio Jaú e estendem-se até as águas do rio Carabinani, ao sul, e as dos rios Unini e Paunini, ao norte. O rio Negro forma o limite leste do parque (www.icmbio.gov.br).

2) Preparo das amostras e visualização em microscopia óptica

O material intestinal foi homogeneizado e diluído em tampão fosfato-salino (PBS; NaCl 137 mM, fosfato dissódico 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7.4). O material foi acondicionado em tubos plásticos e uma alíquota deste sedimento foi colocada entre lâmina e lamínula para a observação em microscópio óptico com aumento de 400X. Para a confirmação da positividade, todas as amostras foram inoculadas para cultivo *in vitro*. As amostras foram inoculadas em diferentes meios. Dentre eles, o meio bifásico NNN/LIT (Nicolle-Novy-Neal / *Liver Infusion Tryptose* com 3,0 g de Agar -BactoAgar e 1,5 g de NaCl e pH 7,2; Nicolle, 1908), meio ágar-BHI-sangue (*Brain Heart Infusion* suplementado com 3,6 g de ágar e 200ml de H₂O destilada; Wallace & Dyer, 1960) e meio Schneider (SIGMA, suplementado com 0,6 g de CaCl₂, pH 7,2; Hendricks *et al.*, 1978) todos suplementados com 10% de soro bovino inativado, 0,2 ml de penicilina-estreptomicina (500 µg/mL) e incubadas a 27 °C. A positividade das amostras de cultura dos protozoários foi verificada através da microscopia de

luz padrão nos primeiros 15 dias de incubação em intervalos de 2 a 3 dias. Quando observadas as formas evolutivas do parasito, alíquotas da cultura destes protozoários foram congeladas a -20 °C para a caracterização molecular. Algumas amostras positivas foram criopreservadas para serem depositadas na Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT, www.colprot.fiocruz.br) para realização de estudos futuros.

3) Extração e quantificação de DNA

No meio da fase log de cultivo, 1×10^7 células foram coletadas por centrifugação (1500 g, 15 min, 4 °C) e lavadas duas vezes em tampão fosfato-salino (PBS; NaCl 137 mM, fosfato dissódico 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7.4). A extração do DNA foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega, Wisconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

4) Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

As reações em cadeia polimerase foram realizadas e submetidas a testes e ajustes quanto à temperatura, concentração de cloreto de magnésio e condições de ciclagem para possibilitar a amplificação dos dois marcadores moleculares. As condições iniciais testadas para os dois genes com volume final de 25 µL foram 15 ng de DNA molde, 10 mM de Tris HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1,5 U/µL de TaqDNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen, Promega ou Finnzymes), 200 µM de cada dinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador. Os ciclos de amplificação para cada iniciador estão descritos no quadro abaixo (**Quadro 1**):

Genes	Condições de amplificação
<p>V7/V8 SSUrRNA 750 a 800 pb (Texeira <i>et al</i>, 2011) Reverse (5' CTGAGACTGTAAACCTCAA 3') Forward (5' CACCCGCGTAATTCCAGC 3')</p>	<p>Desnaturação: 94 °C por 5' Desnaturação, anelamento e extensão: 94 °C por 30''; 52 a 55 °C por 2'; 72 °C por 2' (35 ciclos) Extensão final: 72 °C por 10' (1 ciclo)</p>

<p>gGAPDH: 750 a 800pb (Teixeira <i>et al</i>, 2011) Reverse (5'CCCACTCGTTRTCRTACC 3') Forward (5'GGBCGCATGGTSTTCCAG 3')</p>	<p>Desnaturação: 94 °C por 3' Desnaturação, anelamento e extensão: 94 °C por 1', 52 a 55 °C por 2' e 72 °C por 2' (30 ciclos) Extensão final: 72 °C por 10' (1 ciclo)</p>
---	--

Quadro 1: Condições de amplificação dos alvos

5) Visualização e Purificação do produto de PCR

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados por coloração com Gel Red (Biotium) e separação eletroforética em géis de agarose 1,5% colocados em cuba horizontal imersa em TBE (1M Tris-borato, 0,01 M EDTA, pH 8,4) a 1X por 50 min em uma voltagem de 80 V. Os géis foram analisados e as imagens registradas por um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP Bioimaging Systems. A purificação dos produtos da reação de PCR foi realizada através de kit de purificação Illustra™ GFX (Ge Healthcare), utilizando o protocolo do fabricante.

6) Sequenciamento do DNA amplificado

Os produtos foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit de extração BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). A reação que foi utilizada consiste em: 5 a 20 ng de DNA molde (a nossa placa foi preparada com 2,0 µL de DNA purificado que equivale a 8 ng de DNA), volume de 2,0 µL de Tampão Applied Biosystems, volume de 1,0 µL de BigDye (Applied Biosystems), volume de 1,5 µL de cada iniciador e água Milli-Q 3,5 µL q.s.p. A ciclagem da reação se baseia em 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. Após a ciclagem, as amostras foram entregues à Plataforma de Sequenciamento de DNA do IOC onde é realizada a precipitação e a etapa do sequenciamento de DNA em um equipamento ABI 3730.

7) Análise das sequências

A filogenia da subfamília Leishmaniinae e a identificação dos isolados oriundos do Bioma Amazônia foram realizadas através da análise das sequências geradas neste trabalho que são provenientes de espécimes depositados em Coleções Biológicas e sequências disponíveis

publicamente (depositadas no *Genbank*). As sequências dos bancos de dados públicos foram selecionadas através da análise da publicação associada e da rastreabilidade do isolado utilizado. As sequências de bases nucleotídicas foram editadas no programa DNASTar (SeqMan) (DNASTAR Inc., Madison, Wis WI) e a qualidade de cada cromatograma foi avaliada. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados *Genbank* utilizando a ferramenta BLASTN do servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Em seguida, as sequências foram alinhadas na versão online do programa MAFFT (Katoh *et al.* 2017). A árvore filogenética foi construída a partir do resultado dos alinhamentos baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) utilizando o programa PHYML (Guindon & Gascuel, 2003). A consistência da topologia da árvore foi testada através de 1000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) assumindo valores a partir de 70% como confiável. A escolha do modelo evolutivo de substituição nucleotídica foi feita utilizando o programa *jModelTest* versão 2.1 (Darriba *et al.*, 2012). O modelo mais adequado para as sequências dos dois marcadores utilizados de acordo com o critério de informação Akaike (AIC) foi GTR+I+G (sítios invariáveis (I) + 4 parâmetros de distribuição gamma (G) (Posada *et al.*, 2008).

IV. Resultados

1. Filogenia da Subfamília Leishmaniinae

A subunidade menor do RNA ribossomal já foi empregada não só em estudos de identificação assim como na análise filogenética do gênero *Leishmania* (Espinosa *et al.*, 2016; Kostygov & Yurchenko, 2017), mas os estudos relatam que esta região só permite a identificação ao nível de gênero. Entretanto, pode ser bastante útil para estudar as relações filogenéticas entre táxons de outras subfamílias (Van Eys *et al.*, 1992; Lachaud *et al.*, 2002; Schönian *et al.*, 2003; Disch *et al.*, 2005; Bensoussan *et al.*, 2006). Já o gene gGAPDH é pouco empregado na identificação taxonômica e nas relações filogenéticas de *Leishmania* mas apresenta uma boa resolução filogenética entre os demais táxons da família Trypanosomatidae (Hamilton *et al.*, 2004, 2007; Stevens *et al.*, 2008).

Por este motivo, nesse estudo geramos sequências das espécies dos gêneros *Leishmania*, *Paraleishmania* e *Endotrypanum* (*nomen dubium*) para a região V7/V8 SSUrRNA e para o gene gGAPDH (**Quadro 2**).

As sequências de gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA foram geradas para 18 espécies dos gêneros *Leishmania*, *Paraleishmania* e *Endotrypanum* (*nomen dubium*), o que nos permitiu uma análise conjunta com as espécies monoxênicas. É importante ressaltar que as espécies *Paraleishmania deanei* (IOCL 1530), *Paraleishmania hertigi* (IOCL 2277), *Endotrypanum colombiensis* (IOCL 1245) e *Endotrypanum equatorensis* (IOCL 889) ainda não passaram por revisão taxonômica e continuam depositadas na Coleção de *Leishmania* do IOC como *Leishmania deanei*, *Leishmania hertigi*, *Leishmania colombiensis* e *Leishmania equatorensis*. Neste estudo, utilizamos a nova classificação para facilitar o entendimento e as análises.

Identificador	Espécie	Local de isolamento	Gene
IOCL 240	<i>Leishmania panamensis</i>	Honduras El Paraíso	gGAPDH
IOCL 563	<i>Leishmania donovani</i>	Etiópia	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 568	<i>Leishmania venezuelensis</i>	Venezuela	gGAPDH

IOCL 571	<i>Leishmania tropica</i>	URSS	V7V8 SSU rRNA
IOCL 583	<i>Leishmania pifanoi</i>	Venezuela	V7V8 SSU rRNA
IOCL 729	<i>Leishmania amazonensis</i>	Brasil	V7V8 SSU rRNA
IOCL 889	<i>Endotrypanum equatorensis</i>	Equador	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 1245	<i>Endotrypanum colombiensis</i>	Panamá	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 1266	<i>Leishmania lainsoni</i>	Brasil	V7V8 SSU rRNA
IOCL 1530	<i>Paraleishmania deanei</i>	Brasil Pará	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 2274	<i>Leishmania hoogsrali</i>	Sudão	V7V8 SSU rRNA
IOCL 2277	<i>Paraleishmania hertigi</i>	Panamá	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 2279	<i>Leishmania tarentolae</i>	Argélia	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 2334	<i>Leishmania guyanensis</i>	Brasil	gGAPDH
IOCL 3034	<i>Leishmania infantum</i>	Paraguai	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
IOCL 3310	<i>Leishmania naiffi</i>	Brasil	V7V8 SSU rRNA
IOCL 3451	<i>Leishmania braziliensis</i>	Brasil	V7V8 SSU rRNA e gGAPDH
COLPROT 151	<i>Endotrypanum monterogeii</i>	Costa Rica	V7V8 SSU rRNA

Quadro 2. Lista das espécies de *Leishmania*, *Paraleishmania* e *Endotrypanum* amplificadas e sequenciadas neste estudo.

Com base nos critérios que vêm sendo utilizados na literatura e nos estudos filogenéticos, as nossas análises foram realizadas por uma clusterização hierárquica. Avaliamos a estrutura produzida a partir do método de máxima verossimilhança (ML) e com matriz de distância Kimura-2-parâmetros utilizando 1000 réplicas de *bootstrap* assumindo valores a partir de 70% como confiáveis (**Figuras 3, 4 e 5**). Para uma melhor compreensão, os resultados foram discutidos por gêneros.

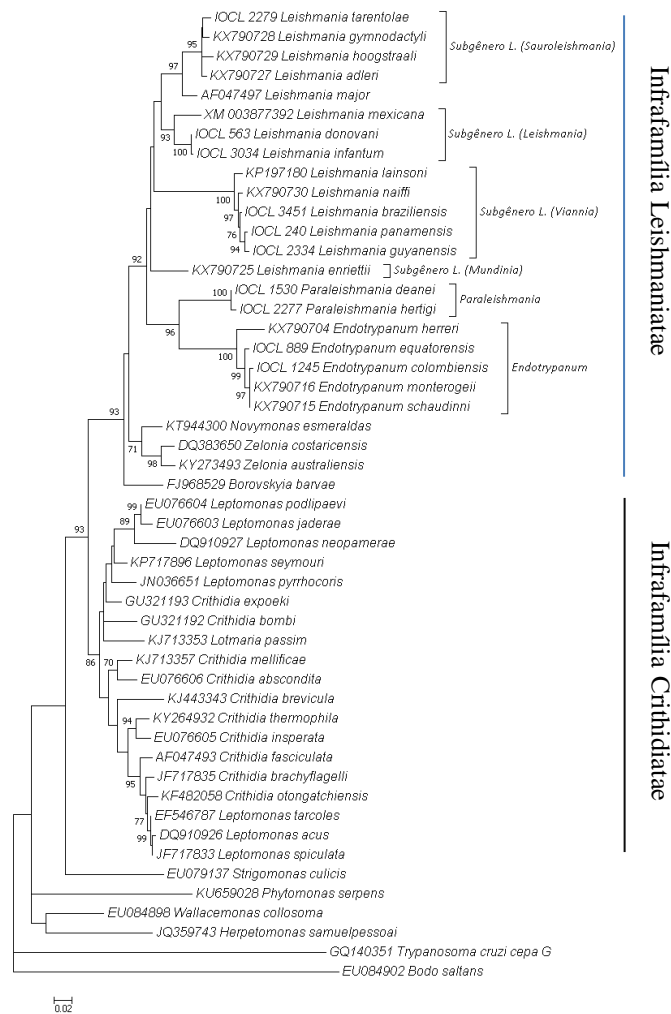


Figura 3. Análise de Máxima Verossimilhança para o gene gGAPDH. Àrvore filogenética baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) para o gene gGAPDH utilizando o programa PHYML. O modelo utilizado nesta análise foi GTR+I+G de acordo com o critério de informação Akaike (AIC). Os losângulos indicam as sequências geradas neste trabalho.

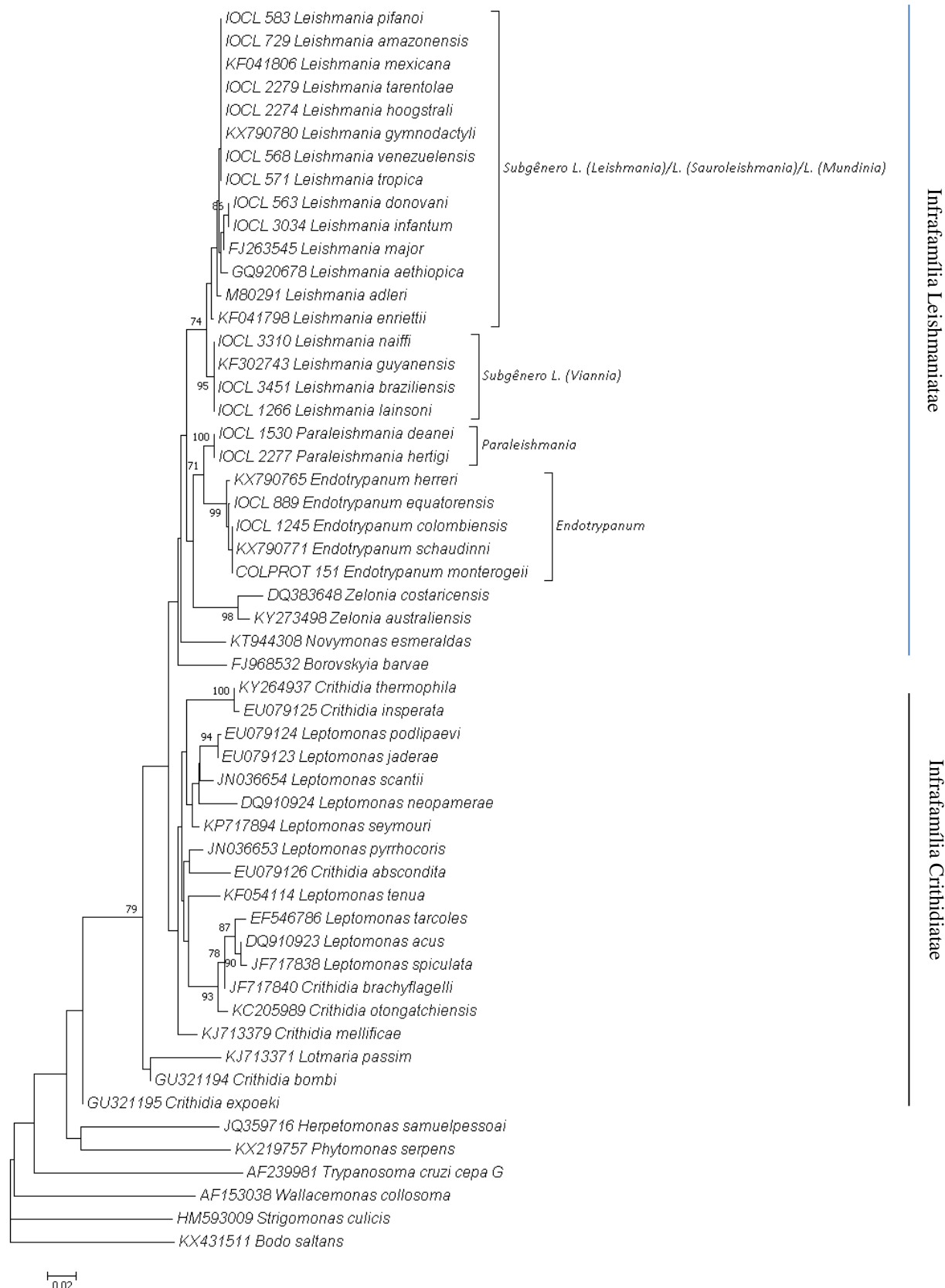


Figura 4. Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para a região V7/V8 SSUrRNA. Árvore filogenética baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) para a região V7/V8 SSUrRNA utilizando o programa PHYML. O modelo utilizado nesta análise foi GTR+I+G de acordo com o critério de informação Akaike (AIC). Os losângulos indicam as sequências geradas neste trabalho.

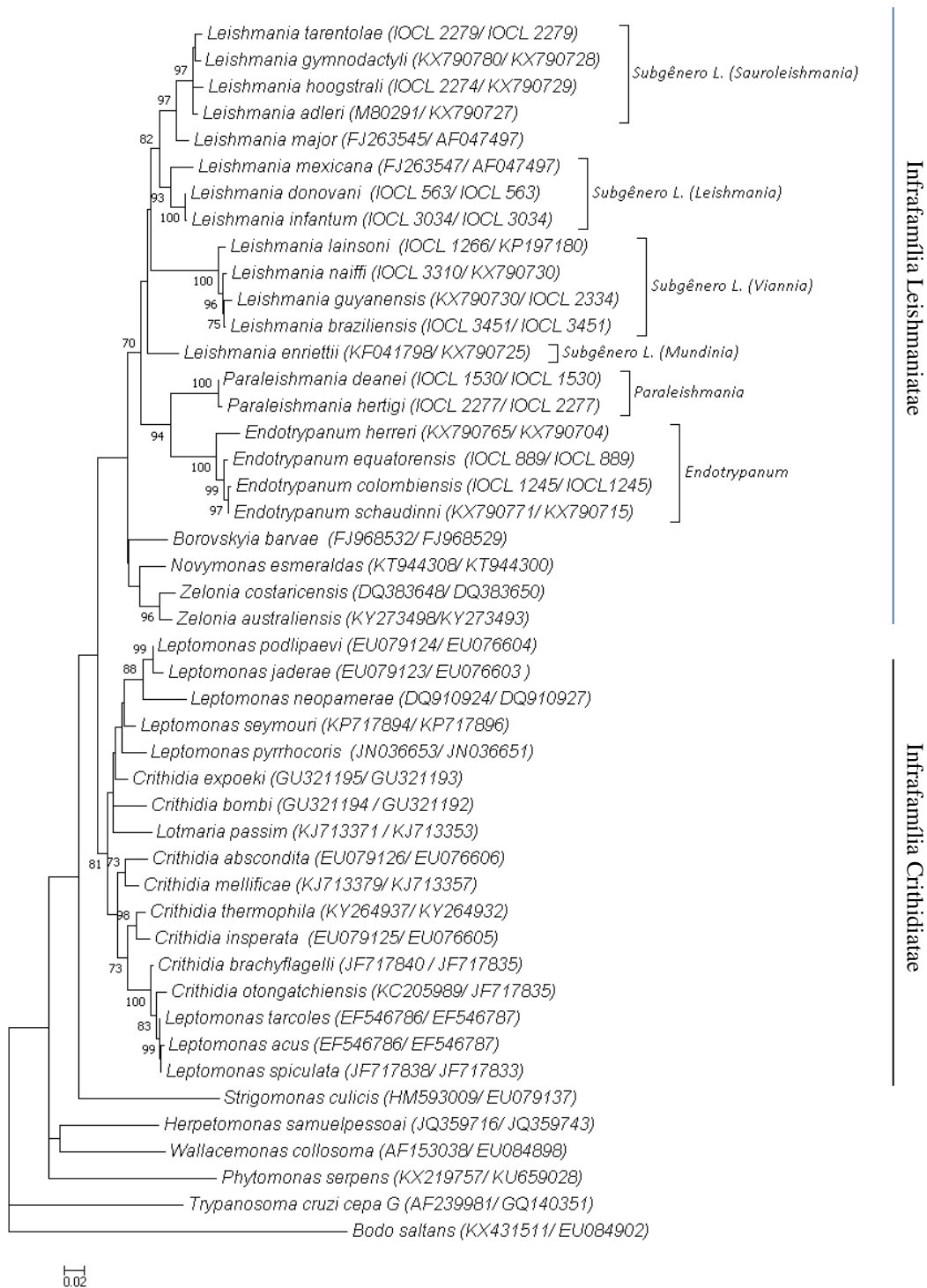


Figura 5. Análise de Máxima Verossimilhança (ML) das seqüências concatenadas de gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA. Árvore filogenética baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) para as seqüências concatenadas dos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA utilizando o programa PHYML. O modelo utilizado nesta análise foi GTR+I+G de acordo com o critério de informação Akaike (AIC).

1.1. Gênero *Leishmania*

Visando analisar a filogenia do gênero *Leishmania* selecionamos um único representante de cada espécie disponível na Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC). Usando sequências parciais dos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA foram analisadas espécies dos 4 subgêneros de *Leishmania*: *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)*, *L. (Sauroleishmania)* e *L. (Mundinia)*, o mais novo subgênero descrito e que alberga a espécie *L. enriettii*. As sequências das espécies que por alguma razão metodológica (dificuldade de amplificação do marcador ou dificuldade em gerar sequências passíveis de serem alinhadas) não foram possíveis sequenciar foram retiradas do banco de dados *Genbank* quando disponíveis. Para o gene gGAPDH foram analisados os representantes dos complexos *L. mexicana*, *L. major* e *L. donovani* pertencentes ao subgênero *Leishmania*. Para a região V7/V8 SSUrRNA, foi possível analisar todos os complexos do subgênero (**Quadro 3**).

Subgênero <i>Leishmania</i>	
gGAPDH	V7/V8 SSUrRNA
Complexo <i>L. mexicana</i> : <i>L. mexicana</i> (XM003877392)	Complexo <i>L. mexicana</i> (0,0%): <i>L. mexicana</i> (KF302741) <i>L. amazonensis</i> (IOCL 729) <i>L. pifanoi</i> (IOCL 583) <i>L. venezuelensis</i> (IOCL 568)
Complexo <i>L. major</i> : <i>L. major</i> (AF047497)	Complexo <i>L. major</i> : <i>L. major</i> (FJ263545)
Complexo <i>L. donovani</i> (0,2%): <i>L. donovani</i> (IOCL 563) <i>L. infantum</i> (IOCL 3034)	Complexo <i>L. donovani</i> (0,0%): <i>L. donovani</i> (IOCL 563) <i>L. infantum</i> (IOCL 3034)
—	Complexo <i>L. tropica</i> (0,7%): <i>L. tropica</i> (IOCL 571) <i>L. aethiopica</i> (GQ920678)

Quadro 3. Espécies do subgênero *Leishmania* analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA. O número entre parêntesis indica a divergência genética entre as espécies dos complexos.

Foi possível observar que o gene gGAPDH analisado isoladamente e de forma concatenada resultou em uma boa separação dos subgêneros e dos complexos de espécies, mas uma incongruência foi observada com relação a espécie *L. major*. A espécie mostra uma proximidade filogenética entre as espécies do subgênero *Sauroleishmania*. Além disso, a região V7/V8 SSU rRNA apresentou baixos valores de divergências genéticas entre as espécies do subgênero *Leishmania* (variando de 0,0-1,4%).

O gene gGAPDH resultou em uma divergência genética de 0,2% entre a espécie *L. infantum* e *L. donovani* e em uma divergência de 4,5% entre *L. donovani* e *L. mexicana*. As maiores divergências genéticas observadas estão entre as espécies *L. donovani* e *L. major* (5,9%), *L. infantum* e *L. major* (6,1%) e entre *L. mexicana* e *L. major* (6,3%). Também foi possível analisar as maiores e menores divergências entre o subgênero *Leishmania* e os outros subgêneros neste gene. As espécies *L. hoogstrali* e *L. mexicana* resultaram na maior divergência genética (9,0%) e *L. hoogstrali* e *L. major* nas menores (3,8%) entre os subgêneros *Leishmania* e *Sauroleishmania*. Enquanto *L. guyanensis* e *L. major* apresentaram a maior divergência genética (13,2%) e *L. braziliensis* e *L. mexicana* (10,2%), que foi a menor entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. A espécie *L. enrietti*, pertencente ao subgênero *Mundinia*, apresenta a menor divergência entre a espécie *L. donovani* (7,0%) e a maior (8,3%) entre a espécie *L. major*.

Dentro do subgênero *Leishmania*, a região V7/V8 SSUrRNA não demonstrou divergência genética entre as espécies dos complexos *L. mexicana* e *L. donovani* e resultou em uma divergência de 0,7% entre as espécies do complexo *L. tropica*. As maiores divergências genéticas (1,4%) observadas nesta região estão entre as espécies *L. donovani* e *L. aethiopica* e entre *L. infantum* e *L. aethiopica*. As mesmas divergências foram observadas entre estas espécies. Além disso, não foram observadas divergências genéticas entre a espécie *L. major* e as espécies do complexo *L. mexicana*. A espécie *L. major* resulta em uma divergência de 0,7% entre as espécies *L. donovani* e *L. infantum* e a mesma divergência foi apresentada entre *L. aethiopica* e *L. major*.

Também é importante salientar que procuramos selecionar para este estudo as espécies que já haviam passado por uma curadoria nos trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. No entanto, são raros os estudos de identificação de *Leishmania* baseados nos genes gGAPDH e V7V8. Sendo assim, a cepa representante da espécie *L. forattinii* (IOCL 0067), sequenciada e analisada com base nos dois genes, resultou na menor divergência genética de (17,1%) com

Leishmania infantum no gene gGAPDH e de 15% na região V7/V8 SSUrRNA. Além disso, a sequência obtida foi idêntica a sequência de *Herpetomonas samuelpessoai*, indicando um problema na identificação da cepa IOCL 0067 (Figuras 6, 7 e 8).

Subgênero <i>Sauroleishmania</i>	
gGAPDH	V7/V8 SSUrRNA
<i>L. tarentolae</i> (IOCL 2279)	<i>L. tarentolae</i> (IOCL 2279)
<i>L. hoogstrali</i> (KX790729)	<i>L. hoogstrali</i> (IOCL 2274)
<i>L. adleri</i> (KX790727)	<i>L. adleri</i> (M80291)
<i>L. gymnodactly</i> (KX790728)	<i>L. gymnodactly</i> (KX790780)

Quadro 4. Espécies do subgênero *Sauroleishmania* analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.

As espécies do subgênero *Sauroleishmania* analisadas para o gene gGAPDH resultam em uma divergência genética que vai de 1,4-2,3%. As divergências foram bem menores para a região V7/V8, variando de 0,0-0,3%. O clado que suporta os subgêneros *Leishmania* e *Sauroleishmania* apresenta altos valores estatísticos por *bootstrap* entre eles, embora *L. major* não tenha se posicionado como esperado. A sequência de *L. major* resulta em uma divergência genética que varia de 3,8-4,2% entre as espécies do subgênero *Sauroleishmania* para o gene gGAPDH. Sendo a menor divergência genética apresentada entre as espécies *L. hoogstrali* e *L. major* (3,8%) e a maior entre as espécies *L. tarentolae* e *L. major* (4,2%). As espécies *L. gymnodactly* e *L. adleri* apresentaram a mesma divergência genética (4,0%) com *L. major*. Já a região V7/V8 não apresenta divergências genéticas entre as espécies *L. tarentolae*, *L. hoogstrali*, *L. adleri*, *L. gymnodactly* e *L. major*.

Subgênero <i>Viannia</i>	
gGAPDH	V7/V8 SSUrRNA
Complexo <i>L. braziliensis</i> :	Complexo <i>L. braziliensis</i> :

<i>L. braziliensis</i> (IOCL 3451)	<i>L. braziliensis</i> (IOCL 3451)
Complexo <i>L. guyanensis</i> (0,9%): <i>L. guyanensis</i> (IOCL 2334) <i>L. panamensis</i> (IOCL 240)	Complexo <i>L. guyanensis</i> : <i>L. guyanensis</i> (KF302743)
<i>L. lainsoni</i> (KP197180)	<i>L. lainsoni</i> (IOCL 1266)
<i>L. naiffii</i> (KX90730)	<i>L. naiffii</i> (IOCL 3310)

Quadro 5. Representantes do subgênero *Viannia* analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.

O gene gGAPDH resultou em uma divergência de 0,9-2,5% entre as espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni* e *L. naiffii*). As menores divergências genéticas foram observadas entre as espécies *L. naiffii* e *L. braziliensis* (0,9%) e entre *L. panamensis* e *L. guyanensis* (0,9%) e a maior divergência genética foi observada entre *L. guyanensis* e *L. lainsoni* (2,5%). Já a região V7/V8 não apresentou divergência genética entre as espécies analisadas. Tanto o gene gGAPDH quanto a região V7/V8 mostram um clado bem definido do subgênero *Viannia* com altos valores de suporte por *bootstrap*, mas com divergência intraespecífica baixa ou inexistente, impedindo a identificação ao nível específico, com exceção da espécie *L. lainsoni* no gene gGAPDH. Um clado robusto para o subgênero *Viannia* também foi observado na análise concatenada.

gGAPDH	V7/V8 SSUrRNA
<i>L. enriettii</i> (KX790725)	<i>L. enriettii</i> (KF041798)

Quadro 6. Representante do subgênero *Mundinia* analisados pelos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.

O gene gGAPDH apresenta a menor divergência genética (7,0%) entre *L. enriettii* e *L. infantum* e entre *L. enriettii* e *L. donovani*. Curiosamente a menor divergência apresentada foi a mesma entre estas espécies. A região V7/V8 analisada isoladamente demonstra uma divergência genética de 0,7% entre *L. enrietti* e outras espécies dos subgêneros *Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Viannia*: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. tarentolae*, *L. adleri*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, *L. guyanensis*, *L. naiffii*. A análise concatenada não apresentou

suporte estatístico igual ou maior que 70% no clado que sustenta a espécie *L. enriettii* apesar da espécie estar posicionada de forma basal ao gênero *Leishmania*.

1.2. Gênero *Paraleishmania*

Neste trabalho, foi possível analisar as espécies *Paraleishmania deanei* (IOCL 1530) e *Paraleishmania hertigi* (IOCL 2277). O gene gGAPDH resultou em uma divergência genética de 0,5% entre as espécies e a região V7/V8 não apresentou divergências entre elas. Ainda foi possível observar divergências genéticas que variam de 10,8-12,5% entre o gênero *Paraleishmania* e o gênero *Endotrypanum* no gene gGAPDH e divergências genéticas que variam de 2,5%-2,8% na região V7/V8. Todas as análises resultaram em altos valores de suporte por *bootstrap* para o clado que inclui gênero *Paraleishmania* e o gênero *Endotrypanum* (*nomen dubium*) indicando uma proximidade filogenética entre eles, embora com alto valor de divergência genética entre eles. O gene gGAPDH mostrou divergências genéticas que variam de 9,6-16,0% entre o gênero *Paraleishmania* e o gênero *Leishmania*, sendo a menor divergência (9,6%) entre as espécies *L. infantum* e *P. deanei* e a maior entre as espécies *L. guyanensis* e *P. deanei* (16,0%). A região V7/V8 resulta em uma divergência que varia de 2,0-4,7% entre o gênero *Paraleishmania* e o gênero *Leishmania*. As menores divergências genéticas estão entre a espécie *L. major* e *P. deanei* e entre *L. major* e *P. hertigi* (2,0%). A maior divergência genética (4,7%) está entre as espécies *P. deanei* e *L. donovani* e *P. hertigi* e *L. donovani* assim como estão entre *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni*, e *L. naiffii*.

1.3. Gênero *Endotrypanum* (*nomen dubium*):


O status taxonômico do gênero ainda não foi esclarecido e permanece em discussão. A COLPROT só possui um depósito da espécie *Endotrypanum monterogeei* (COLPROT 151) e sua amplificação e sequenciamento só foi possível na região V7/V8. As outras espécies deste gênero que foram sequenciadas neste trabalho estão depositadas na CLIOC - *Endotrypanum colombiensis* (IOCL 1245) e *Endotrypanum equatorensis* (IOCL 889) e outras foram obtidas no banco de dados *Genbank*. O gene gGAPDH resultou em uma divergência genética que varia de 0,0-4,7% entre as espécies *E. monterogeei* (KX790716), *E. herreri* (KX790704), *E. colombiensis* (IOCL 1245), *E. equatorensis* (IOCL 889) e *E. schaudinni* (KX790715). Já a região V7/V8 demonstra uma divergência genética de 0,0-0,8% entre as espécies *E. monterogeei* (COLPROT 151), *E. schaudinni* (KX790771), *E. colombiensis* (IOCL 1245), *E.*

equatorensis (IOCL 889). As espécies *E. monterogei* e *E. schaudinni* não apresentaram divergência genética entre elas nas análises dos dois genes. A maior divergência genética foi apresentada entre *E. herreri* e *E. colombiensis* (4,7%) no gene gGAPDH e entre as espécies *E. herreri* e *E. colombiensis*, *E. herreri* e *E. schaudini*, *E. herreri* e *E. monterogei* (0,7%) na região V7/V8.


Ao analisarmos as divergências entre os gêneros *Endotrypanum* e *Paraleishmania* foi observado uma divergência que varia entre 10,8-12,5% no gene gGAPDH e uma divergência que varia de 2,5-2,8% na região V7/V8 (como foi dito na seção anterior). O gene gGAPDH resultou na menor divergência genética entre as espécies *E. equatorensis* e *P. deanei* (10,8%) e a maior (12,5%) entre as espécies *E. herreri* e *P. hertigi*. Já a região V7/V8 mostra as menores divergências genéticas (2,5%) entre as espécies *E. equatorensis* e *P. deanei* e *E. equatorensis* e *P. hertigi*. As espécies *E. herreri* e *P. deanei* e *E. herreri* e *P. hertigi* também apresentaram a mesma divergência entre elas. As maiores divergências (2,8%) estão entre as espécies *E. colombiensis* e *P. deanei*, *E. colombiensis* e *P. hertigi* e entre *E. schaudini* e *P. deanei* e *E. schaudini* e *P. hertigi*. No entanto, o gene gGAPDH mostra divergências genéticas que variam de 10,8-17,4% entre o gênero *Endotrypanum* e o gênero *Leishmania*, sendo a menor divergência (10,8%) entre as espécies *L. infantum* e *E. equatorensis* e a maior entre as espécies *L. panamenis* e *E. herreri* (17,4%). A região V7/V8 resulta em uma divergência que varia de 2,0-6,6% entre o gênero *Endotrypanum* e o gênero *Leishmania*. As menores divergências genéticas estão entre as espécies *L. major* e *E. herreri* e as maiores se encontram entre *E. colombiensis* e *L. donovani* e *E. colombiensis* e *L. infantum* (6,6%).

2. Identificação taxonômica de tripanossomatídeos isolados da ordem Lepidoptera






A identificação taxonômica de 33 isolados da ordem Lepidoptera (**Quadro 7**) foi realizada através da análise das sequências dos genes empregados anteriormente.

Identificador do isolado	Hospedeiro	Identificação Taxonômica do isolado	Local de coleta	Alvos sequenciados
LEIP 189	Lepidoptera <i>Aphrissa statira</i> 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH

LEIP 284	Lepidoptera <i>Phoebis sennae</i> 	OTU I (<i>Crithidia</i> sp1)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA
LEIP 290	Lepidoptera <i>Protesilaus</i> sp. 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
LEIP 549	Lepidoptera	OTU IV (<i>Crithidia</i> sp4)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA
LEIP 555	Lepidoptera	OTU III (<i>Crithidia</i> sp3)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
COLPROT 730	Lepidoptera <i>Aphrissa statira</i> 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 731	Lepidoptera, <i>Aphrissa statira</i> 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 732	Lepidoptera <i>Aphrissa statira</i> 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA

COLPROT 733	Lepidoptera <i>Phoebis sennae</i> 	OTU I (<i>Crithidia</i> sp1)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 734	Lepidoptera <i>Protesilaus</i> sp. 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 735	Lepidoptera <i>Protesilaus</i> sp. 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 736	Lepidoptera <i>Protesilaus</i> sp. 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA
COLPROT 738	Lepidoptera, <i>Phoebis sennae</i> 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA
COLPROT 739	Lepidoptera <i>Phoebis argante</i> 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH

COLPROT 741	Lepidoptera, <i>Aphrissa statira</i> 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 742	Lepidoptera <i>Phoebis sennae</i> 	OTU VI (<i>Strigomonas</i> sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 743	Lepidoptera <i>Eunica amycla</i> 	<i>Crithidia mellificae</i>	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
COLPROT 745	Lepidoptera <i>Phoebis philea</i> 	OTU V (Trypanosomatidae sp.).	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 747	Lepidoptera	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
COLPROT 748	Lepidoptera	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
COLPROT 749	Lepidoptera <i>Euritides dolicaon</i>	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 752	Lepidoptera <i>Aphrissa statira</i> 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH

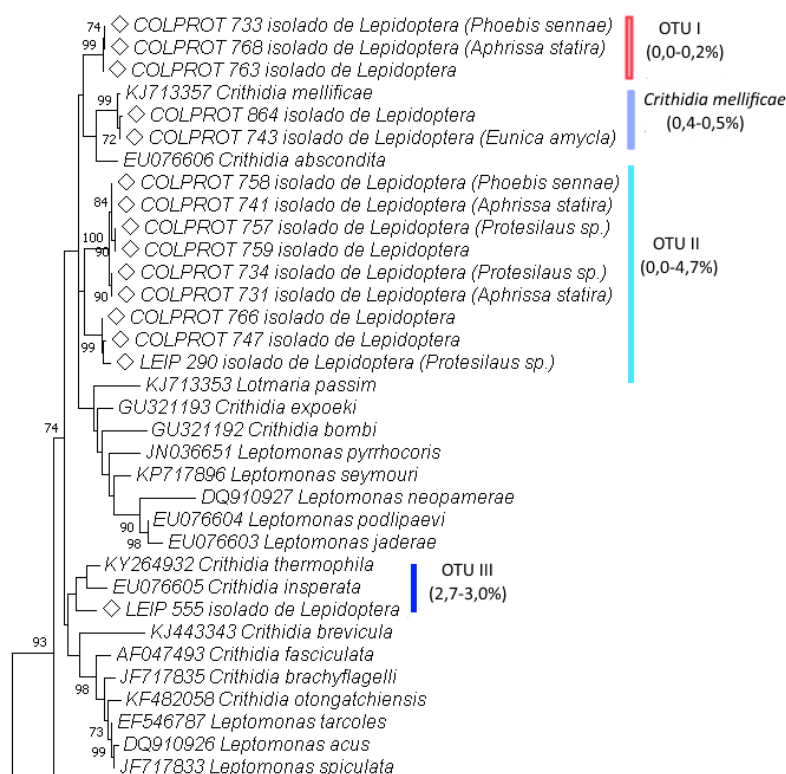
COLPROT 753	Lepidoptera <i>Protesilaus</i> sp. 	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA
COLPROT 757	Lepidoptera <i>Protesilaus</i> sp. 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 758	Lepidoptera <i>Phoebis sennae</i> 	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 759	Lepidoptera	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 760	Lepidoptera <i>Euritides dolicaon</i>	OTU V (Trypanosomatidae sp.)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
COLPROT 763	Lepidoptera 	OTU I (<i>Crithidia</i> sp1)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH
COLPROT 766	Lepidoptera	OTU II (<i>Crithidia</i> sp2)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSU rRNA e gGAPDH
COLPROT 768	Lepidoptera <i>Aphrissa statira</i> 	OTU I (<i>Crithidia</i> sp1)	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA e gGAPDH

COLPRTOT 863	Lepidoptera <i>Euselasia</i> sp.	<i>Crithidia insperata</i>	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA
COLPROT 864	Lepidoptera	<i>Crithidia mellifica</i>	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	gGAPDH
COLPROT 865	Lepidoptera <i>Magneuptychia</i> sp.	<i>Crithidia thermophila</i>	Brasil –AM Nova Airão (Parna Jaú)	V7/V8 SSUrRNA

Quadro 7. Lista das amostras identificadas para cada alvo molecular

Visando a identificação taxonômica dos novos isolados, as sequências obtidas neste estudo foram comparadas com sequências disponíveis em banco de dados (*Genbank*) (**Anexo I e Anexo II**).

Em seguida, avaliamos a estrutura de clusterização hierárquica produzida a partir do método de máxima verossimilhança (ML) e com matriz de distância Kimura-2-parâmetros utilizando 1000 réplicas de *bootstrap* e considerando valores a partir de 70% como confiáveis. Para uma melhor compreensão das identificações taxonômicas dos isolados, os resultados foram relatados e discutidos por gêneros (**Figuras 6, 7 e 8**).



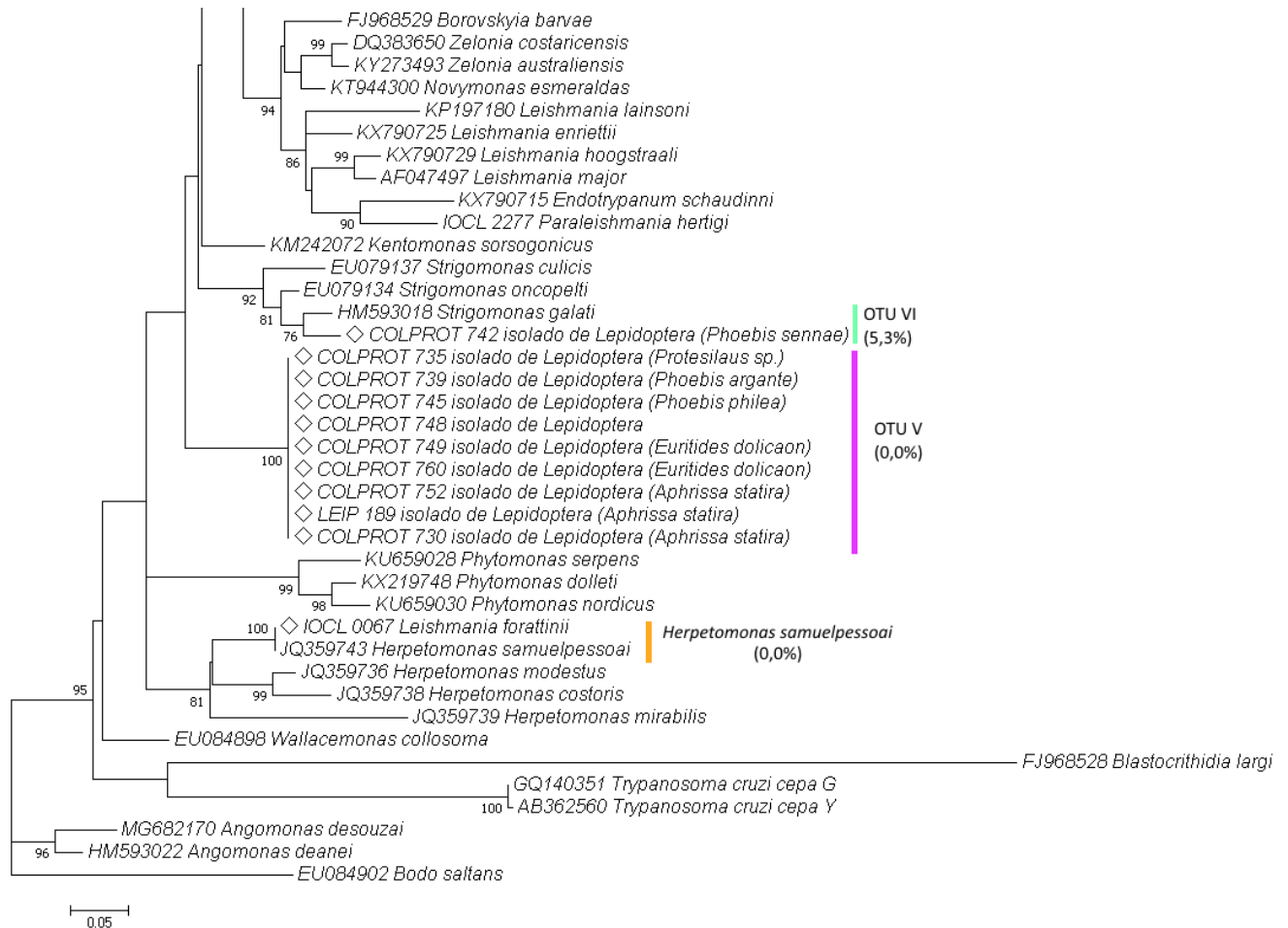
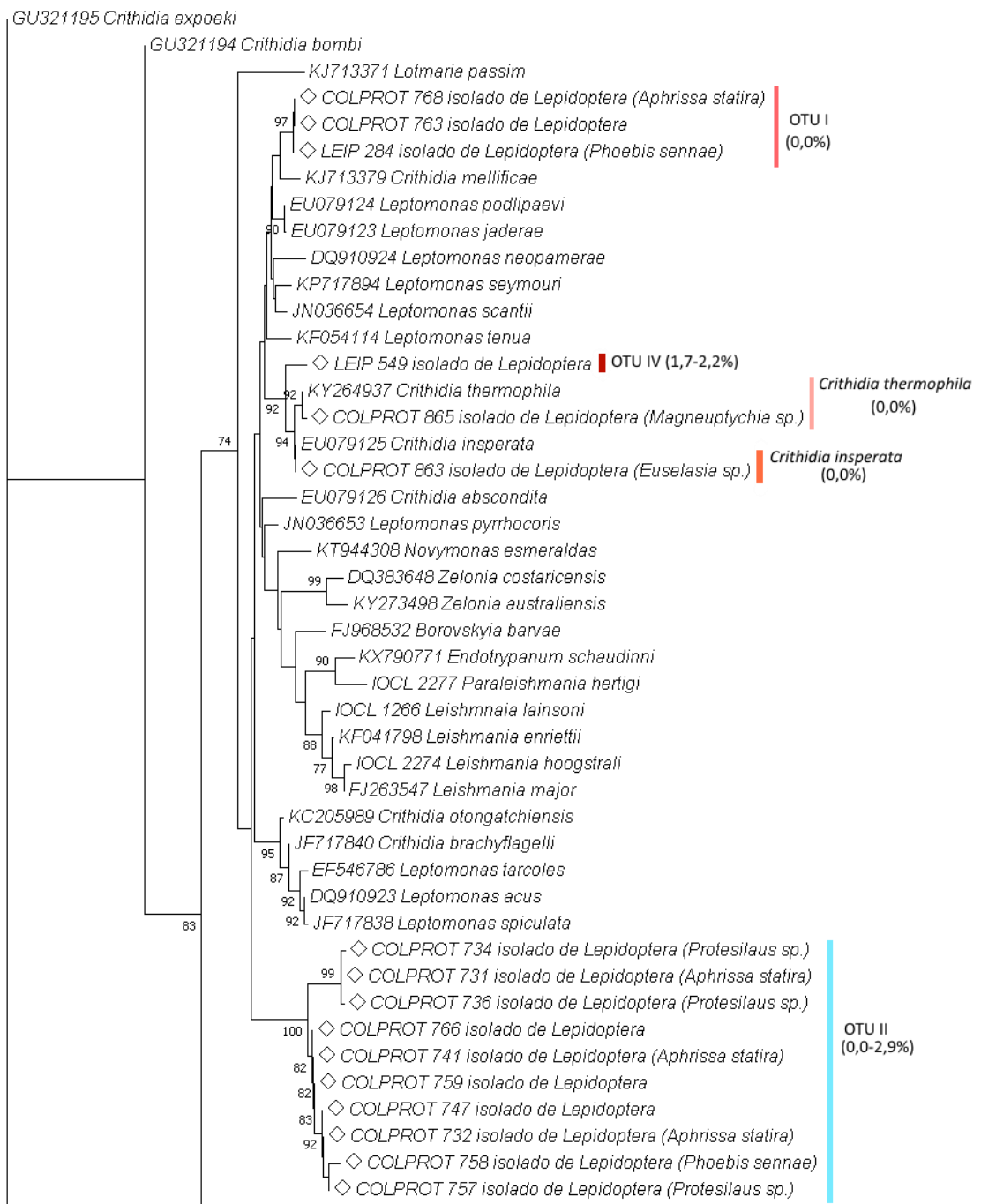


Figura 6. Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para o gene gGAPDH. Árvore filogenética baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML) para o gene gGAPDH utilizando o programa PHYML. O modelo utilizado nesta análise foi GTR+I+G de acordo com o critério de informação Akaike (AIC). Os losângulos indicam as seqüências geradas neste trabalho.



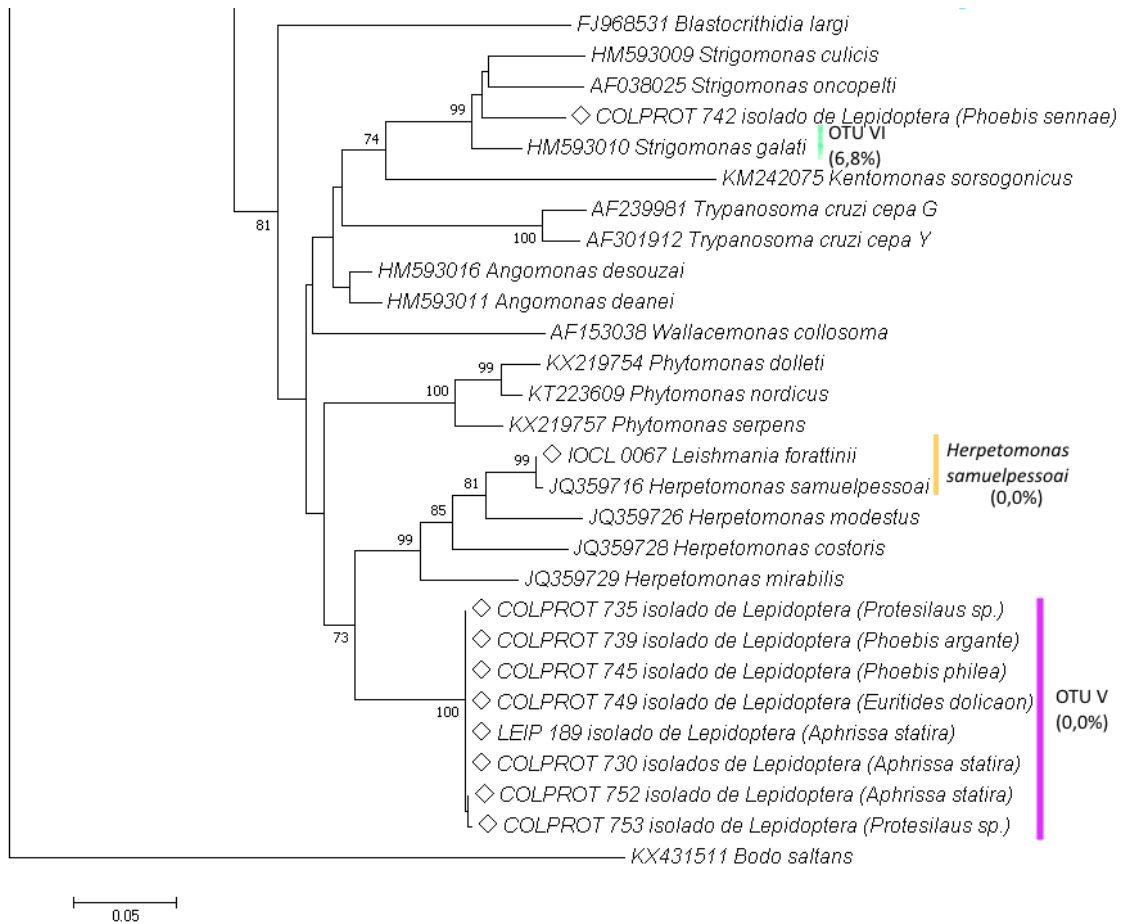


Figura 7. Análise de Máxima Verossimilhança (ML) para o gene V7/V8 SSUrRNA. Árvore filogenética baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para a região V7/V8 SSUrRNA utilizando o programa PHYML. O modelo utilizado nesta análise foi GTR+I+G de acordo com o critério de informação Akaike (AIC). Os losângulos indicam as sequências geradas neste trabalho.

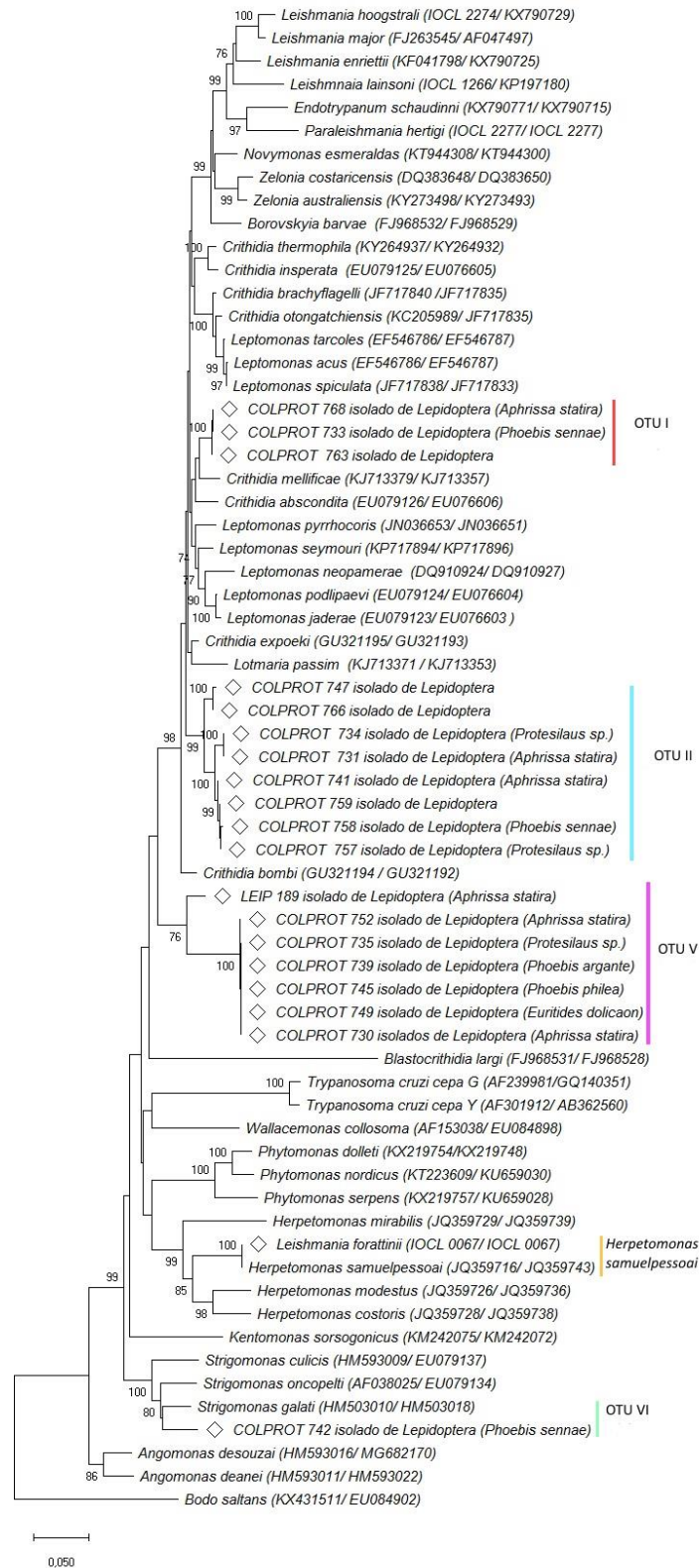


Figura 8. Análise de Máxima Verossimilhança (ML) das seqüências concatenadas de gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA. Árvore filogenética baseada no método probabilístico de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) para as seqüências concatenadas dos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA utilizando o programa PHYML. O modelo utilizado nesta análise foi GTR+I+G de acordo com o critério de informação Akaike (AIC). Os losângulos indicam as seqüências geradas neste trabalho.

2.1. Gênero *Crithidia*:

Os isolados de Lepidoptera COLPROT 768, 763 e 733 apresentaram uma divergência genética de 0,0-0,2% entre si no alvo gGAPDH. Além destes, foi possível a amplificação e sequenciamento de um outro isolado (LEIP 284) no gene V7/V8 SSUrRNA. As análises não demonstraram nenhuma divergência genética entre COLPROT 768, 763, 733 e LEIP 284 neste gene. Com base no resultado dos dois alvos analisados podemos concluir que são isolados de uma mesma espécie.

A identidade deste grupo foi também analisada entre as espécies já descritas na literatura pela ferramenta *BLAST* (**Anexo II**) e pela análise das divergências genéticas intra e interespecíficas. As divergências genéticas interespecíficas apresentaram maior identidade entre as espécies *Crithidia expoeki* (4,0%) e *Crithidia mellificae* (4,1%) no gene gGAPDH e uma identidade genética de 0,8% entre a espécie *Crithidia bombi* e de 1,2% entre a espécie *Crithidia expoeki* na região V7/V8. Uma intensa busca na literatura dos principais autores estudiosos destes tripanossomatídeos foi realizada para que pudéssemos definir estes isolados. No entanto, não existe um padrão de divergência genética a ser adotado para identificação taxonômica dos tripanossomatídeos. Sendo assim, observamos que a menor divergência genética já estabelecida na literatura entre as diferentes espécies do gênero *Crithidia* era de 2,1% no gene gGAPDH. Por isso, estabelecemos que os isolados que apresentaram uma divergência genética maior que 2,1% nas análises entre as sequências das espécies já definidas e conhecidas sugerem a existência de novas OTUs (*Operational Taxonomic Unit*). Optamos por nos basear na divergência genética resultada no gene gGAPDH para identificação de novos isolados porque a região V7/V8 SSUrRNA não demonstrou agrupamentos compatíveis quanto aos gêneros e espécies estudados na subfamília Leishmaniinae. No entanto, este critério adotado não se aplica para outros gêneros da família Trypanosomatidae. Um exemplo disso é a baixa divergência genética (0,2%) observada entre espécies de *Leishmania*, como *L. infantum* e *L. donovani*, no gene gGAPDH. Além disso, é importante ressaltar que quando analisamos apenas a região V7/V8, este critério também não pode ser adotado, uma vez que ele foi estabelecido com base no gene gGAPDH.

Portanto, os isolados COLPROT 768, 763, 733 e LEIP 284 são representantes da primeira OTU (OTU I) e candidatos a uma nova espécie de *Crithidia* (*Crithidia* sp1).

Um outro grupo é representado pelos isolados LEIP 290, COLPROT 766, 747, 731, 732, 734, 736, 741, 747, 757, 758, 759 e 766. O gene gGAPDH apresenta uma divergência genética de 0,0-4,7% entre os isolados COLPROT 290, 731, 734, 741, 747, 757, 758, 759 e

766 e a região V7V8 resultou em uma divergência que varia de 0,0-2,9% entre os isolados 731, 732, 734, 736, 741, 747, 757, 758, 759 e 766. A identidade deste grupo foi também analisada entre as espécies já descritas na literatura. Os isolados apresentaram maior identidade genética (4,7-5,1%) com a espécie *Crithidia expoeki* no gene gGAPDH e uma identidade genética que varia de 0,8-1,6% também entre a espécie *Crithidia expoeki* na região V7/V8. Por este motivo, consideramos que estes isolados são representantes de uma segunda OTU (OTU II) e candidatos a uma outra espécie do gênero *Crithidia* (*Crithidia* sp2).

Considerando que ambas OTUs apresentaram proximidade com *C. expoeki*, comparamos também a divergência genética interespecífica das duas OTUs que variou aproximadamente 4,9% no gene gGAPDH e aproximadamente 8,3% na região V7/V8 entre os isolados da OTUI e os isolados da OTUII. A proposição de novas OTUs é sustentada pelos valores de divergências genéticas observados entre elas e pela formação de clados monofiléticos na reconstrução filogenética. A árvore concatenada separa as OTUs em dois grupos com suporte estatístico de 99% por *bootstrap* justificando a proposição de duas OTUs.

A amplificação e sequenciamento de alguns isolados só foi possível para um único gene. O isolado LEIP 555, por exemplo, foi analisado somente no gene gGAPDH. O mesmo apresenta a menor divergência genética (2,9%) com *Crithidia thermophila* (KY264932). A ferramenta *BLAST* também apresentou uma identidade genética de 97% com a espécie *C. thermophila* (**Anexo II**). Em relação à identificação de espécies já descritas, acreditamos que a divergência genética resultada pelo gene gGAPDH indica a presença de uma nova OTU (OTU III) e o isolado seja um candidato a uma nova espécie do gênero *Crithidia* (*Crithidia* sp3).

Outros dois isolados (COLPROT 743 e 864) também foram analisados somente no gene gGAPDH e uma identidade genética de 0,4-0,5% foi observada entre estas amostras e a espécie *Crithidia mellificae* (KJ713357). Esses valores permitem sugerir que os isolados COLPROT 743 e 864 são cepas de *Crithidia mellificae*, encontradas em borboletas.

Os isolados LEIP 549, COLPROT 863 e 865 foram analisados somente para a região V7/V8 SSUrRNA. As espécies *Crithidia thermophila* (KY264937), *Crithidia insperata* (EU079125), COLPROT 863 e COLPROT 865 apresentam uma divergência genética que varia de 0,0-0,7% nesta região. A região analisada não apresentou divergência genética entre o isolado COLPROT 865 e a espécie *Crithidia thermophila* (KY264937), assim como não houve divergência genética entre o isolado COLPROT 863 e a espécie *Crithidia insperata* (EU079125). A ferramenta *BLAST* resultou em uma identidade genética de 99,73% entre COLPROT 863 e a espécie *Crithidia insperata* e 99,60% entre COLPROT 865 e a espécie

Crithidia thermophila (**Anexo II**). Considerando que as divergências genéticas apresentadas por esta região entre os isolados e as duas espécies já estabelecidas na literatura e depositadas no banco de dados *Genbank* foram muito baixas, determinamos que o isolado COLPROT 863 seja passível de ser uma *Crithidia insperata* e o isolado 865 seja uma *Crithidia thermophila*. É importante ressaltar que estamos analisando um único gene e devemos considerar que a divergência entre espécies analisadas apenas pela região V7/V8 é mais baixa ou inexistente.

Além disso, foi observada uma divergência genética interespecífica que varia de 1,7-2,2% entre LEIP 549, COLPROT 863, 865, *Crithidia insperata* e *Crithidia thermophila* apenas na região V7/V8. A ferramenta BLAST também mostra uma identidade genética de 98,26% entre o isolado LEIP 549 e a espécie *C. insperata* (**Anexo II**). Levando em conta que a divergência nesta região é baixa ou inexistente, a divergência genética apresentada pelo isolado LEIP 549 indica que ele seja um representante de uma nova OTU (OTU IV) e um candidato a uma nova espécie de *Crithidia* (*Crithidia* sp4). Neste caso, a utilização de outros marcadores moleculares ou análises filogenéticas mais robustas serão necessárias para uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre esses isolados.

2.2. Identificação de tripanossomatídeos com potencial a novos gêneros:

Não foi observado divergências genéticas entre os isolados LEIP 189, COLPROT 752, 730, 760, 749, 748, 745, 739, 753 e 735. Os isolados aparecem agrupados em um clado monofilético e apresentam uma divergência genética que varia de 9,0-15,0% quando comparamos com as demais sequências de tripanossomatídeos depositados no banco de dados *Genbank* (**Anexo II**). Os tripanossomatídeos foram corados com giemsa e pela microscopia de luz foi possível observar o cinetoplasto e suas formas coanomastigotas (resultados gerados pelo Dr. André Borges Veloso – **Figura 9**). No entanto, as sequências analisadas não sustentam a classificação destes isolados com nenhuma espécie descrita. Por este motivo, consideramos que este grupo de isolados correspondam a uma nova OTU (OTU V) e que este grupo seja um candidato a um novo gênero.

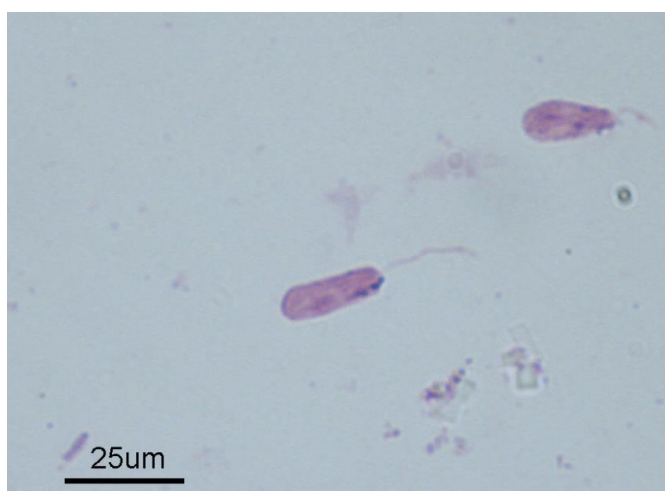


Figura 9. Microscopia de luz do isolado COLPROT 735 corado com Giemsa. Formas coanomastigotas identificadas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Triptose). Resultado obtido pelo Dr. André Borges Veloso.

Apesar de termos realizado uma análise entre estes isolados e as sequências depositadas no *Genbank*, cabe ressaltar que dependendo da distância genética entre os gêneros, pode haver saturação do marcador por conta de *multiple hits* e possíveis homoplasias. Por isso, valores altos de divergência devem ser vistos com cautela e integrados a outras análises.

2.3. Gênero *Strigomonas*

Com base nas análises das sequências do gene *gGAPDH*, as espécies de *Strigomonas* aqui analisadas (*S. culicis*, *S. oncopelti* e *S. galati*) apresentaram divergências genéticas que variam de 5,5-8,3%. O isolado COLPROT 742 apresentou uma divergência genética de 5,3% e 5,5% entre as espécies *Strigomonas galati* (HM593018) e *Strigomonas oncopelti* (EU079134), respectivamente. A região V7/V8 SSUrRNA também resultou na menor divergência entre o isolado LEIP 742 e a espécie *Strigomonas galati* (HM593010) (6,8%). A ferramenta *BLAST* mostra uma identidade de 94,54% entre o isolado e a espécie *S. culicis* no gene *gGAPDH* e uma identidade de 92,57% entre o isolado e a espécie *S. galati* na região V7/V8 (**Anexo II**). A análise das sequências concatenadas mostra um suporte de 80% por *bootstrap* entre a o clado que sustenta a espécie *S. oncopelti* e o clado que sustenta o isolado 742 e a espécie *S. galati*. No entanto, a análise concatenada não apresentou um suporte maior que 70% de *bootstrap* entre a espécie *S. galati* e o isolado.

A partir da análise destes resultados, consideramos que o isolado LEIP 742 seja uma nova OTU (OTU VI) e um candidato a uma nova espécie do gênero *Strigomonas* mas é importante ressaltar que apenas o sequenciamento é insuficiente para descrição de novas espécies e

gêneros e que a apomorfia do gênero *Strigomonas* é a presença do endossionbionte bacteriano (Motta, 2010). Portanto, é imperativo a análise morfológica desse e de demais isolados.

V. Discussão

Os alvos gGAPDH e V7/V8 SSU rRNA são genes de evolução lenta tornando-se mais adequados para estudos de organismos que divergiram ao longo de grandes escalas de tempo (Hamilton *et al.*, 2004). Por este motivo, o emprego destes alvos para identificação das espécies de *Leishmania* é restrito já que a divergência genética entre espécies é baixa (Hamilton *et al.*, 2004, 2007). Isso ficou claro no presente estudo, visto que os resultados não permitiram identificar as espécies de *Leishmania* com estes alvos, no entanto, a separação das espécies com robustez influencia na definição dos subgêneros por serem grupos filogeneticamente próximos. Foi possível observar que o gene gGAPDH permitiu uma boa distinção dos subgêneros, mas o mesmo não foi observado nas análises da região V7/V8 SSUrRNA. Deschamps e colaboradores (2011) já haviam relatado que o gene 18S é incapaz de delinear relacionamentos filogenéticos.

Os trabalhos baseados na identificação taxonômica de *Leishmania* mostram uma melhor resolução dos táxons através da utilização de sequências concatenadas de gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA (Marcili *et al.*, 2014) e isso foi possível observar nas nossas análises concatenadas baseadas na filogenia do gênero. No entanto, devemos ressaltar que analisar várias amostras de uma mesma espécie para um grupo restrito parece ter um melhor impacto na avaliação destes marcadores quanto ao potencial de definição (Zwickl & Hillis, 2002).

Gênero *Leishmania*:

Durante este estudo encontramos um depósito da cepa depositada como *L. forattinii* (IOCL 0067) que não apresentou divergências genéticas entre a espécie *Herpetomonas samuelpessoai* em todas as análises deste trabalho. A espécie *L. forattinii* (IOCL 0067) foi isolada do fígado e baço de um *Didelphis marsupialis* em uma busca por potenciais hospedeiros de *Leishmania* em áreas florestais brasileiras (Yoshida *et al.*, 1979). Uma caracterização biológica, bioquímica e molecular preliminar posicionou este isolado no complexo *L. mexicana*. Posteriormente, análises de isoenzimas, anticorpos monoclonais e uma análise por kDNA distinguiu o isolado de outras espécies de *Leishmania* mas os resultados biológicos (cultivo *in vivo* e *in vitro*) mantiveram o posicionamento da espécie no complexo *L. mexicana* (Yoshida *et al.*, 1993). Esta cepa registrada na CLIOC não é o depósito original por isso confirmamos que a cepa (IOCL 0067) corresponde a *Herpetomonas samuelpessoai* e sugerimos apenas a revisão do status taxonômico desta cepa depositada na CLIOC pois nossos resultados não permitem afirmar que *L. forattinii* não é um nome válido.

Subgênero *Leishmania* e *Sauroleishmania*:

Em função da falta de um marcador padrão para a identificação de espécies de *Leishmania* observamos que existe uma diferença expressiva com relação ao número de sequências disponíveis por espécie, assim como entre as espécies que são analisadas por marcador.

O complexo *L. donovani* é claramente delimitado por vários alvos. Poucos são os estudos que separam as espécies desse complexo (Schonian *et al.*, 2010; Kuhls *et al.*, 2013). Considerando nossos resultados, as espécies *L. donovani* e *L. infantum* não se separam na árvore hierárquica. Como já mencionado, os valores de divergência obtidos para os alvos avaliados (SSUrDNA e gGAPDH) não permitem distinguir as espécies mais próximas filogeneticamente e, portanto, esses alvos, individualmente ou em conjunto, não devem ser empregados para identificação de espécies de *Leishmania*. O uso destes alvos em conjunto foi apresentando em outro estudo avaliando várias sequências de espécies distintas de *Leishmania*, sugerindo inclusive que *L. infantum* e *L. chagasi* são espécies distintas (Marcili *et al.*, 2014), contrariando outros estudos (Mauricio *et al.*, 2000; Kuhls *et al.*, 2005). Além de considerarmos, como já foi dito, que os valores de divergência para estes marcadores são baixos para serem utilizados para identificação de espécies do gênero *Leishmania*, é importante mencionar que as sequências de *L. infantum* analisadas no trabalho de Marcili são todas idênticas entre si, assim como as de *L. donovani*. Um aspecto importante e que certamente se repetirá nas análises de outros grupos é a influência das cepas estudadas no agrupamento obtido assim como o número de espécies analisadas. Nas análises aqui obtidas temos uma única sequência de *L. donovani* originária da Etiópia e uma sequência de *L. infantum* isolada no Paraguai. Desta forma podemos garantir que os dois alvos aqui estudados não separam as duas espécies e reforçam a validação do complexo *L. donovani*.

Outra questão importante a ser discutida neste trabalho é a proximidade filogenética da sequência de *L. major* entre as sequências das espécies do subgênero *Sauroleishmania* resultadas no gene gGAPDH e na análise concatenada dos genes. As sequências de *Leishmania* geradas neste estudo estão depositadas em uma Coleção Biológica (CLIOC). No entanto, também utilizamos sequências depositadas em banco de acesso público como a sequência de *L. major*. Sabemos que estas sequências nem sempre foram originadas por trabalhos que versam sobre identificação de *Leishmania*, além da falta de informação da cepa depositada. Alguns estudos têm apontado para o depósito de sequência erradas no *Genbank*,

questão que não parece ser rara. Os problemas incluem erros gerados pelo sequenciamento, mistura de amostras, contaminações e identificação incorreta das espécies. Dados errados resultam em confusões taxonômicas e filogenéticas e esses erros são dificilmente detectados (Aldecoa-Otalora *et al.*, 2009; Shen *et al.* 2013; Van der Auwera *et al.*, 2013; Langdon 2014; Laurence *et al.* 2014).

Subgênero *Viannia*:

A proposta de classificação de *Leishmania* em subgêneros é relatada nos diversos estudos que usam MLEE ou análises moleculares (Cupolillo *et al.* 1994, Schonian *et al.*, 2010; Kulhs *et al.*, 2013). Embora a classificação das *Leishmania* spp. de lagartos ainda seja discutida com alguns autores propondo um novo gênero e outros mantendo como um subgênero (Safjanova 1982; Croan *et al.*, 1997; Fraga *et al.*, 2010), a validação dos subgêneros *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)* é bem suportada (Lainson & Shaw, 1987). A região V7/V8 não permitiu a distinção das espécies do subgênero *Viannia* mas o gene gGAPDH permitiu observar que a espécie *L. lainsoni* é a mais divergente do subgênero corroborando com outros estudos (Cupolillo *et al.*, 1994; Eresh *et al.*, 1995). Também foi possível observar que a divergência inter-específica das espécies do subgênero *Viannia* é sempre menor quando comparado as espécies do subgênero *Leishmania*. O subgênero formou clados bem definidos em todas as análises com altos valores estatísticos por *bootstrap*.

Subgênero *Mundinia*:

O subgênero *Mundinia* alberga espécies que causam infecção humana. Dentre estas espécies estão *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania enriettii* e *Leishmania macropodum*. A espécie *L. enriettii* foi a única analisada neste estudo e análises filogenéticas apresentadas em estudos anteriores sugerem que *L. enriettii* forma um complexo de espécies e se posiciona de maneira mais basal, dentro do gênero *Leishmania*, não fazendo parte dos subgêneros (Noyes *et al.*, 2002; Dougall *et al.*, 2011). As divergências genéticas analisadas também mostram que a espécie *L. enriettii* não está entre as espécies que se encontram dentro dos subgêneros *Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Viannia*. O gene gGAPDH resulta na menor divergência genética entre *L. enrietti* e as espécies *L. infantum* e *L. donovani* corroborando com os estudos de Noyes *et al.*, 2002 e Dougall *et al.*, 2011. No entanto, a análise concatenada dos genes não apresenta suporte estatístico maior ou igual a 70% no clado que sustenta a espécie *L. enriettii*. Isso pode ter ocorrido pelo fato da espécie *L. enriettii* ser a única espécie inserida no complexo uma vez que ela é diferente de todas as espécies de *Leishmania* analisadas. A implicação evolutiva de diferentes vetores no ciclo de vida da espécie *L. enriettii* precisa de

mais investigações, pois essas relações biológicas entre vetores, hospedeiros e parasitos podem levar a compreensão genética e evolutiva das espécies.

Gêneros *Endotrypanum* e *Paraleishmania*:

A maior parte das espécies que compõem o gênero *Endotrypanum* (*nomen dubium*) e o atual gênero *Paraleishmania* foram retiradas da antiga seção *Paraleishmania*. A seção alocava as espécies consideradas “*Leishmania-like*”, ou seja, as espécies que não eram classificadas em nenhum complexo e/ou subgênero do gênero *Leishmania*. Nossos resultados corroboram com os estudos que apresentam essa seção, separando essas espécies de outras espécies de *Leishmania* (Croan *et al.*, 1996; Noyes *et al.*, 1997; Marcili *et al.*, 2014; Da Graça, 2016, Cupolillo *et al.* 2000), pois os gêneros *Endotrypanum* e *Paraleishmania* formaram grupos bem estabelecidos em todas as análises com altos valores de suporte por *bootstrap*. Os estudos também já mostravam a proximidade entre *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. colombiensis* e *L. equatorensis* (Marcili *et al.*, 2014).

Os resultados gerados neste estudo permitem reconhecer que as divergências genéticas observadas são suficientes para constituir dois táxons diferentes. No entanto, *Leishmania*, *Paraleishmania* e *Endotrypanum* apresentam proximidades filogenéticas entre eles. Também devemos ressaltar que não houve confirmação da relação do parasito com o sistema intraeritrocítico do hospedeiro na transferência de *L. colombiensis*, *L. equatoriensis* e *L. herreri* para o gênero *Endotrypanum*. Não foi considerada uma revisão dos seus reservatórios e das suas manifestações clínicas negligenciando o aspecto biológico das espécies, bem como sua relação com o hospedeiro (Rodríguez-Bonfante *et al.*, 2003).

Como já foi relatado anteriormente, Kostygov & Yurchenko (2017) mantiveram a definição original da subfamília, mas criaram dois táxons subordinados a infrafamília. A infrafamília *Leishmaniatae* que une os gêneros *Leishmania*, *Paraleishmania*, *Endotrypanum* (*nomen dubium*), *Novymonas*, *Zelonia* e *Borovskya* e outra infrafamília denominada de *Crithidiatae* que abrange os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas* e *Lotmaria*. Os autores definem a infrafamília *Crithidiatae* demonstrando a exclusão destes gêneros na subfamília *Leishmaniinae*. Os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas* e *Lotmaria* foram mencionados como um grupo órfão. Os autores acreditam que somente a relação filogenética destes gêneros com os possíveis ancestrais monoxênicos do gênero *Leishmania* não resulta na definição de um único táxon denominado *Leishmaniinae*. Considerando a nova infrafamília *Leishmaniatae*, é importante ressaltar que o estudo de Kostygov *et al.*, 2016 mostra a proximidade filogenética entre o gênero *Novymonas* e as espécies do gênero *Leishmania*. Mais tarde, os gêneros

Zelonia e *Novymonas* foram relatados como tripanossomatídeos basais a todos os outros gêneros pertencentes à subfamília Leishmaniinae e provavelmente os ancestrais mais próximos de um parasito que passou de um ciclo de vida monoxênico para um ciclo de vida heteroxênico (Barrat *et al.*, 2017; Kaufer *et al.*, 2019).

As nossas análises concatenadas resultaram em baixos valores estatísticos de *bootstrap* entre os gêneros *Novymonas*, *Zelonia* e *Borovskya*. No entanto, a relação filogenética entre eles é observada na divergência genética do gene gGAPDH. As menores divergências genéticas (4,9-5,1%) estão entre as espécies *Novymonas esmeraldas*, *Zelonia costaricensis* e *Zelonia australiensis* e entre *Novymonas* e *Borovskya* (6,6%). Já a região V7/V8 SSUrRNA resulta na menor divergência genética entre *Novymonas* e as espécies de *Leishmania*: *L. naiffi*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. lainsoni* (5,0%) corroborando com o estudo de Kostygov *et al.*, 2016 e Kaufer *et al.*, 2019. As duas espécies do gênero *Zelonia* são mais próximas entre elas mesmas nos dois genes (2,4% - gGAPDH e 2,5% - V7/V8 SSUrRNA). Se faz necessária uma proposta de integração dos dados obtidos por análises moleculares aos critérios bioquímicos, morfológicos e de interação parasito-hospedeiro para que seja possível uma melhor compreensão da evolução entre os gêneros *Borovskya*, *Zelonia* e *Novymonas*.

Quanto a infrafamília Crithidiatae, é importante ressaltar que as análises do gene SL mostram similaridades entre as espécies *Crithidia thermophila*, *Leptomonas acus*, *Leptomonas tarcoles* e *Leptomonas bifurcata* (Yurchenko *et al.*, 2008; Ishemgulova *et al.*, 2017). Já as nossas análises baseadas nas sequências concatenadas mostram uma proximidade filogenética entre as espécies *L. acus*, *L. spiculata*, *L. tarcoles*, *C. brachyflageli* e *C. otongatchiensis*. Estas espécies formam um grupo monofilético composto por dois gêneros diferentes. A espécie *C. thermophila* se encontra no mesmo clado de *C. insperata* e os nossos resultados confirmam que há uma maior proximidade filogenética entre essas duas espécies do que entre *C. thermophila*, *L. acus*, *L. spiculata* e *L. tarcoles*.

Um grupo de espécies do gênero *Crithidia* que tem sido bastante estudado nos últimos anos são os parasitos de abelhas: *C. mellificae*, *C. bombi* e *C. expoeki* (Langridge & McGhee, 1967; Schmid-Hempel *et al.*, 2010; Runckel *et al.*, 2014; Ravoet *et al.*, 2015). O impacto da presença de tripanossomatídeos na polinização e na produção de mel contribuiu para a identificação de novos isolados de abelhas e a taxonomia deste grupo também vem sendo revista. No entanto, nenhum trabalho ainda foi realizado visando analisar a filogenia destas espécies com outras espécies do gênero *Crithidia* isoladas de outros hospedeiros. As nossas

análises concatenadas mostram uma proximidade filogenética entre a espécie *C. mellificae* e *C. abscondita*. A espécie *C. abscondita* foi identificada no trabalho de Yurchenko e colaboradores (2009) e isolada do intestino de um Heteroptera. A identificação da espécie foi realizada por métodos morfológicos e moleculares através do gene SSU rRNA.

Nossos resultados corroboram com a definição das duas infrafamílias dentro da subfamília Leishmaniinae (Kostygov & Yurchenko, 2017), uma vez que as análises não demonstraram proximidades filogenéticas entre os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Lotmaria* e os outros gêneros da subfamília.

Identificação Taxonômica de Tripanossomatídeos:

O conceito de espécie biológica ainda hoje é uma questão bastante controversa para todos os organismos conhecidos (Velasco, 2008; 2013). Definir um gênero ou uma espécie entre micro-organismos é ainda mais difícil. Em tripanossomatídeos, este conceito também permanece sob discussão e a classificação da família Trypanosomatidae é controversa, principalmente entre os parasitos de insetos. Não existe um consenso na literatura de quantos e quais alvos moleculares são necessários para definir uma espécie ou gênero novo. Além disso, também não existe um limiar estabelecido de divergência genética entre os genes utilizados para filogenia e taxonomia de tripanossomatídeos.

Por este motivo, a identificação taxonômica dos isolados sugeridas neste estudo, assim como, a descrição de novas espécies e novos gêneros necessitam de mais análises além das ferramentas moleculares. Devem-se incluir análises morfológicas detalhadas do isolado tipo, sequenciamento do genoma completo, do transcriptoma e reprodução do ciclo biológico dos hospedeiros em laboratório. Somente uma análise com estes resultados integrados será capaz de uma classificação definitiva desses isolados. Por exemplo, a identificação de um candidato a nova espécie de *Strigomonas* ilustra claramente a necessidade de análises morfológicas. A apomorfia do gênero é a presença do endossimbionte bacteriano (Teixeira *et al.* 2011) e portanto, a análise morfológica deverá confirmar a presença do simbiote, ou caso contrário, este isolado representaria um excelente modelo de estudo de endossimbiose nos tripanossomatídeos.

No entanto, com os resultados obtidos até o momento já é possível observar que os direcionamentos das investigações podem ter sido determinantes para a grande ocorrência de espécies do gênero *Crithidia* nas ordens Diptera e Hemiptera (Maslov *et al.*, 2013; Borghesan *et al.*, 2013; Flegontov *et al.*, 2016; Kaufer *et al.*, 2017). Um exemplo disso é a grande diversidade de novos tripanossomatídeos vistos neste estudo em um grupo pouco conhecido e

pobremamente relatado na literatura. Em uma análise realizada em um pequeno número amostral da ordem Lepidoptera foi possível detectar um candidato a gênero novo, a existência de seis novas OTUs, além da presença de três espécies já descritas de *Crithidia* (*C. mellifica*, *C. thermophila* e *C. insperata*), as quais até então não eram reportadas como parasitos de borboletas.

A presença de tripanossomatídeos em abelhas é registrada desde 1912 (Fanthan & Porter, 1912) sendo documentados globalmente (Wallace, 1966; Langridge, 1966). Nos últimos anos, estes protozoários ganharam maior atenção da comunidade científica após estudos demonstrarem os efeitos negativos destes parasitos sobre abelhas e mamangavas (Schwarz & Evans, 2013; Brown *et al.* 2003; Gegear *et al.* 2005). Alguns estudos associam a presença de *Crithidia mellifica* (Langridge & McGhee, 1967) como uma possível causa para o declínio de populações de abelhas nos Estados Unidos (Cornman *et al.* 2012; Ravoet *et al.* 2013). O fato de *C. mellifica* ser considerado um parasito específico de abelhas e ser encontrado em borboletas é uma das evidências que refutam o paradigma de um hospedeiro específico.

Devido ao seu ciclo de vida, os tripanossomatídeos monoxênicos dependem da capacidade de seu hospedeiro infectado transmití-los para outros hospedeiros, sendo estas oportunidades providenciadas pela história de vida do hospedeiro como coprofagia e necrofagia (Lukes *et al.* 2018). É importante ressaltar que as abelhas e borboletas ocupam habitats similares e desempenham a função de polinizadoras. Estas características permitem que estes insetos consumam os mesmos recursos. Por este motivo é possível supor que estes insetos infectados são potencialmente capazes de expandir a distribuição e compartilhar seus parasitos ao forragearem em diferentes flores.

Os resultados apresentados aqui indicam que ainda há uma grande diversidade nominal de tripanossomatídeos a ser descritas e interações ecológicas entre esses parasitos e seus hospedeiros que merecem ser elucidadas.

VI. Conclusão:

- ✓ Nenhum dos dois alvos analisados possibilita por si só que uma revisão taxonômica de *Leishmania* seja proposta, algo que só poderá ser realizado através de uma abordagem integrativa. No entanto, as sequências concatenadas dos genes permitem a classificação de complexos, subgêneros e a inferência filogenética entre os grupos do gênero.

- ✓ Nossos resultados corroboram com a definição das duas infrafamílias dentro da subfamília Leishmaniinae uma vez que as nossas análises não demonstraram proximidades filogenéticas entre os gêneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Lotmaria* e os outros gêneros pertencentes a subfamília Leishmaniinae,

- ✓ As análises de isolados de Lepidoptera a partir das sequências parciais dos genes gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA mostram que o uso desses alvos auxiliam na identificação taxonômica de tripanossomatídeos e permitiram constatar um candidato a gênero novo, seis novas OTUs e a presença de três espécies já descritas de *Crithidia* (*C. mellificae*, *C. thermophila* e *C. insperata*), as quais até então não eram reportadas como parasitos de borboletas.

VII. Referências Bibliográficas:

- Adler S.** 1964. *Leishmania*. Adv Parasitol. 2: 35–96.
- Aguiar AP**, Santos BF, Couri MS, Rafael JA, Costa CI de S, Duarte M, Grazi J, Schwertnez CF, Freitas AVL & Azevedo CO. 2009. Insecta. In: Rocha, R.M. & Boeger, W.A. Estado da Arte e Perspectivas para a Zoologia no Brasil [State of Art and perspectives to the Zoology in Brazil]. Editora UFPR, Curitiba, pp.131–155.
- Akhoundi M**, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. 2016. A historical overview of the classification, evolution and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. Plos Negl. Trop. Dis. 10 (3): e00004349.
- Aldecoa-Otalora E**, Langdon W, Cunningham P, Arno MJ. 2009. Unexpected presence of mycoplasma probes on human microarrays. Biotechniques 47(6):1013-5.
- Asato Y**, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, Mimori T, Gomez EAL, Hashiguchi Y, Uezato H. 2008. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. Experimental Parasitology 121 (2009) 352–361.
- Ashford RW.** 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology 30:1269-1281.
- Baker JR**, 1995. The subspecific taxonomy of *Trypanosoma brucei*. Parasite 2: 3-12
- Barratt J**, Kaufer A, Peters B, Craig D, Lawrence A, Roberts T, Lee R, McAuliffe G, Stark D, Ellis J. 2017. Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixerous Parasitism in the Leishmaniinae. PLoS Negl Trop Dis 11(1): e0005215.
- Benard G**, Rossignol R. 2008. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. Antioxid. Redox signal. 10: 1313-42.
- Berman JD.** 1996. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. Clinical Dermatology. 14: 519-522.
- Bensoussan E**, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 44(4):1435-9.
- Borghesan TC**, Ferreira RC, Takata CSA, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MMG, Camargo EP. 2013. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. Protist, 164:129-152.
- BLAST.** [Acesso em 23 de setembro de 2019]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- Brandao AA**, Miranda A, Degraive WM, Sousa MA. 2000. The heterogeneity of choanomastigotes trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. Parasitol Res. 86:809-812.
- Bray RS.** 1974. *Leishmania*. Annual Review of Microbiology. (28): 189–217.
- Brewster S**, Barker DC. 1999. The ATPase subunit 6 gene sequence predicts that RNA editing is conserved between lizard- and human-infecting *Leishmania* gene. 235(1-2):77-84.

- Brown MK**, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. 2003. Strong context-dependent virulence in a host–parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *Journal of Animal Ecology*.72, 994–1002.
- Camargo EP**, Sbravate C, Teixeira MMG, Uliana SRB, Soares MBM, Affonso HT, Floeter-Winter LM. 1992. Ribo-somal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of trypanosomatids. *J Parasitol* 78:40–48.
- Camargo EP**. 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 42: 29-112.
- Cardiff RD**; Ward JM; Barthold SW. 2008. One medicine-one pathology: are veterinary and human pathology prepared? *Preventive Veterinary Medicine*. 101: 148-156.
- Carlos M**; Ignatti C; Rosa M. 2015. Leishmaniose tegumentar americana: incidência no Vale do Ribeira/São Paulo, Brasil. *Revista Recien – Revista Científica de Enfermagem*. 5 (15): 3-10.
- Chagas, C**. 1909. Nova tripanosomiase humana. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1(3): 159-218.
- Convit J**, Kerdel-Vegas F. 1965. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis; Inoculation to Laboratory Animals, Electron Microscopy and Fluorescent Antibodies Studies. *Archives of Dermatology*. 91:439-447.
- Cornman RS**, Tarpay DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopes D, Pettis JS, Vanengelsdorp D, Evans JD. 2012. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE* 7(8): e43562.
- Costa JM**, Saldanha AC, de Melo e Silva AC, Serra Neto A, Galvão CE, Pedroso e Silva C de M, da Silva AR.1992. The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 25: 115-123.
- Croan D.**, Ellis J. 1996. Phylogenetic relationships between *Leishmania*, *Viannia* and *Sauroleishmania* inferred from comparison of a variable domain within the RNA polymerase II largest subunit gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 79: 97–102.
- Croan DG**, Morrison DA, Ellis JT. 1997. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol* 89: 149-159
- Cupolillo E**, Grimaldi G Jr, Momen H. 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 50: 250–311.
- Cupolillo E**, Momen H. 2000. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(4):583-588.
- Da Graça**. 2016. Análise de alvos moleculares quanto ao potencial de uso como “DNA Barcode” para identificação de espécies de *Leishmania*. [Tese, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular]. Arca Repositório Institucional da Fiocruz.
- Da Silva LA**, de Sousa CS, da Graça GC, Porrozzzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2010; 10(1): 77-83.
- Da Silva RV**, Malvezi AD, Augusto Lda S, Kian D, Tatakihara VL, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Rizzo LV, Schenkman S, Pinge-Filho P. 2013. Oral exposure to *Phytomonas serpens* attenuates thrombocytopenia and leukopenia during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 8:e68299.

- Darriba D**, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 30:772.
- Daugaard M**, Rohde M, Jaattela M. 2007. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett*. 581:3702–3710.
- Dávila AMR**, Momem H. 2000. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Journal Annals of Tropica Medicine & Parasitology*. 94 (6): 651-654
- d'Avila-Levy CM**, Melo ACN, Vermelho AB, Branquinha MH. 2001. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. *FEMS microbiology letters*. 202: 73-77.
- d'Avila-Levy CM**, Araújo FM, Vermelho AB, Branquinha MH, Alviano CS, Soares RM, dos Santos AL. 2004. Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. *FEMS Microbiol Lett*. 231:171-176.
- d'Avila-Levy CM**, Boucinha C, Kostygov A, Santos HLC, Morelli KA, Grybchuk-Ieremenko A, Duval L, Votýpka J, Yurchenko V, Grellier P, Lukeš J. 2015. Exploring environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110:956–965.
- d'Avila-Levy CM**, YurchenkoV, Votýpka J, Grellier P. 2016. Protist collections: Essentiality for future research. *Trends Parasitol*. 32(11): 840-842.
- De Jesus AR**, Cooper R, Espinosa M, Gomes JE, Garcia E, Paul S, Cross GA. 1993. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J cell sci*. 106 (pt 4): 1023–1033.
- De Saldanha RR**, Martins-Papa MC, Sampaio RN, Muniz Junqueira MI. 2012. Meglumineantimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. *Transactions and Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 06: 596-603.
- Deschamps P**, Lara E, Marande W, Lopez-Garcia P, Ekelund F, Moreira D. 2011. Phylogenomic analyses of Kinetoplastids supports that tripanosomatids arose from within bodonids. *Mol Biol Evol*. 28(1): 53-58.
- De Souza W**, Attias M, Rodrigues JCF. 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 41(10): 2069–2080.
- Disch J**, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, Rabello A. 2005. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51(3):185-190.
- Dortay H**, Mueller-Roeber B. 2010. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. *Microb Cell Fact*. 10: 9-29.
- Donovan C**. 1909. Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorrhinus*). *Lancet*. 177:1495-1496.
- Drini S**, Criscuolo A, Lechat P, Imamura H, Skalicky T, Rachidi N, *et al*. 2016. Species- and strain-specific adaptation of the HSP70 super family in pathogenic trypanosomatids. *Genome Biol Evol*. 8(6):1980–1995.
- Espinosa OA**, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MM, Shaw JJ. 2016. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*. 145: 430–442.

- Fanthan HB & Porter A.** 1912. Note on certain protozoa found in bees. *Suppl. J. Board Agricul*, v. 19, p. 138.
- Felsenstein J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- Fermino VR**, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, Botero-Arias R, Takata CSA, Campaner M, Hamilton PB, Camargo EP, Teixeira MMG. 2013. 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. *Parasits and Vectors* 6: 613-626.
- Fernandes O**, Teixeira MMG, Sturm NR, Sousa MA, Camargo EP, Degraive WM, Campbell DA. 1997. Miniexon gene sequences define six groups within the genus *Crithidia*. *J. Eukaryot. Microbiol.*44:535– 539.
- Ferreira RC**, de-Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CSA, Barrett TV, Shaw JJ, Teixeira MMG. 2008. 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* 55:427–435.
- Flegontov P**, Votýpka J, Skalický T, Logacheva MD, Penin AA, Tanifuji G, Onodera NT, Kondrashov AS, Volf P, Archibald JM, Lukeš J. 2013. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol.* 23:1787-1793.
- Flegontov P**, Butenko A, Firsov S, Kraeva N, Eliáš M, Field CM, Filatov D, Flegontova O, Gerasimov SE, Hlaváčová J, Ishemgulova A, Jackson PA, Kelly S, Kostygov YA, Logacheva DM, Maslov AD, Opperdoes RF, O'Reilly A, Sádlová J, Ševčíková T, Venkatesh D, Vlček C, Volf P, Votýpka J, Záhonová K, Yurchenko V & Lukeš J. 2016. Genome of *Leptomonas pyrrocoris*: a high-quality reference for monoxenous trypanosomatids and new insights into evolution of *Leishmania*. *Nature Scientific Reports.* 6:1-12
- Fraga J**, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 10(2):238-245.
- Franco MA**, Grimaldi G. 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a Unique Parasite Infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(2): 261-268.
- Garcia L**, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, Dujardin JC. 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2294–2297.
- Garcia AL**, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. 2005. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol.* 5(2):109-116.
- Garcia AL**, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin JC. 2007. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101(12):1208-1213.
- Gegear RJ.** 2005. Multicomponent floral signals elicit selective foraging in bumblebees. *Naturwissenschaften* 92: 269.
- Gibbs EPJ.** 2014. The Evolution of one health: a decade of progress and challenges for the future. *Veterinary record*, 174: 85-91.
- Gontijo B**, De Carvalho ML. 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 36: 71-80.

Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, et al. 2012. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(5):664–674.

Grimaldi D, Engels MS. 2005. *Evolution of Insects.* Cambridge University Press. Cambridge. pp. 1-8.

Guindon S. & Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* Oct;52(5):696- 704.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium,* 41: 95-98.

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

Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. 2005. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int. J. Parasitol.* 35: 431–443.

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

Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. 1998. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *J Mol Evol.* 47:728-738.

Hendricks LD, Wood DE, Hajduck ME. 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76:309-316.

Hernández R, Rios P, Valdés AM, Pinero D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 41 (2): 207-212.

Hide M, Bañuls AL. 2008. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(2):105-6.

Hoare, CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. 1964. Revision of the systematics. *J. Protozool,* 11:200-7.

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

Hollar L, Lukeš J, Maslov DA. 1998. Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *J Eukaryot Microbiol* 45: 293-297.

ICMBio. [Acesso em 25 de fevereiro de 2019]. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br>.

Ishemgulova A, Butenko A, Kortišová L, Boucinha C, Grybchuk-Ieremenko A, Morelli K, Tesařová M, Kraeva N, Grybchuk D, Pánek T, Flegontov P, Lukeš J, Votýpka J, Yurchenko V. 2017. Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. *PLoS ONE* 12(3): e0174165.

Jackson AP, Quail MA, Berriman M. 2008. Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: *Bodo saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC Genomics.* 9: 594.

- Jirků M**, Yurchenko VY, Lukeš J, Maslov DA. 2012. New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the Trypanosomatidae. *J Eukaryot Microbiol.* 59: 537–547.
- Kamhawi S**. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology* 22 (9): 439-445.
- Karagiannis-Voules DA**, Scholte RGC, Guimarães LH, Utzinger J, Vounatsou P. 2013. Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 7(5): e2213.
- Katoh K**, Rozewicki J, Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. (Briefings in Bioinformatics, in press).
- Kaufer A**, Ellis J, Stark D, Barratt J. 2017. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors.* 8; 10 (1):287.
- Kaufer A**, Barratt J, Stark D, Ellis J. 2019. The complete coding region of the maxicircle as a superior phylogenetic marker for exploring evolutionary relationships between members of the Leishmaniinae. *Infection, Genetics and Evolution.* 70: 90-100.
- Kent WS**. 1880–1881. A manual of the Infusoria, Vol. 1–3. David Bogue, London.
- Kimura M**. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16:111-120.
- Kostygov AY**, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V. 2014. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist.* 165: 594–604.
- Kostygov AY**, Dobáková E, Grybchuk-Ieremenko A, Váhala D, Maslov DA, Votýpka J, Lukeš J, Yurchenko V. 2016. Novel Trypanosomatid-Bacterium Association: Evolution of Endosymbiosis in Action. *MBio.* 7: e01985
- Kostygov AY**, Yurchenko V. 2017. Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae). *Folia Parasitologica.* 64: 020.
- Kraeva N**, Butenko A, Hlaváčová J, Kostygov A, Myšková J, Grybchuk D, Leštinová T, Votýpka J, Volf P, Opperdoes F, Flegontov P, Lukeš J, Yurchenko V. 2015. *Leptomonas seymouri*: Adaptations to the Dixerous Life Cycle Analyzed by Genome Sequencing, Transcriptome Profiling and Co-infection with *Leishmania donovani*. *PLoS Pathog.* 11: e1005127.
- Kuhls K**, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect* 7(11-12):1224-34.
- Kuhls K**, Cupolillo E, Silva S, Schweynoch C, Boité M, Mello M, Mauricio I, Miles M, Wirth T, Schönian G. 2013. Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (Viannia). *PLOS Neglected Tropical Diseases:* e2490.
- Lachaud L**, Marchegui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40(1):210-215.
- Lainson R**, Ready PD, Shaw JJ. 1979. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc London.* 206: 307–318.

- Lainson R**, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W, Killick-Kendrick R. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 12-120.
- Langdon WB**. 2014. Mycoplasma contamination in the 1000 Genomes Project. *BioData Min* 29;7:3
- Langridge D. F.**, McGhee R. 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. an Acidophilic Trypanosomatid of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Eukaryotic Microbiology* 14(3):485-487.
- Lanotte G**, Rioux JA, Maazoun R, Pasteur N, Pratlong F, Lepart J. 1981. The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903. The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance. *Ann Parasitol Hum Comp.* 56: 575–591.
- Laurence M**, Hatzis C, Brash DE. 2014. Common Contaminants in Next-Generation Sequencing That Hinder Discovery of Low-Abundance Microbes. *PLoS ONE* 9(5): e97876.
- Le Blanq SM**, Belehu A, Peters W. 1986. *Leishmania* in the Old world: 3 the distribution of *L. aethiopica* zymodemes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 80: 360–366.
- Léger L**. 1902. Sur un flagelle parasite de *Anopheles maculipennis*. *Compte Rendu des Seances de la Societe de Biologie*, liv 354-356.
- Lima L**, Ortiz PA, da Silva FM, Alves JM, Serrano MG, Cortez AP, Alfieri SC, Buck GA, Teixeira MM. 2012. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. *PLoS One.* 7:383-385.
- Lom J**. 1976. Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco, p. 269-337.
- Lopes AH**, Costa e Silva Filho F, Alviano CS, Jurkiewicz A, Angluster J, de Souza W. 1989. Changes in cell surface anionogenic groups induced by propranolol in *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J protozool.* 36: 231-7.
- Lukeš J**, Jirků M, Doležel D, Králová I, Hollar L, Maslov DA. 1997. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *J Mol Evol* 44: 521-527.
- Lukes J**, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT. 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell.* 1:495-502.
- Lukes J**, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 29;104(22):9375-80.
- Lukeš J**, Skalický T, Týč J, Votýpka J, Yurchenko V. 2014. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol.* 195:115-122.
- Lumsden WH**. 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (68): 74–75.
- Luyo-Acero GE**, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, Gomez-Landires E, Hashiguchi Y, Nonaka S. 2004. Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 128: 483-491.

- Maurício IL**, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16(5):188-9.
- Machado CA**, Ayala FJ. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *PNAS*, 98 (13): 7396–7401.
- Machado-Silva A**, Guimarães PPG, Tavares CAP, Sinisterra RD. 2015. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. *Expert opinion on therapeutic patents* 25(3): 247-260.
- Maia da Silva F**, Noyes H, Campaner M, Junqueira AC, Coura JR, Añez N, Shaw JJ, Stevens JR, Teixeira MMG. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS1 ribosomal sequences. *Parasitology* 129: 549–561.
- Malone LA**, Wigley PJ, Dhana SD, 1985. A flagellate protozoan from *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *New Zealand Journal of Zoology* 12: 155.
- Marcili A**, Sperança M, da Costa A, Madeira M, Soares H, Sanches C, Acosta I, Giroto A, Minervino A, Horta M, Shaw J, Gennari S. 2014. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetic and Evolution* 25: 44-51.
- Martins CB**. 2016. Identificação molecular de Tripanossomatídeos da coleção de protozoários da Fiocruz (Fiocruz-Colprot) [Dissertação, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular]. Arca Repositório Institucional da Fiocruz.
- Marzochi MC**. 1992. Leishmaniose no Brasil. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 63(82):104.
- Maslov DA**, Lukeš L, Jirků M, Simpson L. 1996. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 75: 197-205.
- Maslov DA**, Yurchenko VY, Jirků M, Lukeš J. 2010. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol*. 57:177-188.
- Maslov DA**, Votýpka J, Yurchenko V, Lukeš J. 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol*. 29:43-52.
- Maurício IL**, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. 2007. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. *Int J Parasitol*, 37(5): 565-76.
- McGhee R**, Cosgrove WB. 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev* 44: 140-173.
- Merzlyak E**, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev S, Maslov DA. 2001. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Eukaryot Micro-biol* 48:161–169.
- Mesnil F.**, Brimont E. 1908: Sur un hématozoaire nouveau (*Endotrypanum* n. gen.) d'un édenté de la Guyane C.R. Séances Soc. Biol. Ses. Fil. 65: 581–583.
- Miles MA**, Arias JR, Valente SA, Naiff RD, de Souza AA, Povoá MM, Lima JA, Cedillos RA. 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 32(6):1251-9.

- Momen H.** 2001. Some current problems in the systematics of trypanosomatids. *Int j parasitol.* 31: 640-2.
- Moreno G,** Rioux JA, Lanotte G, Pratlong F, Serres E. 1986. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numerique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. In: Rioux JA, editor. *Leishmania: Taxonomic et Phylogenese. Application Éco-epidemiologiques* (Colloque International du CNRS/INSERM, 1984). IMEE, Montpellier. 105–117.
- Moreira D,** López-García P, Vickerman K. 2004. 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.* 54:1861-75.
- Moreira C;** Segundo AS; Carvalhosa AA; Estevamc LS; Pereira AS; Aguilar AM. 2016. Comportamento Geoespacial da Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Tangará da Serra – MT. *J. Health Sci, Londrina.* 18 (3): 171-176.
- Motta MCM.** Endosymbiosis in trypanosomatids as a model to study cell evolution. 2010. *Open parasitol* 4:139–147.
- Musa AM,** Khalil EAG, Mahgoub FAE, Elgawi SHH, Modabber F, Elkaduru, AEMY, Elhassan AM. 2008. Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 102 (1): 58-63.
- Myers N,** Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 403: 853–858.
- Nei M, Kumar S.** 2000. *Molecular evolution and phylogenetics.* Oxford: Oxford University Press.
- Noyes H,** Arana B, Chance M, Maingon R. 1997. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) Complex and the Lizard *Leishmania*: Their Classification and Evidence for a Neotropical Origin of the *Leishmania-Endotrypanum* Clade. *Eukariotic Microbiology* 44 (5): 511-517.
- Pace NR.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 234-240.
- Pacchioni RG,** Carvalho FM, Thompson CE, Faustino ALF, Nicolini F, Pereira TS, Silva RCB, Cantão ME, Gerber A, Vasconcelos ATR, Agnez-Lima LF. 2014. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. *Microbiology* 3(3): 299–315.
- Page AM,** Canning EU, Barker RJ, Nicholas JP. 1986. A new species of *Rhynchoidomonas Patton*, 1910 (Kinetoplastida: Trypanosomatina) from *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae). *Syst Parasitol* 8: 101.
- Pamilo P;** Nei M. 1988. Relationships between Gene Trees and Species Trees. *Molecular Biology and Evolution,* 5: 568-583.
- Paranaíba L,** Pinheiro L, Torrecilhas A, Macedo D, Menezes-Neto A, Tafuri W e Soares R. 2017. *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay. *PLoS Pathog* 13(5): e1006303.
- Pawlowski J,** Audic S, Adl S, Bass D, Belbahri L, Berney C, Bowser S, Cepicka I, Decelle J, Dunthorn M, Fiore-Donno AM, Gile GH, Holzmann M, Jahn R, Jirku° M, Keeling PJ, Kostka M, Kudryavtsev A, Lara E, Lukes J, Mann DG, Mitchell EAD, Nitsche F, Romeralo M, Saunders GW, Simpson AGB, Smirnov AV, Spouge JL, Stern RF, Stoeck T, Zimmermann J, Schindel D, Vargas C. 2012. CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biol.* 10:11.

- Pereira, SMS.** 2019. Elaboração de protocolos para padronização e sistematização dos procedimentos para recebimento de depósito de novas amostras na coleção de Protozoários da FIOCRUZ. [Dissertação, programa de Pós-Graduação em Formação Técnica para pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho]. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Pesant S,** Not F, Picheral M, Kandels-Lewis S, Le Bescot N, Gorsky G, Iudicone D, Karsenti E, Speich S, Troublé R, Dimier C, Searson S, Coordinators TO. 2015. Open science resources for the discovery and analysis of *Tara* Oceans data. *Nature* 2:150023.
- Pimenta PF,** Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115(4): 359-369.
- Pinge-Filho P,** Peron JP, de Moura TR, Menolli RA, Graça VK, Estevão D, Tadokoro CE, Jankevicius JV, Rizzo LV. 2005. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol Lett.* 96:283-90.
- Podlipaev S.** 2001. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int J Parasitol.* 31:648-652.
- Podlipaev S,** Sturm N, Fiala I, Fernandes O, Westenberger S, Dollet M, Campbell D, Luke's J. 2004. Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and Intergenic Regions. *Eukaryotic Microbiology* 51(3): 283-290.
- Poinar Jr GO,** Poinar R. Evidence of vector-borne disease of Early Cretaceous reptiles. 2004. *Vector-Borne Zoonotic Dis,* 4: 281-284.
- Posada D.** 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol;* 23:1253-1256.
- Pothirat T,** Tantiworawit A, Chaiwarith R, Jariyapan N, Wannasan A, Siriyasatien P, Supparatpinyo K, Bates MD, Kwakye-Nuako G, Bates PA. 2014. 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.* 8(12):e3339.
- Poulin R.** 2014. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *Int J Parasitol.* 44 (9): 581-589.
- Pratt DM,** David JR. 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* (291): 581-583.
- Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro.** [Acesso em 25 de fevereiro de 2019]. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/>
- Puillandre N,** Lambert A, Brouillet S, Achaz G. 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol.* 21(8):1864-77.
- Ravoet J,** Schwarz RS, Descamps T, Yañez O, Tozkard CO, Martin-Hernandez R, Bartolomé C, Smeta L, Higes M, Wenseleers T, Schmid-Hempel R, Neumann P, Kadowak T, Evans J, Graaf DC. 2015. Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *Journal of invertebrate pathology.* 130: 21-27.
- Reveiz L,** Maia-Elkhoury AN, Nicholls RS, Romero GA, Yadon ZE. 2013. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis a systematic review update. *PLoS One.* 29(8).
- Runckel C,** DeRisi J., Flenniken M L. 2014. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae*. *PLoS ONE,* 9: e95057.

Rodrigues JCF, Godinho JLP, de Souza W. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In: Robin Harris (Series Editor) *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma: Subcellular Biochemistry*. Springer, 2014. 1:1-42.

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

Ross, R. 1903. (1) Note on the bodies recently described by *Leishmania* and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *Br Med J*: 1261–1262.

Runckel C, DeRisi J., Flenniken M L. 2014. A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae*. *PLoS ONE*, 9: e95057.

Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. 1989. *Experimental Parasitology* 69: 100-103.

Sacks DL. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. 2001. *Cell Microbiology* 3:189-196.

Safjanova VM. 1982. Classification of the genus *Leishmania* Ross. In: The Leishmanias Protozoology. Leningrad: Academy of Sciences; All Union Society of Protozoologists. 95-101.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4:406-425.

Santos MAC. 2004. Filogenia e Revisão Taxonômica de tripanossomatídeos com formas coanomastigotas [Tese, pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas]. Universidade de São Paulo.

Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. 2006. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78(4): 687-714.

Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA & Moreira ME. 2005. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp. metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology* 110:39-47.

Schmid-Hempel R, Tognazzo M. 2010. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *J. Eukaryot. Microbiol*. 57:337-345.

Schmid-Hempel P, Näpflin K. 2017. Host effects on microbiota community assembly. *J. Anim. Ecol*. 1-10.

Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47(1):349-358.

Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology* 26 (10):466-469.

Schwarz RS & Evans JD. 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology*, 40(3-4), 300– 310.

- Schwarz RS**, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, Graaf DC, Evans JD. 2015. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, 1967 and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *J Eukaryot Microbiol.* 62:567-583.
- Shaw JJ**. 1964. A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the Sloth *Choloepus Hoffmanni* in Panama. *Nature.* 201:417-418.
- Shaw JJ**. 1997. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Brazilian Journal of Genetics* (20): 123–128.
- Simpson L**. 1972. The kinetoplast of the haemoflagellates. *Int. Rev. Cytol.* 32:139- 207.
- Simpson AGB**, Stevens JR, Lukeš J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22:168-174.
- Sogin ML**, Silberman JD. 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol.* 28(1):11-20.
- Sousa, M.A.**, Corte-Real, S., 1991. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deani* Carvalho, 1973. Proposal of a new genus. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 33, S8.
- Stuart K**, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118:1301-1310.
- Stevens JR**. 2008. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite.* 15:226-232.
- Svobodová M**, Zídková L, Cepicka I, Oborník M, Lukes J, Votýpka J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57: 423–432.
- Tamura K**, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731-2739.
- Texeira MMG**, Campaner M, Camargo EP. 1995. Characterization of the target antigens of Phytomonas specific monoclonal antibodies. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42: 232-237.
- Teixeira MM**, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. 2011. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. *Protist.* 162:503-524.
- Thomaz-Soccol V**, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. 1993. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp.* 68: 107–108.
- Thompson JD**, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Van der Auwera G**, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, Van Gompel A, Clerinx J, Dujardin JC. 2013. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill* 18(30):20543.

- Van Eys GJ**, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51:133–142.
- Vargas-Parada L**. 2010. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Nature Education* 3(9):63.
- Vavilova VY**, Konopatskaia I, Luzyanin SL, Woyciechowski M, Blinov AG. 2017. Parasites of the genus *Nosema*, *Crithidia* and *Lotmaria* in the honeybee and bumblebee populations: a case study in India. *Journal of Genetics and Breeding* 21(8):943-951.
- Velasco J**. 2008. Species concept should not conflict with evolutionary history, but often do. *Studies in the History and Philosophy of Biology and Biomedical Sciences*, 39: 407-414.
- Velasco J**. 2013. Phylogeny as population history. *Philosophy and Theory in Biology*, 5: 1-18.
- Vickerman K**. 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, WHR. & Evans, D. A. (ed.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London. p. 1–34.
- Vickerman K**, Tetley L. 1990. Flagellar surfaces of parasitic protozoa and their role in attachment. Ciliary and flagellar membranes. 267-304.
- Vickerman K**. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol* 24: 1317-1331.
- Viola LB**, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG. 2009. 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* 56:594–602.
- Votýpka J**, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, Lukeš J, Yurchenko V 2013. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist* 164: 763-781.
- Votýpka J**, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesařová M, Grybchuk D, Lukeš J, Yurchenko V. 2014. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist*. 165:825-838.
- Votýpka J**, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov D, Lukeš J, Yurchenko V. 2015. Systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re-) description. *Trends Parasitol*, 31:460-469.
- Wallace FG & Dyer MI**. 1960. The cultivation of *Blastocrithidia leptocoridis*. *J parasitol* 46 (5): 43-44.
- Wallace FG**. 1966. The Trypanosomatid Parasites of Insects and Arachnids. *Exp Parasitol*. 18:124-193.
- Wallace FG**. 1977. *Leptomonas seymouri* sp. n. from the cotton stainer *Dysdercus suturellus*. *The Journal of Protozoology*, 24:483–484.
- Wallace FG**. 1979. Biology of the kinetoplastida of arthropods. In “Biology of the Kinetoplastida” (WHR. Lumsden and DA. Evans, eds.), Vol. 2, pp. 213-240. Academic Press, New York.
- Wallace FG**, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I. 1983. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *J. Protozool.* 30:308-313.
- Watson J**, Evans T, Venter O, Williams B, Tulloch A, Stewart C, Thompson I, Ray J, Kris Murray K, Salazar A, McAlpine C, Potapov P, Walston J, Robinson J, Painter M, Wilkie D, Filardi C, Laurance W, Houghton R,

- Maxwell S, Grantham H, Samper C, Wang S, Laestadius L, Runting R, Silva-Chávez G, Ervin J, Lindenmayer D. 2018. The exceptional value of intact forest ecosystems. *Nature Ecology & Evolution* 599–610.
- Westenberger SJ**, Sturm NR, Yanega D, Podlipaev SA, Zeledón R, Campbell DA, Maslov DA. 2004. Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology*. 129: 537–547.
- Westenberger SJ**, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. 2005. Two Hybridization Events Define the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527–543.
- Wheeler RJ**, Gluenz E, Gull K. 2013. The limits on trypanosomatid morphological diversity. *Plos one*. 8(11): 1-18.
- World Health Organization**. 2010. Control of Leishmaniasis: report of the meeting of the WHO Expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: 949.
- Yang B**, Wang Y, Qian PY. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17:135.
- Yoshida ELA**, Silva RL, Cortez LS, Corrêa FMA. 1979. Encontro de espécie do gênero *Leishmania* em *Didelphis marsupialis aurita* no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop SP*, 21:110-113.
- Yoshida ELA**, Cuba Cuba CA, Pacheco RS, Cupolillo E, Tavares CC, Machado GMC, Momen H, Grimaldi Jr. 1993. Description of *Leishmania (Leishmania) forattinii* sp. n., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 397-406.
- Young DG**, Duncan MA. 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Inst Entomol* 54, Associate Publishers, Gainesville. pp 881.
- Yurchenko VY**, Kolesnikov AA, Lukeš J. 2000. Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. *Folia Parasitol* 47: 1-5.
- Yurchenko VY**, Lukeš J, Jirků M, Zeledón R, Maslov DA. 2006. *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology*. 133:537-546.
- Yurchenko VY**, Lukeš J, Tesárová M, Jirků M, Maslov DA. 2008. Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. *Protist*. 159:99-114.
- Yurchenko VY**, Lukeš J, Jirků M, Maslov DA. 2009. 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.* 59: 893–909.
- Yurchenko VY**, Votýpka J, Tesařová M, Klepetková H, Kraeva N, Jirků M, Lukeš J. 2014. Ultrastructure and molecular phylogeny of four new species of monoxenous trypanosomatids from flies (Diptera: Brachycera) with redefinition of the genus *Wallaceina*. *Folia Parasitol (Praha)*. 61:97-112.
- Yurchenko VY**, Kostygov A, Havlová J, Grybchuk-Ieremenko A, Sevcikova T, Lukes J, Sevcik J, Votýpka J. 2016. Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. *Journal of Eukaryotic Microbiolog.* 63: 198–209.
- Zwickl D & Hillis D**. 2002. Increased Taxon Sampling Greatly Reduces Phylogenetic Error. *Systematic Biology* 51(4): 588-598.

VIII. Anexos:

Anexo I. Tabela do número de acesso das sequências retiradas do banco de dados *Genbank* para os genes gGAPDH e V7V8 SSUrRNA.

Identificação do Tripanossomatídeo	Número de acesso	
	gGAPDH	V7V8 SSUrRNA
<i>Leptomonas</i>		
<i>Leptomonas tarcoles</i>	EF546787	EF546786
<i>Leptomonas spiculata</i>	JF717833	JF717838
<i>Leptomonas acus</i>	DQ910926	DQ910923
<i>Leptomonas seymouri</i>	KP717896	KP717894
<i>Leptomonas neopamerae</i>	DQ910927	DQ910924
<i>Leptomonas jaderae</i>	EU076603	EU079123
<i>Leptomonas podlipaev</i>	EU076604	EU079124
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>	JN036651	–
<i>Leptomonas scantii</i>	–	JN036654
<i>Leptomonas tenua</i>	–	KF054114
<i>Crithidia</i>		
<i>Crithidia otongatchiensis</i>	KF482058	–
<i>Crithidia brachyflagelli</i>	JF717835	–
<i>Crithidia fasciculata</i>	AF047493	–
<i>Crithidia insperata</i>	EU076605	EU079125
<i>Crithidia thermophila</i>	KY264932	KY264937
<i>Crithidia brevicula</i>	KJ443343	–
<i>Crithidia abscondita</i>	EU076606	EU079126
<i>Crithidia mellificae</i>	KJ713357	KJ713379
<i>Crithidia expoeki</i>	GU321193	GU321195
<i>Crithidia bombi</i>	GU321192	GU321194
<i>Lotmaria</i>		
<i>Lotmaria passim</i>	KJ713353	KJ713371
<i>Borovskya</i>		

<i>Borovskya barvae</i>	FJ968529	FJ968532
Zelonia		
<i>Zelonia australiensis</i>	KY273493	KY273498
<i>Zelonia costaricensis</i>	DQ383650	DQ383648
Novymonas		
<i>Novymonas esmeraldas</i>	KT944300	KT944308
Leishmania		
<i>Leishmania guyanensis</i>	–	KF302743
<i>Leishmania enriettii</i>	KX790725	KF041798
<i>Leishmania lainsoni</i>	KP197180	–
<i>Leishmania naiffi</i>	KX790730	–
<i>Leishmania adleri</i>	KX790727	M80291
<i>Leishmania hoogstraali</i>	KX790729	–
<i>Leishmania gymnodactyli</i>	KX790728	KX790780
<i>Leishmania major</i>	AF047497	FJ263545
<i>Leishmania mexicana</i>	XM003877392	KF302741
<i>Leishmania aethiopica</i>	–	GQ920678
Endotrypanum		
<i>Endotrypanum schaudinni</i>	KX790715	KX790771
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	KX790716	–
<i>Endotrypanum herreri</i>	–	KX790765
Strigomonas		
<i>Strigomonas galati</i>	HM593018	HM593010
<i>Strigomonas oncopelti</i>	EU079134	AF038025
<i>Strigomonas culicis</i>	EU079137	HM503009
Angomonas		
<i>Angomonas desouzai</i>	MG682170	HM593016
<i>Angomonas deanei</i>	HM593022	HM593011
Phytomonas		
<i>Phytomonas nordicus</i>	KU659030	KT223609
<i>Phytomonas dolleti</i>	KX219748	KX219754
<i>Phytomonas serpens</i>	KU659028	KX219757
Herpetomonas		

<i>Herpetomonas modestus</i>	JQ359736	JQ359726
<i>Herpetomonas costoris</i>	JQ359738	JQ359728
<i>Herpetomonas mirabilis</i>	JQ359739	JQ359729
<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	JQ359743	JQ359716
Wallacemonas		
<i>Wallacemonas collosoma</i>	EU084898	AF153038
Blastocrithidia		
<i>Blastocrithidia largi</i>	FJ968528	FJ968531
Kentomonas		
<i>Kentomonas sorsogonicus</i>	KM242072	KM242075
Trypanosoma		
<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	AB362560	AF301912
<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa G	GQ140351	AF239981
Bodo		
<i>Bodo saltans</i>	EU084902	KX431511

Anexo II. Identificação dos isolados de Lepidoptera com base nas sequências disponíveis no banco de dados *Genbank* para os marcadores gGAPDH e V7/V8 SSUrRNA.

		gGAPDH (645 pb)		V7/V8 SSU rRNA (770 pb)	
Número de identificação do isolado	Número de acesso no <i>Genbank</i>	Espécie com maior identidade (identidade/cobertura)	Número de acesso no <i>Genbank</i>	Espécie com maior identidade (identidade/cobertura)	
LEIP 189	EU076605	<i>Crithidia insperata</i> (90,51/99)	MG845925	<i>Herpetomonas</i> sp. (91,92/84)	
LEIP 284	—	—	KM980185	<i>Crithidia bombi</i> (97,88/100)	
LEIP 290	EU076606	<i>Crithidia abscondita</i> (95,28/100)	—	—	
LEIP 549	—	—	KX901579	<i>Crithidia insperata</i> (98,26/100)	
LEIP 555	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (97,02/100)	—	—	
COLPROT 730	EU076605	<i>Crithidia insperata</i> (88,82/99)	KC205982	<i>Herpetomonas muscarum</i> (87,18/84)	
COLPROT 731	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (95,02/99)	Y00055	<i>Crithidia fasciculata</i> (93,19/100)	
COLPROT 732	—	—	KY264937	<i>Crithidia thermophila</i> (93,82/100)	
COLPROT 733	KJ713364	<i>Crithidia mellificae</i> (95,43/100)	KM980185	<i>Crithidia bombi</i> (97,38/100)	
COLPROT 734	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (94,59/99)	Y00055	<i>Crithidia fasciculata</i> (93,27/100)	
COLPROT 735	EU079134	<i>Strigomonas oncopelti</i> (88,65/99)	KC205982	<i>Herpetomonas muscarum</i> (85,93/84)	
COLPROT 736	—	—	Y00055	<i>Crithidia fasciculata</i> (93,51%)	

COLPROT 739	EU079134	<i>Strigomonas oncopelti</i> (88,83/99)	KC205982	<i>Herpetomonas muscarum</i> (85,12/84)
COLPROT 741	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (95,04/99)	KY264937	<i>Crithidia thermophila</i> (93,61/100)
COLPROT 742	HM593018	<i>Strigomonas galati</i> (94,54/100)	HM593009	<i>Strigomonas culicis</i> (92,57/100)
COLPROT 743	MH469963	<i>Crithidia mellifica</i> (99,58/100)	—	—
COLPROT 745	EU079135	<i>Strigomonas oncopelti</i> (89,82/99)	MG682168	<i>Angomonas deanei</i> (86,49/84)
COLPROT 747	EU076606	<i>Crithidia abscondita</i> (94,99/100)	—	—
COLPROT 748	EU076605	<i>Crithidia insperata</i> (89,07/99)	—	—
COLPROT 749	EU079134	<i>Strigomonas oncopelti</i> (89,16/99)	KC205982	<i>Herpetomonas muscarum</i> (85,01/84)
COLPROT 752	EU076605	<i>Crithidia insperata</i> (89,21/99)	KC205982	<i>Herpetomonas muscarum</i> (87,29/97)
COLPROT 753	—	—	MG845925	<i>Herpetomonas</i> sp. (92.53/85)
COLPROT 757	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (94,32/99)	KY264937	<i>Crithidia thermophila</i> (94,31/100)
COLPROT 758	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (94,21/99)	JN036654	<i>Leptomonas scantii</i> (93,39/100)
COLPROT 759	KY264935	<i>Crithidia thermophila</i> (94,57/99)	KY264937	<i>Crithidia thermophila</i> (94,32/100)
COLPROT 760	EU079135	<i>Strigomonas oncopelti</i> (89,48/100)	—	—
COLPROT 763	KJ713340	<i>Crithidia mellifica</i> (96,14/100)	KM980185	<i>Crithidia bombi</i> (98,13/100)
COLPROT 766	KJ713340	<i>Crithidia mellifica</i> (94,87/100)	KY264937	<i>Crithidia bombi</i> (94,49/100)

COLPROT 768	KJ713340	<i>Crithidia mellificae</i> (94,87/100)	KY264937	<i>Crithidia bombi</i> (94,49/100)
COLPROT 863	—	—	EU079125	<i>Crithidia insperata</i> (99,73/100)
COLPROT 864	MH469963	<i>Crithidia mellificae</i> (99,82/100)	—	—
COLPROT 865	—	—	KY264937	<i>Crithidia thermophila</i> (99,60/100)

Anexo III- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos analisados neste trabalho. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros (em CD).

Anexo IV- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Crithidia*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros

(a) V7/V8 SSU rRNA

KJ713379 <i>Crithidia mellifica</i>		0,009	0,014	0,014	0,015	0,006	0,013	0,014
GU321194 <i>Crithidia bombi</i>	0,013		0,009	0,011	0,012	0,006	0,011	0,011
JF717840 <i>Crithidia brachyflagelli</i>	0,053	0,013		0,006	0,016	0,006	0,018	0,017
KC205989 <i>Crithidia otongatchiensis</i>	0,057	0,019	0,011		0,015	0,009	0,017	0,017
EU079126 <i>Crithidia abscondita</i>	0,055	0,026	0,062	0,057		0,011	0,017	0,018
GU321195 <i>Crithidia expoeki</i>	0,006	0,006	0,006	0,013	0,019		0,009	0,009
KY264937 <i>Crithidia thermophila</i>	0,055	0,019	0,085	0,077	0,082	0,013		0,003
EU079125 <i>Crithidia insperata</i>	0,058	0,019	0,081	0,073	0,086	0,013	0,004	

(b) gGAPDH

KJ713357 <i>Crithidia mellifica</i>		0,010	0,009	0,009	0,010	0,009	0,009	0,008	0,010	0,011
GU321192 <i>Crithidia bombi</i>	0,064		0,009	0,011	0,011	0,011	0,012	0,011	0,011	0,013
GU321193 <i>Crithidia expoeki</i>	0,043	0,049		0,010	0,010	0,010	0,010	0,009	0,010	0,012
KY264932 <i>Crithidia thermophila</i>	0,053	0,072	0,058		0,009	0,008	0,007	0,009	0,009	0,011
AF047493 <i>Crithidia fasciculata</i>	0,062	0,077	0,056	0,045		0,006	0,009	0,009	0,007	0,011
JF717835 <i>Crithidia brachyflagelli</i>	0,054	0,068	0,053	0,041	0,027		0,009	0,009	0,006	0,011
EU076605 <i>Crithidia insperata</i>	0,056	0,075	0,062	0,027	0,045	0,043		0,009	0,009	0,011
EU076606 <i>Crithidia abscondita</i>	0,036	0,068	0,049	0,049	0,054	0,049	0,049		0,010	0,011
KF482058 <i>Crithidia otongatchiensis</i>	0,064	0,077	0,064	0,047	0,027	0,021	0,047	0,060		0,011
KJ443343 <i>Crithidia brevicula</i>	0,068	0,089	0,079	0,070	0,072	0,068	0,070	0,072	0,066	

Anexo V- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Leptomonas*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSU rRNA

EU079123 <i>Leptomonas jaderae</i>		0,009	0,011	0,011	0,009	0,016	0,016	0,003	0,011	0,016
JN036654 <i>Leptomonas scantii</i>	0,022		0,011	0,010	0,007	0,016	0,016	0,007	0,011	0,016
KF054114 <i>Leptomonas tenua</i>	0,036	0,036		0,013	0,011	0,016	0,016	0,010	0,011	0,016
DQ910924 <i>Leptomonas neopamerae</i>	0,036	0,029	0,051		0,011	0,018	0,018	0,011	0,012	0,018
KP717894 <i>Leptomonas seymouri</i>	0,021	0,014	0,032	0,036		0,015	0,015	0,006	0,009	0,015
JF717838 <i>Leptomonas spiculata</i>	0,076	0,068	0,076	0,088	0,068		0,007	0,016	0,015	0,004
EF546786 <i>Leptomonas tarcoles</i>	0,076	0,076	0,076	0,088	0,068	0,014		0,016	0,015	0,006
EU079124 <i>Leptomonas podlipaevi</i>	0,004	0,014	0,029	0,037	0,011	0,073	0,073		0,010	0,016
JN036653 <i>Leptomonas pyrrocoris</i>	0,034	0,034	0,037	0,041	0,026	0,066	0,066	0,026		0,015
DQ910923 <i>Leptomonas acus</i>	0,072	0,072	0,072	0,084	0,064	0,004	0,011	0,069	0,061	

(b) gGAPDH

EU076604 <i>Leptomonas podlipaevi</i>		0,009	0,008	0,004	0,012	0,011	0,011	0,009
JN036651 <i>Leptomonas pyrrocoris</i>	0,045		0,008	0,010	0,011	0,011	0,011	0,010
KP717896 <i>Leptomonas seymouri</i>	0,038	0,040		0,008	0,010	0,010	0,010	0,010
EU076603 <i>Leptomonas jaderae</i>	0,012	0,051	0,041		0,012	0,012	0,012	0,010
DQ910926 <i>Leptomonas acus</i>	0,075	0,070	0,064	0,079		0,002	0,003	0,012
JF717833 <i>Leptomonas spiculata</i>	0,072	0,066	0,060	0,075	0,004		0,002	0,012
EF546787 <i>Leptomonas tarcoles</i>	0,070	0,064	0,062	0,077	0,005	0,002		0,012
DQ910927 <i>Leptomonas neopamerae</i>	0,047	0,068	0,068	0,058	0,091	0,087	0,087	

Anexo VI- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Strigomonas*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(c) V7/V8 SSU rRNA

HM593010 <i>Strigomonas galati</i>		0,016	0,013	0,014
HM593009 <i>Strigomonas culicis</i>	0,094		0,015	0,016
COLPROT 742 isolado de Lepidoptera	0,068	0,091		0,016
AF038025 <i>Strigomonas oncopelti</i>	0,067	0,084	0,093	

(d) gGAPDH

EU079137 <i>Strigomonas culicis</i>		0,013	0,011	0,012
COLPROT 742 isolado de Lepidoptera	0,095		0,009	0,009
EU079134 <i>Strigomonas oncopelti</i>	0,070	0,055		0,009
HM593018 <i>Strigomonas galati</i>	0,083	0,053	0,055	

Anexo VII- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Herpetomonas*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSUrRNA

IOCL 0067 <i>Leishmania forattinii</i>		0,000	0,013	0,016	0,016
JQ359716 <i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	0,000		0,013	0,016	0,016
JQ359726 <i>Herpetomonas modestus</i>	0,072	0,070		0,017	0,016
JQ359729 <i>Herpetomonas mirabilis</i>	0,119	0,118	0,128		0,016
JQ359728 <i>Herpetomonas costoris</i>	0,111	0,109	0,104	0,111	

(a) gGAPDH

JQ359743 <i>Herpetomonas samuelpessoai</i>		0,017	0,014	0,000	0,014
JQ359739 <i>Herpetomonas mirabilis</i>	0,149		0,018	0,017	0,018
JQ359738 <i>Herpetomonas costoris</i>	0,118	0,153		0,014	0,010
IOCL 0067 <i>Leishmania forattinii</i>	0,000	0,149	0,117		0,014
JQ359736 <i>Herpetomonas modestus</i>	0,103	0,147	0,058	0,103	

Anexo VIII- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os isolados de Lepidoptera. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSUrRNA

COLPROT 865 isolado de Lepidoptera		0,003	0,007	0,011	0,011	0,011	0,011	0,017	0,017	0,015	0,015	0,015	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,017	0,015	0,015	0,015	0,016	0,027
COLPROT 863 isolado de Lepidoptera	0,003		0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,014	0,014	0,012	0,012	0,012	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,014	0,012	0,013	0,013	0,016	0,024
LEIP 549 isolado de Lepidoptera	0,017	0,020		0,010	0,010	0,010	0,010	0,014	0,014	0,012	0,012	0,012	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,014	0,012	0,012	0,012	0,016	0,024
COLPROT 733 isolado de Lepidoptera	0,043	0,036	0,048		0,000	0,000	0,000	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,013	0,012	0,012	0,012	0,016	0,024
COLPROT 763 isolado de Lepidoptera	0,043	0,036	0,048	0,000		0,000	0,000	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,013	0,012	0,012	0,012	0,016	0,024
COLPROT 768 isolado de Lepidoptera	0,043	0,036	0,048	0,000	0,000		0,000	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,013	0,012	0,012	0,012	0,016	0,024
LEIP 284 isolado de Lepidoptera	0,043	0,036	0,048	0,000	0,000	0,000		0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,013	0,012	0,012	0,012	0,016	0,024
COLPROT 736 isolado de Lepidoptera	0,103	0,084	0,089	0,080	0,080	0,080	0,077		0,002	0,007	0,007	0,007	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,003	0,007	0,007	0,007	0,008	0,024
COLPROT 731 isolado de Lepidoptera	0,103	0,082	0,087	0,077	0,077	0,077	0,075	0,002		0,007	0,007	0,007	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,002	0,007	0,007	0,007	0,008	0,024
COLPROT 759 isolado de Lepidoptera	0,077	0,062	0,067	0,062	0,062	0,062	0,060	0,024	0,022		0,000	0,000	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,007	0,002	0,003	0,003	0,000	0,024
COLPROT 766 isolado de Lepidoptera	0,077	0,062	0,067	0,062	0,062	0,062	0,060	0,024	0,022	0,000		0,000	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,007	0,002	0,003	0,003	0,000	0,024
COLPROT 741 isolado de Lepidoptera	0,077	0,062	0,067	0,062	0,062	0,062	0,060	0,024	0,022	0,000	0,000		0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,007	0,002	0,003	0,003	0,000	0,024
COLPROT 745 isolado de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,022	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
LEIP 189 isolado de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,022	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
COLPROT 735 isolado de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,002	0,022	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
COLPROT 730 isolados de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,002	0,022	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
COLPROT 749 isolado de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,002	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
COLPROT 739 isolado de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,002	0,022	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
COLPROT 752 isolado de Lepidoptera	0,154	0,171	0,171	0,171	0,172	0,172	0,172	0,177	0,180	0,180	0,180	0,180	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		0,022	0,022	0,022	0,022	0,027	0,000
COLPROT 734 isolado de Lepidoptera	0,103	0,085	0,090	0,081	0,081	0,081	0,078	0,004	0,002	0,022	0,022	0,022	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169		0,007	0,007	0,007	0,009	0,023
COLPROT 757 isolado de Lepidoptera	0,077	0,065	0,070	0,066	0,066	0,066	0,063	0,024	0,022	0,002	0,002	0,002	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,022		0,002	0,002	0,000	0,023
COLPROT 732 isolado de Lepidoptera	0,080	0,068	0,068	0,068	0,068	0,068	0,066	0,026	0,024	0,004	0,004	0,004	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,024	0,002		0,000	0,003	0,023
COLPROT 747 isolado de Lepidoptera	0,080	0,068	0,068	0,068	0,068	0,068	0,066	0,026	0,024	0,004	0,004	0,004	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,024	0,002	0,000		0,003	0,023
COLPROT 758 isolado de Lepidoptera	0,082	0,082	0,082	0,083	0,083	0,083	0,080	0,027	0,027	0,000	0,000	0,000	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,029	0,000	0,003	0,003		0,028
COLPROT 753 isolado de Lepidoptera	0,182	0,181	0,178	0,173	0,174	0,174	0,174	0,180	0,184	0,184	0,184	0,184	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,178	0,174	0,174	0,174	0,191

(a) gGAPDH

COLPROT 864 isolado de Lepidoptera		0,009	0,009	0,009	0,008	0,014	0,008	0,008	0,014	0,014	0,014	0,014	0,009	0,014	0,009	0,014	0,014	0,009	0,002	0,009	0,009	0,009	0,014
COLPROT 747 isolado de Lepidoptera	0,051		0,008	0,010	0,008	0,014	0,008	0,008	0,014	0,014	0,014	0,014	0,003	0,014	0,008	0,014	0,014	0,008	0,010	0,008	0,008	0,008	0,014
COLPROT 758 isolado de Lepidoptera	0,055	0,040		0,007	0,009	0,015	0,009	0,009	0,015	0,015	0,015	0,015	0,009	0,015	0,002	0,015	0,015	0,002	0,011	0,000	0,002	0,002	0,015
LEIP 555 isolado de Lepidoptera	0,053	0,053	0,034		0,009	0,014	0,008	0,009	0,014	0,014	0,014	0,014	0,010	0,014	0,007	0,014	0,014	0,007	0,010	0,007	0,008	0,008	0,014
COLPROT 733 isolado de Lepidoptera	0,043	0,041	0,045	0,043		0,014	0,002	0,000	0,014	0,014	0,014	0,014	0,008	0,014	0,009	0,014	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,014
COLPROT 735 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115		0,014	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,015	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
COLPROT 763 isolado de Lepidoptera	0,041	0,043	0,043	0,041	0,002	0,117		0,002	0,014	0,014	0,014	0,014	0,007	0,014	0,009	0,014	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,014
COLPROT 768 isolado de Lepidoptera	0,043	0,041	0,045	0,043	0,000	0,115	0,002		0,014	0,014	0,014	0,014	0,008	0,014	0,009	0,014	0,014	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,014
COLPROT 739 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115		0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,015	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
COLPROT 745 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000		0,000	0,000	0,015	0,000	0,015	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
COLPROT 748 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000	0,000		0,000	0,015	0,000	0,015	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
COLPROT 749 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000	0,000	0,000		0,015	0,000	0,015	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
LEIP 290 isolado de Lepidoptera	0,051	0,007	0,043	0,056	0,038	0,117	0,036	0,038	0,117	0,117	0,117	0,117		0,015	0,008	0,015	0,015	0,008	0,010	0,009	0,009	0,009	0,015
COLPROT 760 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,117		0,015	0,000	0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
COLPROT 734 isolado de Lepidoptera	0,053	0,038	0,004	0,034	0,045	0,123	0,043	0,045	0,123	0,123	0,123	0,123	0,041	0,123		0,015	0,015	0,000	0,010	0,002	0,003	0,003	0,015
COLPROT 752 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,117	0,000	0,123		0,000	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
LEIP 189 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,117	0,000	0,123	0,000		0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,000
COLPROT 731 isolado de Lepidoptera	0,053	0,038	0,004	0,034	0,045	0,123	0,043	0,045	0,123	0,123	0,123	0,123	0,041	0,123	0,000	0,123	0,123		0,010	0,002	0,003	0,003	0,015
COLPROT 743 isolado de Lepidoptera	0,002	0,054	0,062	0,058	0,046	0,112	0,044	0,046	0,112	0,112	0,112	0,112	0,054	0,112	0,060	0,112	0,112	0,060		0,011	0,011	0,011	0,015
COLPROT 741 isolado de Lepidoptera	0,056	0,040	0,000	0,034	0,045	0,126	0,043	0,045	0,126	0,126	0,126	0,126	0,043	0,126	0,004	0,126	0,126	0,004	0,064		0,002	0,002	0,015
COLPROT 757 isolado de Lepidoptera	0,056	0,043	0,004	0,038	0,049	0,126	0,047	0,049	0,126	0,126	0,126	0,126	0,047	0,126	0,007	0,126	0,126	0,007	0,064	0,004		0,000	0,015
COLPROT 759 isolado de Lepidoptera	0,056	0,043	0,004	0,038	0,049	0,126	0,047	0,049	0,126	0,126	0,126	0,126	0,047	0,126	0,007	0,126	0,126	0,007	0,064	0,004	0,000		0,015
COLPROT 730 isolado de Lepidoptera	0,117	0,107	0,126	0,118	0,115	0,000	0,117	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,117	0,000	0,123	0,000	0,000	0,123	0,112	0,126	0,126	0,126	

Anexo IX- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSUrRNA

IOCL 2274 <i>Leishmania hoogstrali</i>		0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,007	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
IOCL 568 <i>Leishmania venezuelensis</i>	0,000		0,000	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,007	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
IOCL 2279 <i>Leishmania tarentolae</i>	0,000	0,000		0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,007	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
IOCL 571 <i>Leishmania tropica</i>	0,000	0,000	0,000		0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,007	0,007	0,007	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000
KF041798 <i>Leishmania enriettii</i>	0,007	0,007	0,007	0,007		0,007	0,007	0,007	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
GQ920678 <i>Leishmania aethiopica</i>	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014		0,007	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,005	0,005	0,005	0,006	0,005
IOCL 563 <i>Leishmania donovani</i>	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,014		0,000	0,009	0,009	0,009	0,009	0,005	0,005	0,005	0,006	0,005
IOCL 3034 <i>Leishmania infantum</i>	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,014	0,000		0,009	0,009	0,009	0,009	0,005	0,005	0,005	0,006	0,005
IOCL 1266 <i>Leishmania lainsoni</i>	0,014	0,014	0,014	0,014	0,007	0,021	0,021	0,021		0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,008	0,007
KF302743 <i>Leishmania guyanensis</i>	0,014	0,014	0,014	0,014	0,007	0,021	0,021	0,021	0,000		0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,008	0,007
IOCL 3451 <i>Leishmania braziliensis</i>	0,014	0,014	0,014	0,014	0,007	0,021	0,021	0,021	0,000	0,000		0,000	0,007	0,007	0,007	0,008	0,007
IOCL 3310 <i>Leishmania naiffi</i>	0,014	0,014	0,014	0,014	0,007	0,021	0,021	0,021	0,000	0,000	0,000		0,007	0,007	0,007	0,008	0,007
KF041806 <i>Leishmania mexicana</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,014	0,014	0,014		0,000	0,000	0,005	0,000
IOCL 583 <i>Leishmania pifanoi</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,014	0,014	0,014	0,000		0,000	0,005	0,000
IOCL 729 <i>Leishmania amazonensis</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,014	0,014	0,014	0,000	0,000		0,005	0,000
M80291 <i>Leishmania adleri</i>	0,003	0,003	0,003	0,003	0,007	0,011	0,011	0,011	0,018	0,018	0,018	0,018	0,007	0,007	0,007		0,003
FJ263547 <i>Leishmania major</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,007	0,007	0,007	0,014	0,014	0,014	0,014	0,000	0,000	0,000	0,003	

(b) gGAPDH

KX790725 <i>Leishmania enriettii</i>		0,014	0,012	0,013	0,013	0,013	0,015	0,011	0,015	0,011	0,014	0,012	0,014	0,014
KX790730 <i>Leishmania naiffi</i>	0,115		0,015	0,015	0,014	0,014	0,005	0,013	0,005	0,014	0,004	0,014	0,017	0,005
IOCL 2279 <i>Leishmania tarentolae</i>	0,080	0,124		0,006	0,005	0,005	0,015	0,011	0,015	0,011	0,015	0,012	0,010	0,015
KX790729 <i>Leishmania hoogstraali</i>	0,086	0,124	0,023		0,006	0,005	0,016	0,012	0,016	0,012	0,016	0,013	0,009	0,015
KX790728 <i>Leishmania gymnodactyli</i>	0,082	0,118	0,016	0,021		0,005	0,015	0,011	0,015	0,012	0,014	0,012	0,010	0,014
KX790727 <i>Leishmania adleri</i>	0,084	0,118	0,016	0,018	0,014		0,015	0,011	0,015	0,011	0,014	0,012	0,010	0,014
IOCL 240 <i>Leishmania panamensis</i>	0,121	0,016	0,126	0,130	0,120	0,120		0,014	0,004	0,014	0,004	0,015	0,018	0,006
IOCL 563 <i>Leishmania donovani</i>	0,070	0,107	0,079	0,081	0,077	0,077	0,113		0,014	0,002	0,013	0,009	0,011	0,013
IOCL 2334 <i>Leishmania guyanensis</i>	0,121	0,018	0,124	0,132	0,117	0,122	0,009	0,119		0,015	0,005	0,015	0,019	0,006
IOCL 3034 <i>Leishmania infantum</i>	0,070	0,109	0,081	0,083	0,079	0,079	0,115	0,002	0,122		0,013	0,009	0,011	0,014
IOCL 3451 <i>Leishmania braziliensis</i>	0,113	0,009	0,122	0,126	0,115	0,115	0,011	0,105	0,012	0,107		0,014	0,017	0,005
XM 003877392 <i>Leishmania mexicana</i>	0,076	0,109	0,084	0,090	0,082	0,082	0,115	0,045	0,117	0,047	0,102		0,012	0,014
AF047497 <i>Leishmania major</i>	0,083	0,122	0,042	0,038	0,040	0,040	0,129	0,059	0,132	0,061	0,119	0,063		0,017
KP197180 <i>Leishmania lainsoni</i>	0,112	0,018	0,119	0,123	0,113	0,109	0,023	0,111	0,025	0,113	0,016	0,110	0,116	

Anexo X- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Endotrypanum*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSUrRNA

COLPROT 151 <i>Endotrypanum monterogei</i>			0,000	0,003	0,000	0,005
KX790771 <i>Endotrypanum schaudinni</i>	0,000			0,003	0,000	0,005
IOCL 889 <i>Endotrypanum equatorensis</i>	0,003	0,003			0,003	0,003
IOCL 1245 <i>Endotrypanum colombiense</i>	0,000	0,000	0,003			0,005
KX790765 <i>Endotrypanum herreri</i>	0,007	0,007	0,003	0,007		

(b) gGAPDH

KX790716 <i>Endotrypanum monterogei</i>			0,009	0,002	0,004	0,000
KX790704 <i>Endotrypanum herreri</i>	0,044			0,009	0,009	0,009
IOCL 1245 <i>Endotrypanum colombiense</i>	0,004	0,047			0,005	0,002
IOCL 889 <i>Endotrypanum equatorensis</i>	0,011	0,044	0,014			0,004
KX790715 <i>Endotrypanum schaudinni</i>	0,000	0,044	0,004	0,011		

Anexo XI- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos do gênero *Paraleishmania*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSUrRNA

IOCL 1530 <i>Paraleishmania deanei</i>		0,000
IOCL 2277 <i>Paraleishmania hertigi</i>	0,000	

(b) gGAPDH

IOCL 1530 <i>Paraleishmania deanei</i>		0,003
IOCL 2277 <i>Paraleishmania hertigi</i>	0,005	

Anexo XII- Divergência nucleotídica entre as sequências dos genes V7/V8 SSUrRNA (a) e gGAPDH (b) entre os espécimes de tripanossomatídeos dos gêneros *Novymonas*, *Borovskya* e *Zelonia*. Para esta análise foi empregado o método de distância genética estimada com base na matriz de distância Kimura 2-parâmetros.

(a) V7/V8 SSUrRNA

KT944308 <i>Novymonas esmeraldas</i>		0,019	0,017	0,016
DQ383648 <i>Zelonia costaricensis</i>	0,093		0,009	0,018
KY273498 <i>Zelonia australiensis</i>	0,077	0,025		0,016
FJ968532 <i>Borovskya barvae</i>	0,066	0,090	0,070	

(a) gGAPDH

DQ383650 <i>Zelonia costaricensis</i>		0,010	0,011	0,008
KT944300 <i>Novymonas esmeraldas</i>	0,051		0,011	0,012
FJ968529 <i>Borovskya barvae</i>	0,068	0,066		0,012
KY273493 <i>Zelonia australiensis</i>	0,024	0,049	0,053	